

sebia

HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20

Ref. 3010

IVD

CE

2004/12

UTILIZAÇÃO

O HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20 destina-se à separação das hemoglobinas normais (A e A₂) e à detecção das principais hemoglobinas anómalas: S ou D e C ou E, por electroforese em geles de agarose. A electroforese é feita no hemolisado da lavagem dos glóbulos vermelhos. As hemoglobinas são separadas em meio alcalino (pH 8,5), fixadas pelo calor ou em meio álcool/ácido e coradas com uma solução de negro de amido. O excesso de corante é eliminado com uma solução ácida. As electroforeses resultantes podem ser analisadas visualmente ou ser avaliadas por densitometria, o que dá uma quantificação relativa e precisa das hemoglobinas com interesse particular, tais como a hemoglobina A₂ no diagnóstico da β-talassémia. A electroforese em meio ácido como, por exemplo, o HYDRAGEL ACID(E) HEMOGLOBIN(E) K20, permite confirmar a identificação das variantes da hemoglobina, em especial para diferenciar a Hb S da Hb D e a Hb E da Hb C.

Cada gel de agarose poderá analisar 7 amostras no kit HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20.

Para diagnóstico *in vitro*. Registado no INFARMED.

PRINCÍPIO DO TESTE

A hemoglobina é uma molécula complexa composta por quatro cadeias polipeptídicas, idênticas duas a duas. Cada cadeia está ligada ao heme, um núcleo tetrapirrólico (porfirina), ligado a um átomo de ferro. A parte do heme é comum a todas as hemoglobinas e suas variantes. A parte proteica responsável pelo tipo de hemoglobina é dechamada globina. As cadeias polipeptídicas α, β, δ e γ constituem as hemoglobinas humanas normais:

- hemoglobina A = α 2 β 2
- hemoglobina A₂ = α 2 δ 2
- hemoglobina fetal F = α 2 γ 2

A cadeia α é comum a estas três hemoglobinas.

A estrutura espacial da hemoglobina (como as de todas as proteínas) depende da natureza e da sequência dos aminoácidos que formam as cadeias. As ligações que se formam entre os diferentes aminoácidos são responsáveis pela forma da molécula, pela estabilidade e suas propriedades. A substituição dos aminoácidos por mutação é responsável pela formação de variantes de hemoglobina, que têm diferentes cargas superficiais e, conseqüentemente, diferentes mobilidades electroforéticas, também dependentes do pH, da força iónica do tampão e da natureza do suporte.

As anomalias das hemoglobinas são de dois tipos:

- anomalias qualitativas (ou estruturais) resultantes são designadas por hemoglobinopatias ;
- anomalias quantitativas (ou de regulação), provocadas por diminuição da síntese de uma das cadeias de hemoglobina, são designadas por talassémias.

REAGENTES FORNECIDOS NOS KITS HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20

ITEM	REF. N° 3010
Geles de agarose (prontos a usar)	10 geles
Tampão Tris-Barbital (solução concentrada)	3 frascos de 75 ml
Diluyente da solução corante (solução concentrada)	1 frasco, 60 ml
Negro de amido (solução concentrada)	1 frasco, 20 ml
Descorante (solução concentrada)	1 frasco de 100 ml
Solução hemolisante (pronto a usar)	1 frasco, 20 ml
Aplicadores 7 dentes (prontos a usar)	1 caixa de 10
Papéis de filtro finos	1 pacote de 10

PARA OPTIMIZAÇÃO DOS RESULTADOS

Os elementos de um mesmo kit devem ser utilizados em conjunto, e de acordo com as instruções de utilização.

LER ATENTAMENTE AS INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO.

1. GELES DE AGAROSE

Preparação

Os geles de agarose estão prontos a usar. Cada gel contém: agarose, 8 g/l ; tampão alcalino pH 8,5 ± 0,1 ; aditivos, não perigosos nas concentrações usadas, necessários para otimizar o ensaio.

Utilização

Meio de suporte para a electroforese das hemoglobinas.

Armazenamento, estabilidade e sinais de deterioração

Armazenar os geles horizontalmente, na embalagem protectora de origem, à temperatura ambiente (15 - 30 °C) ou no frigorífico (2 - 8 °C). (A seta existente na parte da frente da caixa do kit deve estar voltada para cima). São estáveis até ao fim da validade indicada na caixa do kit e nos rótulos das embalagens dos geles. Evitar variações da temperatura durante o armazenamento (ex: não armazenar perto de uma janela ou de uma fonte de calor).

NÃO CONGELAR!

Deitar fora o gel quando:

- (i) houver cristais ou precipitados na superfície do gel ou quando a textura do mesmo for muito macia (isto sucede se o gel for congelado) ;
- (ii) há desenvolvimento de bactérias ou fungos ;
- (iii) estiver presente uma quantidade anormal de líquido na embalagem do gel (resultante da exsudação do gel devido a condições de armazenamento inadequadas).

2. TAMPÃO TRIS-BARBITAL

Preparação

Cada frasco de tampão concentrado deve ser completado a 1 litro com água destilada ou desmineralizada. Após diluição, a solução contém: tampão tris-barbital pH 9,2 ± 0,2 ; azida de sódio.

ATENÇÃO: O tampão concentrado contém 2,45 % de barbital, 13,73 % de barbital sódico e 0,13 % de azida de sódio. Não ingerir! Se ingerida, consultar imediatamente um médico! Quando em contacto com ácidos, chumbo ou cobre a azida de sódio pode levar à formação de compostos explosivos ou tóxicos. Quando deitar fora lavar abundantemente com grandes quantidades de água.

Utilização

Tampão da electroforese.

Armazenamento, estabilidade e sinais de deterioração

Armazenar o tampão concentrado à temperatura ambiente ou no frigorífico. É estável por vários anos, pelo menos até ao fim da validade indicada na caixa do kit ou no rótulo do frasco. A solução diluída é estável por um ano, à temperatura ambiente, num frasco rolhado. Deitar fora se o seu aspecto se alterar ou se ficar turva devido a contaminação microbiana.

3. DILUENTE DA SOLUÇÃO CORANTE

Preparação

O diluente da solução corante deverá ser utilizado como está descrito no parágrafo " SOLUÇÃO CORANTE NEGRO DE AMIDO ".

Contém uma solução ácida.

Utilização

Para a preparação das soluções de corante negro de amido.

Armazenamento, estabilidade e sinais de deterioração

Armazenar o diluente à temperatura ambiente ou no frigorífico. É estável até ao fim da validade indicada na caixa do kit ou no rótulo do frasco. NÃO CONGELAR.

Não adicionar azida de sódio.

4. CORANTE NEGRO DE AMIDO

Preparação

O corante negro de amido concentrado, é uma solução viscosa que pode eventualmente gelificar, o que não afecta nada a qualidade da solução final e o seu poder de coloração.

Em qualquer caso, para obter uma perfeita reconstituição do corante, é necessário que seja respeitado o procedimento seguinte:

1. Adicionar cerca de 15 ml do diluente do corante ao frasco do negro de amido concentrado.
2. Fechar cuidadosamente o frasco.
3. Agitar muito vigorosamente o frasco durante pelo menos 5 segundos.
4. Transferir esta solução para o recipiente de preparação da solução de coloração.
5. Repetir esta etapa duas vezes ou se necessário 3 vezes.
6. Transferir o diluente restante para o recipiente de preparação da solução de coloração.
7. Completar o volume para 300 ml com água destilada ou desmineralizada.
8. Agitar muito bem esta solução durante 5 a 10 minutos.

A solução corante está pronta a utilizar.

Após diluição, a solução de corante contém: solução ácida pH ≈ 2 ; negro de amido, 4 g/l ; etilenoglicol, 6,7% ; aditivos, não perigosos nas concentrações usadas, necessários para otimizar o ensaio.

AVISO: Nocivo em caso de ingestão.

Utilização

Para corar geles depois da electroforese das proteínas.

IMPORTANTE : A solução corante é unicamente destinada à coloração de 10 geles. Recomenda-se a renovação da solução após as 10 utilizações.

Armazenamento, estabilidade e sinais de deterioração

Armazenar a solução de corante concentrada e a solução diluída à temperatura ambiente ou no frigorífico em frascos fechados para evitar a evaporação.

A solução concentrada é estável até ao fim da validade indicada na caixa do kit ou nos rótulos dos frascos.

A solução diluída de corante é estável por um mês.

5. SOLUÇÃO DESCORANTE

Preparação

Cada frasco de solução descorante concentrada deve ser diluída a 1/1000 com água destilada ou desmineralizada e permite obter 100 litros de solução total. Diluir 1 ml da solução concentrada em 1 litro com água destilada ou desmineralizada. Após diluição, a solução descorante contém: ácido cítrico ; 0,5 g/l.

Utilização

Na descoloração, isto é, remoção do excesso de corante do gel.

Armazenamento, estabilidade e sinais de deterioração

Armazenar a solução descorante concentrada à temperatura ambiente ou no frigorífico. É estável até ao fim da validade indicada na caixa do kit ou no rótulo do frasco da solução descorante. A solução descorante diluída é estável por uma semana à temperatura ambiente, quando conservada em recipiente fechado.

Deitar fora a solução diluída se se notarem alterações no seu aspecto, por exemplo, se se tornar turva devido a contaminação microbiana.

Não adicionar azida de sódio.

Em caso de conservação mais prolongada da solução diluída (superior a uma semana), adicionar 50 µl/l de ProClin 300 para evitar qualquer proliferação microbiana.

A solução descorante diluída contendo ProClin é estável à temperatura ambiente (de 15 a 30 °C) ou no frigorífico (entre 2 e 8 °C). É estável até ao fim da validade indicada na caixa do kit ou no rótulo do frasco do descolorante.

6. SOLUÇÃO HEMOLISANTE

Preparação

A solução hemolisante vem pronta a ser utilizada. Trata-se de um tampão com aditivos, não perigosos nas concentrações utilizadas, necessários para otimizar o ensaio.

Utilização

Para hemolisar os glóbulos vermelhos do sangue.

Armazenamento, estabilidade e sinais de deterioração

Armazenar a solução hemolisante à temperatura ambiente ou no frigorífico. É estável até ao fim da validade indicada na caixa do kit ou no rótulo do frasco da solução hemolisante.

Deitar fora a solução hemolisante se o seu aspecto se alterar, isto é, se ficar turva devido a contaminação microbiana.

7. APLICADORES

Utilização

Aplicadores pré-cortados, de utilização única, para aplicação das amostras.

Armazenamento

Armazenar os aplicadores em local seco à temperatura ambiente ou no frigorífico.

8. PAPEIS DE FILTRO FINOS

Utilização

Pré-cortados, de utilização única, estes finos papéis absorventes destinam-se à absorção do excesso de líquido da superfície do gel antes da aplicação da amostra.

Armazenamento

Armazenar os papéis de filtro finos num local seco à temperatura ambiente ou no frigorífico.

REAGENTES NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

1. SORO FISIOLÓGICO

Preparação

Preparar uma solução a 0,15 M (9 g/l) de NaCl em água destilada ou desmineralizada.

Utilização

Para lavar os glóbulos vermelhos.

Armazenamento, estabilidade e sinais de deterioração

Armazenar à temperatura ambiente ou no frigorífico. Deitar fora após 3 meses ou se notar alterações no seu aspecto, por exemplo, se se tornar turva devido a contaminação microbiana. Para conservar por períodos de tempo mais alargado, adicionar azida de sódio (1 g/l).

2. FIXADOR (facultativo)

Preparação

Pelo menos 15 minutos antes da utilização, preparar o fixador (v/v): 60 % de etanol ; 10 % de ácido acético ; 30 % de água destilada ou desmineralizada. Misturar bem.

Utilização

Fixação das proteínas separadas por electroforese em geles de agarose.

Armazenamento, estabilidade e sinais de deterioração

Armazenar à temperatura ambiente em frasco bem rolhado para evitar a evaporação. Deitar fora passados 3 meses. Não fixar mais que 4 geles em cada 150 ml de fixador.

EQUIPAMENTO E ACESSÓRIOS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

1. Fonte de alimentação, ex: GD 61 D SEBIA, ref. n° 1300 ; GD 251 D SEBIA, ref. n° 1301 ; MG 300 SEBIA, ref. n° 1302 ou MG 500 SEBIA, ref. n° 1303.
2. APPLICATEUR HYDRAGEL K20 SEBIA, ref. n° 1409, que contém o suporte-aplicador HYDRAGEL K20.
3. Câmara húmida, ref. n° 1270.
4. Câmara de electroforese: K20 SEBIA, ref. n° 1400.
5. Tinas e suportes para o tratamento de geles de 7 amostras: kit de acessórios HYDRAGEL K20 SEBIA ref. n° 1420.
6. Pipetas: 5 µl, 10 µl e 200 µl.
7. Incubador-secador: IS 80 SEBIA, ref. n° 1430.
8. Densitómetro/scanner capaz de ler geles de 82 x 51 mm a 570 nm (filtro amarelo): HYRYS SEBIA, DVSE SEBIA ou scanner equipado com logiciel PHORESIS SEBIA. Seguir as instruções de cada aparelho na sua utilização e calibração.

AMOSTRAS A ANALIZAR

Colheita e conservação das amostras

É recomendada a utilização de amostras de sangue frescas colhidas com anticoagulante. Podem ser usados tubos de colheita contendo como anticoagulante EDTA, citratos ou heparina ; evitar os que contenham iodoacetato. O sangue deve ser colhido de acordo com os métodos utilizados nos laboratórios de análises clínicas. Se necessário, armazenar o sangue entre 2 - 8 °C até cinco dias.

Preparação das amostras

- Centrifugar o sangue com anticoagulante a 5000 rpm durante 5 minutos.
- Deitar fora o plasma.
- Lavar as glóbulos vermelhos 2 vezes com 10 volumes de soro fisiológico: deve ser tomado o maior cuidado quando se estiver a manipular volumes de glóbulos vermelhos inferiores a 10 µl.
- **Elimine o excesso de solução salina que se encontra como sobrenadante dos glóbulos vermelhos e agite-os no vórtex antes de extrair 10 µL para hemólise.**
- Hemolisar 10 µl de glóbulos vermelhos com 130 µl de solução hemolisante.
- Agitar no vortex durante 10 segundos e incubar 5 minutos à temperatura ambiente.

NOTAS:

- Para preparar um hemolisado de indivíduos anémicos o volume de glóbulos vermelhos (obtidos após centrifugação), pode ser aumentado :
 - 15 µl para indivíduos levemente anémicos (aproximadamente 0,1 g/ml de Hb)
 - 20 µl para indivíduos muito anémicos (< 0,07 g/ml de Hb), e 130 µl de solução hemolisante.
- Como consequência, a intensidade da coloração vai aumentar sem modificar a proporção de cada fracção.
- Não é necessário filtrar ou centrifugar o hemolisado.
- A solução hemolisante SEBIA não afecta a hemoglobina instável de Bart.

TÉCNICA

I. MIGRAÇÃO

1. Colocar o suporte-aplicador HYDRAGEL K20 sobre a bancada (Fig. 1) e erguer a parte móvel do mesmo (suporte dos aplicadores).
2. Colocar 120 µl de água destilada ou desmineralizada no terço inferior do quadro impresso no suporte-aplicador.
3. Retirar o gel da embalagem.
4. Eliminar rapidamente o excesso de líquido da superfície do gel com a ajuda de um papel de filtro fino.
ATENÇÃO: Não deixar o papel de filtro em contacto prolongado com o gel, para evitar a sua desidratação.
5. Colocar o gel virado para cima, contra a parte inferior do quadro impresso no suporte-aplicador (Fig. 2).
6. Dar uma forma côncava ao gel (Fig. 2) e baixá-lo lentamente até contacto com a gota de água. A gota deve repartir-se por toda a largura do gel. Ajustar ligeiramente o gel de modo a eliminar as bolhas de ar que se tenham formado. Baixar o gel até ficar na horizontal. A gota de água deve-se repartir sobre toda a superfície do gel.
7. Baixar o suporte dos aplicadores até uma posição intermédia, com o botão, situado lateralmente, voltado para cima.
8. Colocar um aplicador numa superfície plana, com os números dos poços virados para cima.
9. Aplicar 10 µl de amostra hemolisada em cada poço. A pipetagem das amostras não deve ultrapassar os 2 minutos.
O aplicador deve ser utilizado imediatamente após a colocação das amostras.
Para uma utilização posterior (8 horas no máximo), colocar o aplicador na câmara húmida com os dentes voltados para cima (segure-o pela protecção de plástico), pôr a câmara húmida no frigorífico e só colocar o gel no suporte-aplicador HYDRAGEL K20 no momento da sua utilização.
Ver as instruções de utilização da câmara húmida para mais detalhes.
10. Quebrar e retirar a protecção dos dentes.
11. Colocar o aplicador na posição nº 4 do suporte-aplicador.
IMPORTANTE: Os números impressos no aplicador devem ficar virados para o operador (Fig. 4).
12. Baixar o suporte do aplicador rodando o botão lateral de modo a que o aplicador fique em contacto com o gel. **NÃO FORÇAR A DESCIDA DO SUPORTE DOS APLICADORES.**
13. Após 1 minuto de aplicação, rodar o botão lateral para levantar o aplicador. Retirar o aplicador e deitar fora.
14. Colocar o gel na câmara de electroforese, segundo a polaridade indicada no gel, com as amostras no lado do cátodo.
Posicionar o HYDRAGEL no suporte da tina K20 com o lado do gel voltado para baixo ; o gel deve mergulhar cerca de 1cm no tampão, de cada lado.
Ver instruções da câmara K20 para mais pormenores.
15. Ligar a tina à fonte de alimentação.

CONDIÇÕES DE MIGRAÇÃO	SEBIA K20
Volume de tampão por compartimento	150 mL
Volume total de tampão	300 mL
Tempo de migração	15 minutos
Voltagem constante	165 V
Corrente inicial (por gel)	7 ± 2 mA

16. Após migração, desligar a tina e retirar o gel.

II. FIXAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Pode-se fazer de duas maneiras : fixação pelo calor ou com solução de fixação.

Fixação pelo calor (só com o incubador-secador IS 80 SEBIA) :

Secar o gel sob ar quente a 80 °C no incubador-secador IS 80 até secagem completa (durante 10 minutos mínimo).

Fixação com solução de fixação:

1. Colocar o gel num suporte para geles (fornecido com o kit de acessórios SEBIA HYDRAGEL K20).
2. Encher uma tina (fornecida com o kit de acessórios SEBIA HYDRAGEL K20) com 150 ml de solução de fixação.
3. Imergir o gel verticalmente no fixador durante 15 minutos.
4. Retirar o gel e secá-lo sob ar quente a 80 °C no incubador-secador IS 80.
IMPORTANTE : O gel deve estar perfeitamente seco.

III. COLORAÇÃO-DESCOLORAÇÃO

1. Imergir o gel, frio e seco, na solução corante durante 5 minutos.
2. Proceder à remoção do excesso de corante em três banhos sucessivos de descorante, até que o fundo surja limpo e incolor.
3. Retirar o excesso de líquido da superfície do gel com um papel macio e secar o gel sob ar quente a 80 °C. Se necessário, limpar a parte de trás do gel (suporte plástico) com um papel macio humedecido.

IV. LEITURA

Ler com um densitómetro / scanner a 570 nm ou com filtro amarelo.

Se utilizar os densitómetros HYRYS ou DVSE, posicione a fracção A₂ na marca de 5 mm da placa de leitura, de modo a colocar o zero no ponto mais baixo entre a fracção A₂ e a fracção anidrase carbónica.

NOTA: Para garantir resultados mais precisos e coerentes :

- Regular o comprimento de leitura a 30 mm, de forma a incluir todo o perfil electroforético.
- Posicionar as mínimas de modo a rodearem o valor da fracção A₂.

Recomenda-se analisar os perfis electroforéticos o mais rapidamente possível. Os geles, conservados no escuro, em ambiente seco e ao abrigo de todas as fontes de calor, podem ser interpretados qualitativamente num período de 3 meses.

RESULTADOS

Controlo de qualidade

É aconselhável incluir uma amostra de sangue de controlo contendo as hemoglobinas A, F, C e S, em cada série de amostras.

Valores

A leitura a 570 nm por densitometria permite definir as concentrações relativas (percentagens) de cada fracção.

Os valores normais (médios mais 2 DP), para cada fracção, nos geles HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20 foram estabelecidos a partir de uma população saudável de 200 adultos (homens e mulheres):

Hemoglobina A	≥	96,5 %
Hemoglobina F	<	2,0 % (*)
Hemoglobina A ₂	≤	3,5 %

(*) Ver Interferências e Limitações

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores normais.

Interpretação

1. Anomalias qualitativas: hemoglobinopatias

A maioria das hemoglobinopatias deve-se à substituição por mutação de um único aminoácido num dos quatro tipos de cadeias polipeptídicas. O significado clínico de tal alteração depende do tipo de aminoácido e do local envolvidos. Em doenças clinicamente significativas, a cadeia α ou a cadeia β estão afectadas.

Foram descritas mais de 200 variantes de hemoglobina no adulto. As primeiras hemoglobinas anómalas estudadas e as que ocorrem mais frequentemente têm a sua carga eléctrica alterada, o que leva a uma fácil detecção por electroforese.

Existem quatro hemoglobinas anómalas principais que apresentam um interesse clínico particular, do ponto de vista antropológico e médico: S, C, E e D. O kit HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20 destina-se à detecção das hemoglobinopatias e talassémias. Uma vez detectado um perfil electroforético anómalo, este deve ser confirmado por electroforese em meio ácido, em geles de agarose.

Hemoglobina S

A hemoglobina S é a mais frequente. Deve-se à substituição de um ácido glutâmico da cadeia β (um aminoácido ácido) por uma valina (aminoácido neutro): a sua mobilidade electroforética vai diminuir. Nos geles HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20 em meio alcalino, a hemoglobina S migra em posição central, entre as fracções A e A₂.

Hemoglobina C

Um ácido glutâmico da cadeia β é substituído por uma lisina (aminoácido básico): a sua mobilidade vai diminuir muito. No HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20 as fracções C e E ficam sobrepostas à fracção A₂. Quando esta fracção é superior a 15 %, deve-se suspeitar das hemoglobinas C e E.

Hemoglobina E

Um ácido glutâmico da cadeia β é substituído por uma lisina: a hemoglobina E migra exactamente como a hemoglobina C no HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20. Ao contrário do que sucede com a hemoglobina C, não se separa das hemoglobinas A e A₂ em meio ácido [HYDRAGEL ACID(E) HEMOGLOBIN(E) K20]. Esta propriedade permite diferenciar as hemoglobinas E e C.

Hemoglobina D

Um ácido glutâmico da cadeia β é substituído por uma glutamina. No HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20 esta hemoglobina migra exactamente como a hemoglobina S. Ao contrário da hemoglobina S, a hemoglobina D não se separa das hemoglobinas A e A₂ em meio ácido [HYDRAGEL ACID(E) HEMOGLOBIN(E) K20]; esta propriedade permite diferenciar as hemoglobinas S e D.

2. Anomalias quantitativas: Talassémias

As talassémias constituem um grupo bastante heterogéneo de distúrbios genéticos, caracterizadas por uma diminuição da síntese de um dos tipos de cadeias polipeptídicas. O mecanismo molecular desta diminuição ainda está mal conhecido.

Existem dois tipos de síndromes talassémicas:

Alfa-talassémias

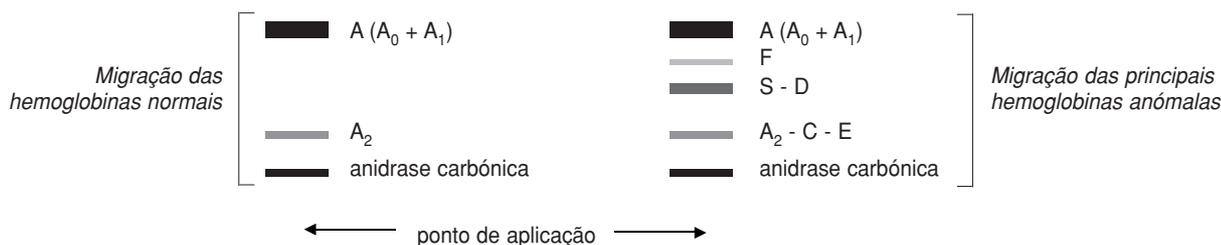
Caracterizam - se pela diminuição da síntese das cadeias α, afectando conseqüentemente a síntese das 3 hemoglobinas fisiológicas. O excesso de síntese das cadeias β e γ em relação às cadeias α leva à formação de tetrámeros sem cadeia α:

- Hemoglobina Bart = γ₄
- hemoglobina H = β₄

Beta-talassémias

Caracterizam-se pela diminuição da síntese de cadeias β . Apenas a síntese da hemoglobina A é afectada. As percentagens de hemoglobina F e A_2 aumentam em relação à da hemoglobina A.

3. Perfis electroforéticos



A0: fracção não glicosilada da hemoglobina A normal do adulto.

A1: fracção glicosilada da hemoglobina A normal do adulto.

Interferências e limitações

- Não usar amostras de sangue hemolisadas.
- Quando uma hemoglobina anómala é detectada, apresentando uma mobilidade electroforética diferente da das principais variantes de hemoglobinas S, C, D e E, deve-se utilizar outros meios de identificação (ex: electroforese das cadeias de globinas), ou consultar um laboratório especializado.
- O doseamento da hemoglobina Fetal (Hb F), ou de qualquer outra hemoglobina menor que migra na proximidade de fracções principais, é aproximado quando a sua concentração representa menos de 2 a 3 % da hemoglobina total.
- As amostras de certos doentes apresentam uma hemoglobina S homocigótica ; quando tratadas com Hydrea® (hidroxicarbamida) podem apresentar uma hemoglobina F, cuja síntese foi induzida por este tratamento. Em alguns dos casos observados, esta hemoglobina F induzida apresentou uma mobilidade nos geles HYDRAGEL 7 HEMOGLOBIN(E) ligeiramente diferente da apresentada pela hemoglobina F fisiológica.
- Nas amostras armazenadas há mais de 7 dias, pode observar-se uma banda concentrada em frente à fracção Hb A. Esta banda concentrada não deverá ser confundida e interpretada como uma variante da hemoglobina (por exemplo, Hemoglobinas H ou Bart).

Assistência técnica

Em caso de maus resultados contactar os serviços técnicos do fornecedor.

Estão disponíveis nos Serviços Técnicos da SEBIA fichas de dados de segurança dos diversos reagentes do kit, bem como informação relativa à eliminação dos desperdícios.

CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO

Todas as leituras densitométricas foram efectuadas com o densitómetro HYRYS da SEBIA. Os perfis electroforéticos foram interpretados a olho nú. Os resultados obtidos por análise quantitativa indicam uma boa repetibilidade e reproductibilidade da técnica HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20 em relação a todos os aspectos testados, com um coeficiente de variação médio de 2,2 %.

Reprodutibilidade intra-ensaio

Três amostras de sangue (uma normal, uma com valores elevados de Hb A_2 e uma amostra com Hb C) foram analisadas repetidamente em geles de um mesmo lote HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20. Os perfis electroforéticos foram analisados por densitometria e a tabela seguinte apresenta os valores médios (em %), DP e CV, obtidos para cada fracção de hemoglobina de cada uma das 3 amostras.

NOTA: Os resultados foram concordantes para todas as amostras:

- Amostras com valores normais de Hb A_2 apresentaram todos os valores normais.
- Amostras com valores elevados de Hb C e Hb A_2 apresentaram todos os valores elevados.

FRACÇÃO DE Hb	MÉDIA	DP	CV (%)
Sangue normal			
Hb A	97,4	0,1	0,1
Hb A_2	2,6	0,1	5,3
Sangue com Hb A_2 elevado			
Hb A	95,2	0,2	0,2
Hb A_2	4,8	0,2	4,4
Sangue com Hb C elevado			
Hb A	56,7	0,4	0,8
Hb C	43,3	0,4	1,0

Reprodutibilidade inter-ensaio

Foram analisadas amostras de sangue, em 10 geles HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20 de um mesmo lote. As amostras ensaiadas incluíam 7 amostras com uma hemoglobina anormal (Hb S, Hb F ou Hb C) e 2 amostras com um nível elevado de Hb A_2 . Os valores médios (em %), DP e CV foram calculados para cada fracção de hemoglobina das amostras. Os limites dos valores médios, DP e CV, e a média dos CV representando o conjunto de cada fracção, estão indicados na tabela abaixo.

NOTA: Os resultados foram concordantes para todas as amostras:

- Amostras com valores normais de Hb A_2 apresentaram todos os valores normais.
- Amostras com valores elevados de Hb A_2 apresentaram todos os valores elevados.

FRACÇÃO Hb	MÉDIA	DP	CV (%)	MÉDIA CV (%)
Hb A	18,0 – 97,8	0,1 – 1,0	0,1 – 4,0	0,8
Hb F	13,3 – 76,3	0,5 – 0,6	0,7 – 3,4	1,8
Hb C/E	21,5 – 43,5	0,2 – 0,3	0,6 – 1,1	0,8
Hb S/D	9,7 – 84,1	0,1 – 0,6	0,4 – 2,6	1,1
Hb A ₂	2,2 – 5,7	0,1 – 0,2	2,3 – 7,6	4,0

Precisão - Detecção das anomalias da hemoglobina

Foram analisadas 63 amostras de sangue com o kit HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20 e com outro sistema em gel de agarose disponível comercialmente. As amostras de sangue e o respectivo diagnóstico clínico, estabelecido por electroforese em geles alcalino e ácido e/ou HPLC, foram fornecidas por um hospital.

Os resultados obtidos mostraram uma correlação perfeita entre os dois sistemas com, para a detecção de hemoglobinas normais, uma sensibilidade de 100 % e uma especificidade de 100 % em relação à técnica de referência, calculados segundo o método recomendado (Wendling, 1986).

Todas as hemoglobinas anómalas, assim como hemoglobinas as normais, detectadas com o HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20 estavam de acordo com o sistema de geles comparativo, com os resultados do hospital e com o diagnóstico clínico. Não foram observados casos de falsos positivos, isto é, detecção de fracções anómalas quando não existia a anomalia inerente. Também não se observaram casos de falsos positivos (detecção de uma Hb anómala inexistente ou de uma Hb de valor normal detectada numa taxa anormal).

Precisão - Determinação quantitativa de Hb A₂

51 amostras de sangue, com níveis normais e elevados de Hb A₂, foram analisadas em paralelo por densitometria dos perfis electroforéticos, obtidos em geles HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20, e com outro gel disponível comercialmente.

A correlação entre as duas técnicas foi analisada por regressão linear e outros métodos estatísticos (média e coeficiente de regressão linear). Os parâmetros de correlação entre os 2 sistemas de análise ($y = \text{HYDRAGEL HEMOGLOBIN(E) K20}$) estão apresentados no quadro seguinte:

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO	INTERSECÇÃO EM Y	DECLIVE	GAMA DE VALORES % (sistema SEBIA)
0,973	-0,344	0,963	1,5 – 5,7

BIBLIOGRAFIA

1. Fairbanks V.F., ed. (1980) Hemoglobinopathies and thalassemia: Laboratory methods and case studies. Brian C. Decker, New York.
2. Galacteros F. (1986) Thalassémie, drépanocytose et autres hémoglobinopathies. *Techniques et Biologie*, 3, 174-178.
3. Huisman T.H.J. and Jonxis J.H.P (1977) The hemoglobinopathies: techniques of identification. Marcel Dekker, New York.
4. Krauss J.S., Drew P.A., Jonah M.H., Trinh M., Shell S., Black L. and Baisden C.R. (1986) Densitometry and microchromatography compared for determination of the hemoglobin C and A₂ proportions in hemoglobin C and hemoglobin SC disease and in hemoglobin C trait. *Clin. Chem.* 32, 5, 860-863.
5. Livingstone C. (1986) The hemoglobinopathies. Edit. London.
6. Maier-Redelsberger M., Girot R. (1989) Diagnostic biologique des maladies de l'hémoglobine. *Feuillets de biologie*, 170.
7. Schneider R.G. (1978) Methods for detection of hemoglobin variants and hemoglobinopathies in the routine clinical laboratory. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 9, 243-271.
8. Vovan L., Lara-Russo D., Orsini A. (1985) Diagnostic biologique des hémoglobinoses. *Ann. Pédiat.* 32, 9, 780-789.
9. Wendling A. Procédures de diagnostic ou de dépistage : Justification et validité d'un test de diagnostic ou de dépistage-sensibilité-spécificité. *Impact-Internat*, 1986 ; Sept : 93-97.

SCHÉMAS / FIGURES

Figure 1

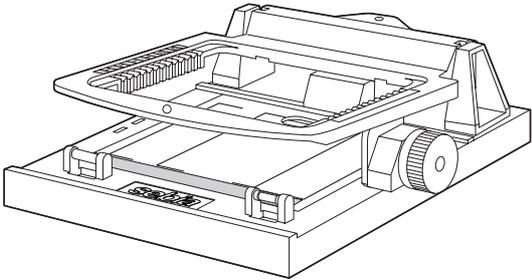


Figure 2

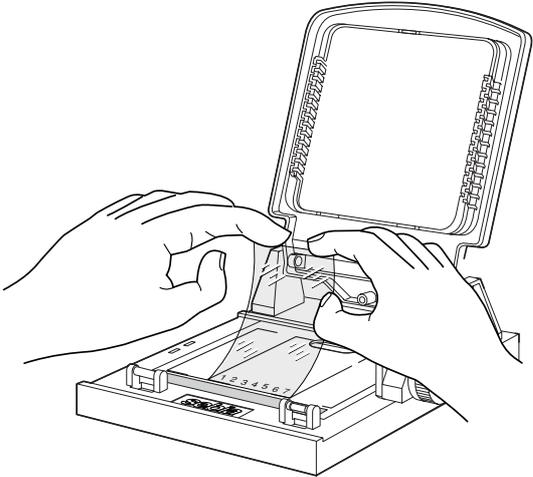


Figure 3

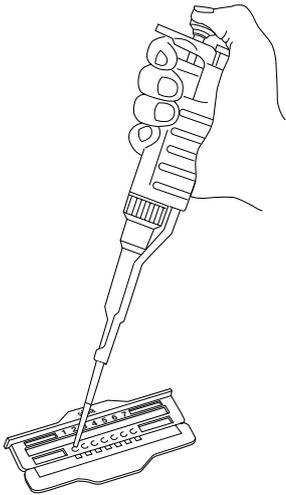
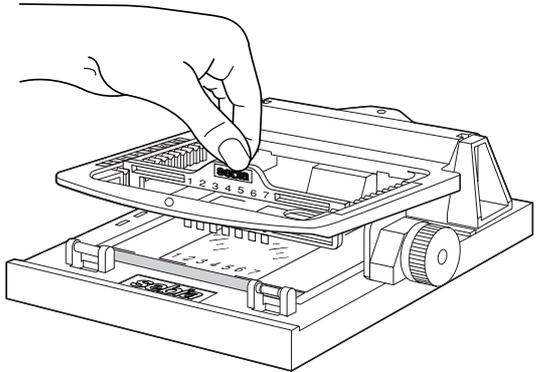


Figure 4



sebia

Parc Technologique Léonard de Vinci
Rue Léonard de Vinci
CP 8010 Lisses
91008 EVRY CEDEX - FRANCE



sebia Benelux s.a. / n.v.

Rue de la Fusée, 62
Raketstraat, 62
1130 Bruxelles / Brussel
BELGIQUE / BELGIË

sebia GmbH

Michael Henkel Straße 4-6
36043 Fulda
DEUTSCHLAND

sebia Hispania s.a.

C/Sicilia, 394
08025 Barcelona
ESPAÑA

sebia Italia s.r.l.

Via Antonio Meucci, 15/a
Località Ponte a Ema
50012 Bagno a Ripoli, Firenze
ITALIA

sebia Inc.

400-1705 Corporate Drive
Norcross, Georgia 30093
U.S.A.