

Instructions for Use

Fetal Hemoglobin Kit

Procedure No. 285



Intended Use

Fetal Hemoglobin reagents are intended for use as a general laboratory histochemical stain for the acid elution determination of fetal hemoglobin in blood smears. Fetal Hemoglobin stain reagents are for "In Vitro Diagnostic Use." For professional use only. This manual, semi-quantitative procedure detects fetal hemoglobin in erythrocytes of human blood smear specimens.

Advances in techniques for protein isolation and characterization led to the discovery that there are several distinguishing properties that make it possible to differentiate fetal from adult hemoglobin. Among these is the resistance of fetal hemoglobin (hemoglobin F) to acid elution. When blood smears are immersed in acid buffer, for example, adult hemoglobin is eluted from the erythrocytes, whereas fetal hemoglobin is not. If blood smears are treated in this manner and subsequently stained, erythrocytes having hemoglobin F will take up the stain, while those containing only adult hemoglobin appear as "ghosts".

The slide technique for demonstrating fetal hemoglobin in terms of its resistance to acid elution was originally proposed by Kleihauer et al.,¹ and later modified by Shepard et al.² The Sigma produced represents a further improvement in this approach as described by Oski and Naiman.³

It is becoming increasingly common in cases of Rh incompatibility to suppress immune reactions to red blood cells entering maternal circulation from the fetus. The amount of specific gamma globulin, containing anti Rh(D) to be administered, is calculated by assessing the magnitude of fetal-maternal hemorrhage.⁴

According to described technique, blood smears, which have been properly dried and fixed, are immersed in a citrate buffer pH 3.3 at 37 °C. Adult hemoglobin A (HbA) dissolves out of the cells, whereas fetal hemoglobin (HbF) which is acid resistant, remains intracellular and can be stained for microscopic examination.

Reagents

Citrate Phosphate Buffer Concentrate (Cat. No. 2851)

Sodium citrate, 0.7 mol/L, and sodium phosphate, 0.6 mol/L, chloroform added as preservative

Acid Hematoxylin Solution (Cat. No. 2852)

Hematoxylin, certified, 1 g/L, C.I. 75290, aluminum ammonium sulfate, sodium iodates and stabilizers, pH 3.3

Eosin B Solution (Cat. No. 2853)

Eosin B, 0.1%, aqueous solution, C.I. 45400. Sodium azide, 0.1%, added as preservative

Special Materials Required but Not Provided

- Microscope
- Microscopes slides, cover slips
- Staining rack/Coplin jars
- Water bath, 37 °C
- Ethanol Fixative (Cat. No. 2858) 80% v/v ethyl alcohol

Storage and Stability

Store Citrate Phosphate Buffer Concentrate in refrigerator (2-8 °C). Discard if there is evidence of microbial growth.

Store Citrate Phosphate Buffer Solution in refrigerator (2-8 °C). Stable for 2 weeks. Use a fresh aliquot each day. Discard if there is evidence of microbial growth.

Store Acid Hematoxylin Solution and Eosin B Solution at room temperature (18-26 °C). Solutions may be reused if they are stored in tightly sealed staining jars in subdued lights.

Ethanol Fixative should be stored at room temperature. Store tightly sealed and as a flammable liquid. Solution may be reused but should be discarded if fixation is not adequate.

Deterioration

Discard Acid Hematoxylin Solution when the time required for suitable staining exceeds 8 minutes.

Preparation

Citrate Phosphate Buffer Solution is prepared by diluting 1 volume of Citrate Phosphate Buffer Concentrate with 9 volumes of water.

Acid Hematoxylin Solution, Eosin B Solution and Ethanol Fixative are ready to use.

Precautions

These IVDs are intended for in vitro diagnostic use in a clinical laboratory environment. These IVDs are for professional use by qualified personnel only. Sigma-Aldrich IVDs may be operated by laboratory personnel who are trained to handle human specimens that can be infectious, use microscopes and other laboratory equipment and have color perception and visual acuity to distinguish colors and other objects under a microscope.

Normal precautions exercised in handling laboratory reagents should be followed. Dispose of waste observing all local, state, provincial or national regulations.

Procedure

Specimen Collection

All samples must be clearly labeled. Suitable instruments must be used for obtaining and preparing samples. Follow manufacturer's instructions for use.

No known test method can offer complete assurance that blood samples or tissue will not transmit infection. Therefore, all blood derivatives or tissue specimens should be considered potentially infectious.

Either capillary or venous blood may be used. Capillary blood may be transferred directly to a clean microscope slide. Venous blood should be added to a tube containing EDTA or oxalate. For convenience, use 1-2 drops of 2% EDTA Solution (Cat. No. 2854) per mL of blood (1 drop = 1 mg). Although blood-EDTA mixtures have been reported to be satisfactory for use up to 2 weeks when refrigerated.² Smears should be prepared within 24 hours from blood collected in oxalate.⁵ Using samples from the newborn, it is recommended that the blood be diluted with 0.85% saline, since such specimens have a high content of HbF. Blood smears are not stable and must be tested immediately after preparation.

Notes

For quality control purposes, it is recommended that blood from a normal adult (HbA) and from a newborn or infant (HbF) be included in each series of tests. Barr and Shafer⁶ report that fixed positive control slides from cord blood in EDTA can be preserved up to 1 year at -20 °C, in a sealed cardboard box. However, EDTA negative controls do not elute completely after being stored for more than 2 months at -20 °C. These investigators suggest preparing positive and negative smears on the same slide; thus, providing clear and rapid contrasts as reference in reading test slides.

Normal Ranges⁷

Age	Fetal Hemoglobin (%)
At Birth	50-90
< 2 years	0-4
> 2 years	0-2

Procedure

1. Citrate Phosphate Buffer Solution should be warmed to 37 °C in a Coplin jar or staining dish.
2. Using clean, labeled microscope slides, make thin blood smears. Prepare CONTROL slides using positive HbF blood (cord-blood) and normal adult blood. Air dry approximately 10 minutes.
3. Fix slides by immersing in Ethanol Fixative for 5 minutes, rinse thoroughly with tap water and air dry.
4. Immerse TEST and CONTROL slides in pre-warmed Citrate Phosphate Buffer Solution at 37 °C for 5 minutes. Agitate after 1 and 3 minutes of immersion. Degree of agitation may be varied to achieve most desirable results. Rinse thoroughly with distilled water and air dry **completely** to avoid staining artifacts.
5. Stain the slides for 3 minutes in Acid Hematoxylin Solution. Rinse slides thoroughly with distilled water and shake off excess water.
6. Counterstain slides for 4 minutes in 0.1% Eosin B Solution. Rinse thoroughly with distilled water and air dry.
7. Place **dry** coverslip on slide and examine using oil immersion (1000X). The absence of HbF is evident by the presence of ghost cells while retained HbF causes cells to appear bright red. Do **not** apply oil directly to slide. (**Note:** The 400X magnification may be used, but the resulting larger field may be more difficult to count.)

Performance Characteristics

The proportion of erythrocytes containing fetal hemoglobin may be estimated several ways. When studying maternal blood evidence of HbF-containing cells, Oski and Naiman³ recommended the following:

1. Count total number of erythrocytes in 5 fields and determine the average number per field.
2. Count the number of deeply stained HbF-containing erythrocytes in about 30 fields and determine the average number per field.
3. Calculate percentage of HbF erythrocytes on the bases of the total number of erythrocytes per field.

Results are reported as the percent HbF present.

According to Oski and Naiman³ this method is capable of detecting as little as 0.1 mL of fetal blood in maternal circulation.

If observed results vary from expected results, please contact Sigma-Aldrich Technical Service for assistance.

Analytical Performance Characteristics

The analytical performance results for the given tests conducted on all target structures, confirm 100% sensitivity, specificity, and repeatability.

Cat. No	Product Description	Target	Intra-assay Specificity	Intra-assay Sensitivity	Inter-assay Specificity	Inter-assay Sensitivity
2851	Citrate Phosphate Buffer Concentrate	Fetal Hemaglobin	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
2852	Acid Hematoxylin Solution	Nuclei	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3
2853	Eosin B Solution	Fetal Hemaglobin	3 of 3	3 of 3	3 of 3	3 of 3

Warnings and Hazards

Refer to Safety Data Sheet and product labeling for any updated risk, hazard or safety information.

285C:



H319 Causes serious eye irritation.

H331 Toxic if inhaled. Precautionary statement(s)

P261 Avoid breathing mist or vapors.

P264 Wash skin thoroughly after handling.

P271 Use only outdoors or in a well-ventilated area.

P280 Wear eye protection/ face protection.

P304 + P340 + P311 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Call a POISON CENTER/ doctor.

P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

285D:



H319 Causes serious eye irritation.

H331 Toxic if inhaled. Precautionary statement(s)

P261 Avoid breathing mist or vapors.

P264 Wash skin thoroughly after handling.

P271 Use only outdoors or in a well-ventilated area.

P280 Wear eye protection/ face protection.

P304 + P340 + P311 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Call a POISON CENTER/ doctor.

P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

If during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorized representative and to your national authority.

Symbol Definitions

Symbols as defined in EN ISO 15223-1:2021

	Manufacturer		Catalogue Number
	Consult Instructions for Use		Batch Code
	Authorized Representative in the European Community/ European Union		European Union Declaration of Conformity (defined in IVDR 2017/746)
	Use-by Date		In vitro diagnostic medical device
	Temperature Limit		Caution
	Date of Manufacture		Importer
	Indicates the Authorised Representative in Switzerland		

References

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutaussstrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.
- Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512

Contact Information

To place an order, please visit our web site at SigmaAldrich.com. For Technical Service, please visit the tech service page on our web site at SigmaAldrich.com/techservice.

Revision History

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023
Transferred to new template with current branding. Specified for professional use in intended use and precautions. Revised intended use to align with IVDR guidelines. Updated Material Safety Data Sheet to Safety Data Sheet. Updated contact information. Removed instruction to follow CLSI for specimen collection. Removed EN 980 and changed to EN ISO 15223-1:2021 for symbols. Added adverse event contact information. Updated literature references. Added a revision history table. Added Warnings and Hazards. Added CH-REP information.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

The Initial M and Sigma-Aldrich are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Anweisungen für den Gebrauch

Fetales Hämoglobin – Kit

Verfahren Nr. 285



Verwendungszweck

Die Reagenzien mit fetalem Hämoglobin sind als allgemeines histochemisches Färbemittel für den Laborgebrauch zur Bestimmung von fetalem Hämoglobin in Blutausstrichen mit saurer Elution bestimmt. Die Reagenzien zur Färbung von fetalem Hämoglobin sind für die „In-vitro-Diagnose“ bestimmt. Nur für den professionellen Gebrauch. Dieses manuelle, semiquantitative Verfahren dient dem Nachweis von fetalem Hämoglobin in Erythrozyten von menschlichen Blutausschrichtpräparaten.

Fortschritte bei den Techniken zur Isolierung und Charakterisierung von Proteinen führten zu der Entdeckung, dass es mehrere Unterscheidungsmerkmale gibt, die es ermöglichen, fetales von adultem Hämoglobin zu unterscheiden. Dazu gehört die Resistenz von fetalem Hämoglobin (Hämoglobin F) gegenüber saurer Elution. Werden Blutausschrichte beispielsweise in einen sauren Pufferlösung getaucht, löst sich das adulte Hämoglobin aus den Erythrozyten, das fetale Hämoglobin hingegen nicht. Wenn Blutausschrichte auf diese Weise behandelt und anschließend gefärbt werden, nehmen die Erythrozyten mit Hämoglobin F die Färbung an. Erythrozyten, die nur erwachsenes Hämoglobin enthalten, präsentieren sich dagegen als „Geisterzellen“.

Das Objektträgerverfahren zum Nachweis von fetalem Hämoglobin aufgrund seiner Resistenz gegenüber einer sauren Elution wurde ursprünglich von Kleihauer et al.¹ beschrieben und später von Shepard et al.² modifiziert. Das erzeugte Sigma stellt eine weitere Verbesserung dieses Ansatzes dar, wie von Oski und Naiman beschrieben.³

In Fällen einer Rhesus-Inkompatibilität kommt es immer häufiger zu einer Unterdrückung der Immunreaktionen auf die vom Fötus in den mütterlichen Blutkreislauf übergehenden roten Blutkörperchen. Die Menge des zu verabreichenden spezifischen Anti-Rh(D) enthaltenden Gammaglobulins wird unter Berücksichtigung des Ausmaßes der fetal-mütterlichen Blutung berechnet.⁴

Bei dem beschriebenen Verfahren werden die zuvor ordnungsgemäß getrockneten und fixierten Blutausschrichte bei 37 °C in einen Citratpuffer mit einem pH-Wert von 3,3 getaucht. Erwachsenes Hämoglobin A (HbA) löst sich aus den Zellen heraus, während das säureresistente fetale Hämoglobin (HbF) im Zellinneren verbleibt und für mikroskopische Untersuchungen angefärbt werden kann.

Reagenzien

Citrat-Phosphat-Puffer-Konzentrat (Kat.-Nr. 2851)

Natriumcitrat, 0,7 mol/l, und Natriumphosphat, 0,6 mol/l, mit Zusatz von Chloroform als Konservierungsmittel

Saure Hämatoxylin-Lösung (Kat.-Nr. 2852)

Hämatoxylin, zertifiziert, 1 g/l, C.I. 75290, Aluminiumammoniumsulfat, Natriumiodate und Stabilisatoren, pH-Wert 3,3

Eosin B-Lösung (Kat.-Nr. 2853)

Eosin B, 0,1 %, wässrige Lösung, C.I. 45400. Natriumazid, 0,1 %, zugesetzt als Konservierungsmittel

Spezielle Materialien, die erforderlich sind, aber nicht zur Verfügung gestellt werden

- Mikroskop
- Objektträger, Deckgläser
- Färbegestell/Coplin-Färbetröge
- Wasserbad, 37 °C
- Ethanol-Fixiermittel (Kat.-Nr. 2858) 80 % v/v Ethylalkohol

Lagerung und Stabilität

Das Citrat-Phosphat-Pufferkonzentrat im Kühlschrank aufbewahren (2–8 °C). Bei Anzeichen eines mikrobiellen Befalls entsorgen.

Die Citrat-Phosphat-Pufferlösung im Kühlschrank aufbewahren (2–8 °C). Stabil für 2 Wochen. Jeden Tag ein frisches Aliquot verwenden. Bei Anzeichen eines mikrobiellen Befalls entsorgen.

Die saure Hämatoxylin-Lösung und die Eosin B-Lösung bei Raumtemperatur lagern (18–26 °C). Die Lösungen können wiederverwendet werden, wenn sie in dicht verschlossenen Färbetrögen und nur schwachem Licht aufbewahrt werden.

Das Ethanol-Fixiermittel ist bei Raumtemperatur zu lagern. Dicht verschlossen und wie eine entzündliche Flüssigkeit lagern. Die Lösung kann wiederverwendet werden, sollte aber bei einer unzureichenden Fixierung entsorgt werden.

Zerfall

Die saure Hämatoxylin-Lösung muss entsorgt werden, wenn die für eine angemessene Färbung benötigte Zeit 8 Minuten übersteigt.

Vorbereitung

Die Citrat-Phosphat-Pufferlösung wird durch Verdünnen von 1 Volumen Citrat-Phosphat-Pufferkonzentrat mit 9 Volumen Wasser hergestellt.

Die saure Hämatoxylin-Lösung, die Eosin B-Lösung und das Ethanol-Fixiermittel sind gebrauchsfertig.

Vorsichtsmaßnahmen

Diese IVDs sind für die In-vitro-Diagnostik in einer klinischen Laborumgebung bestimmt. Diese IVDs sind nur für den professionellen Gebrauch durch qualifiziertes Personal bestimmt. Die IVDs von Sigma-Aldrich können von Laborpersonal bedient werden, das im Umgang mit menschlichen Proben, die infektiös sein können, geschult ist, Mikroskope und andere Laborgeräte bedienen kann und über eine Farbwahrnehmung und Sehschärfe verfügt, um Farben und andere Objekte unter dem Mikroskop zu unterscheiden.

Beim Umgang mit Laborreagenzien sind die üblichen Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Entsorgen Sie den Abfall unter Einhaltung aller örtlichen, staatlichen, regionalen oder nationalen Vorschriften.

Verfahren

Probenentnahme

Alle Proben müssen eindeutig beschriftet sein. Zur Gewinnung und Aufbereitung der Proben sind geeignete Instrumente zu verwenden. Beachten Sie die Gebrauchsanweisung des Herstellers.

Keine bekannte Testmethode kann vollständige Sicherheit bieten, dass Blutproben oder Gewebe keine Infektion übertragen. Daher sollten alle Blutderivate oder Gewebeproben als potenziell infektiös betrachtet werden.

Es kann sowohl Kapillar- als auch venöses Blut verwendet werden. Kapillarblut kann direkt auf einen sauberen Objektträger aufgetragen werden. Venöses Blut zuvor sollte in ein mit EDTA oder Oxalat präpariertes Röhrchen gegeben werden. Zur Vereinfachung können 1–2 Tropfen 2%ige EDTA-Lösung (Kat.-Nr. 2854) pro ml Blut verwendet werden (1 Tropfen = 1 mg). Berichten zufolge können Blut-EDTA-Mischungen bis zu 2 Wochen lang verwendet werden, wenn sie gekühlt gelagert werden.² Abstriche sollten innerhalb von 24 Stunden von mit Oxalat entnommenem Blut hergestellt werden.³ Bei Proben von Neugeborenen wird eine Verdünnung des Blutes mit 0,85%iger Kochsalzlösung empfohlen, da diese Proben einen hohen Gehalt an HbF aufweisen. Blutausschrichte sind nicht stabil und müssen sofort nach der Herstellung untersucht werden.

Anmerkungen

Zur Qualitätskontrolle empfiehlt sich die gleichzeitige Verwendung von Blut eines gesunden Erwachsenen (HbA) und eines Neugeborenen oder Säuglings (HbF) in jeder Testreihe. Barr und Shafer⁵ berichten, dass fixierte Positivkontroll-Objektträger aus Nabelschnurblut in EDTA bis zu 1 Jahr bei –20 °C in einem verschlossenen Behälter aus Karton aufbewahrt werden können. EDTA-Negativkontrollen lassen sich jedoch nach einer Lagerung von mehr als 2 Monaten bei –20 °C nicht mehr vollständig eluieren. Sie empfehlen, positive und negative Ausstriche auf demselben Objektträger zu präparieren, um so beim Ablesen der Testobjektträger einen deutlichen und schnellen Vergleich zu ermöglichen.

Normalbereiche⁷

Alter	Fetales Hämoglobin (%)
Bei Geburt	50-90
< 2 Jahre	0-4
> 2 Jahre	0-2

Verfahren

1. Die Citrat-Phosphat-Pufferlösung sollte in einem Coplin-Färbetrog oder einer Färbeschale auf 37 °C erwärmt werden.
2. Mit sauberen, beschrifteten Objektträgern dünne Blutausschrichte anfertigen. KONTROLL-Objektträger mit positivem HbF-Blut (Nabelschnurblut) und normalem Erwachsenenblut anfertigen. Etwa 10 Minuten an der Luft trocknen lassen.
3. Objektträger 5 Minuten lang in Ethanol-Fixiermittel fixieren, gründlich mit Leitungswasser abspülen und an der Luft trocknen.
4. TEST- und KONTROLL-Objektträger 5 Minuten lang in die auf 37 °C vorgewärmte Citrat-Phosphat-Pufferlösung eintauchen. Nach 1 und 3 Minuten Tauchzeit bewegen. Das Ausmaß der Bewegung kann variiert werden, um die gewünschten Ergebnisse zu erzielen. Mit destilliertem Wasser gründlich abspülen und an der Luft **vollständig** trocknen lassen, um eine Färbung von Artefakten zu vermeiden.
5. Die Objektträger 3 Minuten lang in saurer Hämatoxylin-Lösung einfärben. Die Objektträger gründlich mit destilliertem Wasser abspülen und das überschüssige Wasser abschütteln.
6. Die Objektträger 4 Minuten lang in 0,1%iger Eosin B-Lösung gegenfärben. Gründlich mit destilliertem Wasser abspülen und an der Luft trocknen lassen.
7. Ein **trockenes** Deckglas auf den Objektträger legen und mit einer Ölmersion (1000-fache Vergrößerung) untersuchen. Das Fehlen von HbF zeigt sich durch das Vorhandensein von Geisterzellen. Bei erhaltenem HbF erscheinen die Zellen hellrot. Das Öl **nicht** direkt auf den Objektträger auftragen. (**Hinweis:** Es kann auch eine 400-fache Vergrößerung verwendet werden, allerdings ist das daraus resultierende größere Feld unter Umständen schwieriger zu zählen).

Leistungsmerkmale

Der Anteil der fetalen Hämoglobin enthaltenden Erythrozyten kann auf verschiedene Weise geschätzt werden. Bei der Untersuchung von mütterlichem Blut, in dem HbF-haltige Zellen nachgewiesen wurden, schlugen Oski und Naiman³ Folgendes vor:

1. Die Gesamtzahl der Erythrozyten in 5 Feldern zählen und die durchschnittliche Anzahl pro Feld bestimmen.
2. Die Anzahl der intensiv gefärbten HbF-haltigen Erythrozyten in etwa 30 Feldern zählen und die durchschnittliche Anzahl pro Feld bestimmen.
3. Den Prozentsatz der HbF-Erythrozyten auf der Grundlage der Gesamtzahl der Erythrozyten pro Feld berechnen.

Die Ergebnisse werden als Prozentsatz des vorhandenen HbF angegeben.

Laut Oski und Naiman³ kann mit dieser Methode bereits eine Menge von 0,1 ml fetalen Blutes im mütterlichen Kreislauf nachgewiesen werden.

Wenn die beobachteten Ergebnisse von den erwarteten Ergebnissen abweichen, wenden Sie sich bitte an den Technischen Service von Sigma-Aldrich, um Unterstützung zu erhalten.

Analytische Leistungsmerkmale

Die Ergebnisse der analytischen Leistung für die gegebenen Tests, die für alle Zielstrukturen durchgeführt wurden, bestätigen eine 100%ige Sensitivität, Spezifität und Wiederholbarkeit.

Kat.-Nr.	Beschreibung des Produkts	Ziel	Intra-Assay-Spezifität	Intra-Assay-Empfindlichkeit	Inter-Assay-Spezifität	Inter-Assay-Empfindlichkeit
2851	Citrat-Phosphat-Puffer-Konzentrat	Fetales Hämoglobin	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
2852	Saure Hämatoxylin-Lösung	Kerne	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3
2853	Eosin B-Lösung	Fetales Hämoglobin	3 von 3	3 von 3	3 von 3	3 von 3

Warnungen und Gefahren

Aktuelle Risiko-, Gefahren- und Sicherheitsinformationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt und auf der Produktkennzeichnung.

285C:



- H319 Verursacht schwere Augenreizungen.
- H331 Giftig beim Einatmen. Sicherheitshinweis(e)
- P261 Einatmen von Nebel oder Dampf vermeiden.
- P264 Nach der Handhabung die Haut gründlich waschen.
- P271 Nur im Freien oder an einem gut belüfteten Ort verwenden.
- P280 Tragen Sie einen Augenschutz/Gesichtsschutz.
- P304 + P340 + P311 BEIM EINATMEN: Bringen Sie die Person an die frische Luft und sorgen Sie dafür, dass sie bequem atmen kann. Rufen Sie eine GIFTNOTRUFZENTRALE oder einen Arzt an.
- P305 + P351 + P338 BEI AUGENKONTAKT: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Entfernen Sie Kontaktlinsen, falls vorhanden und leicht durchzuführen. Weiter abspülen.

285D:



- H319 Verursacht schwere Augenreizungen.
- H331 Giftig beim Einatmen. Sicherheitshinweis(e).
- P261 Einatmen von Nebel oder Dampf vermeiden.
- P264 Nach der Handhabung die Haut gründlich waschen.
- P271 Nur im Freien oder an einem gut belüfteten Ort verwenden.
- P280 Tragen Sie einen Augenschutz/Gesichtsschutz.
- P304 + P340 + P311 BEIM EINATMEN: Bringen Sie die Person an die frische Luft und sorgen Sie dafür, dass sie bequem atmen kann. Rufen Sie eine GIFTNOTRUFZENTRALE oder einen Arzt an.
- P305 + P351 + P338 BEI AUGENKONTAKT: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Entfernen Sie Kontaktlinsen, falls vorhanden und leicht durchzuführen. Weiter abspülen.

Wenn während der Verwendung dieses Geräts oder als Folge seiner Verwendung ein schwerwiegender Zwischenfall eingetreten ist, melden Sie dies bitte dem Hersteller und/oder seinem bevollmächtigten Vertreter sowie Ihrer nationalen Behörde.

Symbol-Definitionen

Symbole gemäß der Definition in EN ISO 15223-1:2021

	Hersteller		Katalognummer
	Anweisungen für den Gebrauch beachten		Chargencode
	Bevollmächtigter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft/ Europäischen Union		Konformitätserklärung der Europäischen Union (definiert in IVDR 2017/746)
	Verfallsdatum		Medizinisches In-vitro-Diagnosegerät
	Temperatur-Grenzwert		Vorsicht
	Datum der Herstellung		Importeur
	Weist auf den bevollmächtigten Vertreter in der Schweiz hin		

Referenzen

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.
- Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512

Kontaktinformationen

Um eine Bestellung aufzugeben, besuchen Sie bitte unsere Website unter [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaldrich.com). Für den technischen Service besuchen Sie bitte die technische Service-Seite auf unserer Website unter [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaldrich.com/techservice).

Revisionshistorie

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023

Die neue Vorlage mit aktuellem Branding wurde angewandt. In Verwendungszweck und Vorsichtsmaßnahmen wurde die Nennung der gewerblichen Verwendung hinzugefügt. Überarbeitung des Verwendungszwecks zur Angleichung an die IVDR-Richtlinien. Materialsicherheitsdatenblatt wurde in Sicherheitsdatenblatt geändert. Kontaktinformationen wurden aktualisiert. Die Anweisung, CLSI für die Probenentnahme zu befolgen, wurde entfernt. EN 980 wurde gestrichen und in EN ISO 15223-1:2021 für Symbole geändert. Kontaktinformationen für unerwünschte Ereignisse wurden hinzugefügt. Literaturhinweise wurden aktualisiert. Eine Tabelle zur Revisionshistorie wurde hinzugefügt. Warnungen und Gefahren hinzugefügt. CH-REP-Informationen wurden hinzugefügt.

Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany

Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Die Initiale M und Sigma-Aldrich sind Marken der Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland oder ihrer Tochtergesellschaften. Alle anderen Marken sind das Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber. Ausführliche Informationen über Marken sind über öffentlich zugängliche Quellen erhältlich.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Mode d'emploi

Kit d'hémoglobine foetale

Procédure n° 285



Utilisation prévue

Les réactifs pour l'hémoglobine foetale sont destinés à être utilisés comme colorant histochimique de laboratoire général pour la détermination par élution acide de l'hémoglobine foetale dans les frottis sanguins. Les réactifs pour la coloration de l'hémoglobine foetale sont destinés à un « usage en diagnostic *in vitro* ». Réservez à un usage professionnel. Cette procédure semi-quantitative manuelle permet de détecter l'hémoglobine foetale dans les érythrocytes des échantillons de frottis sanguins humains.

Les progrès réalisés en matière de techniques d'isolement et de caractérisation des protéines ont conduit à la mise en évidence de plusieurs propriétés caractéristiques permettant de différencier l'hémoglobine foetale de l'hémoglobine adulte. Parmi celles-ci figure la résistance de l'hémoglobine foetale (hémoglobine F) à l'élution acide. Par exemple, lorsque des frottis sanguins sont immergés dans un tampon acide, l'hémoglobine adulte est éluée des érythrocytes, alors que l'hémoglobine foetale ne l'est pas. Si les frottis sanguins sont traités de cette manière et ensuite colorés, les érythrocytes contenant de l'hémoglobine foetale vont se colorer, tandis que ceux qui ne contiennent que de l'hémoglobine adulte apparaissent comme des « fantômes ».

La technique sur lames pour mettre en évidence l'hémoglobine foetale en termes de sa résistance à l'élution acide a été proposée à l'origine par Kleihauer et al.,¹ puis elle a plus tard été modifiée par Shepard et al.² Le produit de Sigma constitue une nouvelle amélioration de cette approche comme décrit par Oski et Naiman.³

En cas d'incompatibilité rhésus, il est de plus en plus fréquent de supprimer les réactions immunitaires du fœtus contre les globules rouges qui entrent dans la circulation maternelle. La quantité de gammaglobulines spécifiques, contenant l'anti-Rh(D) à administrer, est calculée en évaluant l'importance de l'hémorragie fœto-maternelle.⁴

Selon la technique décrite, les frottis sanguins, qui ont été correctement séchés et fixés, sont immergés dans un tampon citrate de pH 3,3 à 37 °C. L'hémoglobine A adulte (HbA) est éluée hors des cellules, tandis que l'hémoglobine foetale (HbF), qui est acido-résistante, reste dans les cellules et peut être colorée en vue d'être examinée au microscope.

Réactifs

Tampon citrate-phosphate concentré (réf. 2851)

Citrate de sodium, 0,7 mol/l, et phosphate de sodium, 0,6 mol/l, chloroforme ajouté comme conservateur.

Solution d'hématoxyline acide (réf. 2852)

Hématoxyline, certifiée, 1 g/l, C.I. 75290, sulfate d'ammonium et d'aluminium, iodates de sodium et stabilisateurs, pH 3,3.

Solution d'éosine B (réf. 2853)

Éosine B, 0,1 %, solution aqueuse, C.I. 45400. Azoture de sodium, 0,1 %, ajouté comme conservateur.

Matériel spécial requis mais non fourni

- Microscope
- Lames de microscope, lamelles couvre-objet
- Portoir de coloration/cuves à coloration de Coplin
- Bain-marie, 37 °C
- Fixateur à base d'éthanol (réf. 2858), alcool éthylique à 80 % v/v

Conservation et stabilité

Conserver le tampon citrate-phosphate concentré au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). Jeter si une croissance microbienne est observée.

Conserver la solution de tampon citrate-phosphate au réfrigérateur (entre 2 et 8 °C). Stable pendant 2 semaines. Utiliser une nouvelle aliquote tous les jours. Jeter si une croissance microbienne est observée.

Conserver la solution d'hématoxyline acide et la solution d'éosine B à température ambiante (entre 18 et 26 °C). Les solutions peuvent être réutilisées si elles sont conservées dans des cuves à coloration hermétiquement fermées, à l'abri de la lumière.

Le fixateur à base d'éthanol doit être conservé à température ambiante. Le conserver fermé hermétiquement et comme s'il s'agissait d'un liquide inflammable. La solution peut être réutilisée, mais elle doit être jetée si la fixation n'est pas adéquate.

Détérioration

Jeter la solution d'hématoxyline acide lorsque le temps nécessaire pour obtenir une coloration adéquate dépasse 8 minutes.

Préparation

La solution de tampon citrate-phosphate est préparée en diluant 1 volume de tampon citrate-phosphate concentré avec 9 volumes d'eau.

La solution d'hématoxyline acide, la solution d'éosine B et le fixateur à base d'éthanol sont prêts à l'emploi.

Précautions

Ces dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* sont destinés à être utilisés en diagnostic *in vitro* au sein de laboratoires de biologie médicale. Ces dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* sont destinés à un usage professionnel par un personnel qualifié uniquement. Les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* de Sigma-Aldrich peuvent être utilisés par le personnel de laboratoire formé à la manipulation d'échantillons humains potentiellement infectieux, à l'utilisation de microscopes et d'autres équipements de laboratoire et possédant une perception des couleurs et une acuité visuelle permettant de distinguer les couleurs ainsi que les autres objets au microscope.

Suivre les précautions habituelles lors de la manipulation de réactifs de laboratoire. Éliminer les déchets en respectant toutes les réglementations locales et nationales.

Procédure

Prélèvement des échantillons

Tous les échantillons doivent être clairement étiquetés. Des instruments appropriés doivent être utilisés pour obtenir et préparer les échantillons. Suivre les instructions d'utilisation des fabricants.

Aucune méthode de test connue ne peut totalement garantir que les échantillons de sang ou de tissus ne transmettront pas d'infection. Par conséquent, tous les produits sanguins ou échantillons de tissus doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Il est possible d'utiliser du sang capillaire ou veineux. Le sang capillaire peut être transféré directement sur une lame de microscope propre. Le sang veineux doit être ajouté à un tube contenant de l'EDTA ou de l'oxalate. Pour plus de commodité, utiliser 1 à 2 gouttes de solution d'EDTA à 2 % (réf. 2854) par ml de sang (1 goutte = 1 mg). Bien que l'utilisation des mélanges sang-EDTA se soit révélée satisfaisante jusqu'à 2 semaines lorsque ces mélanges sont réfrigérés,² les frottis doivent être préparés dans les 24 heures suivant le prélèvement de sang dans de l'oxalate.⁵ Avec les échantillons provenant de nouveau-nés, il est recommandé de diluer le sang avec une solution saline à 0,85 %, car ces échantillons contiennent une concentration élevée en HbF. Les frottis sanguins ne sont pas stables et doivent être testés immédiatement après leur préparation.

Remarques

À des fins de contrôle qualité, il est recommandé d'inclure dans chaque série de tests le sang d'un adulte en bonne santé (HbA) ainsi que celui d'un nouveau-né ou d'un nourrisson (HbF). Barr et Shafer⁶ rapportent que les lames de contrôles positifs fixées provenant de sang de cordon prélevé dans de l'EDTA peuvent être conservées jusqu'à 1 an à -20 °C, dans une boîte en carton hermétique. Toutefois, les contrôles négatifs prélevés dans de l'EDTA ne s'éluent pas complètement après avoir été conservés pendant plus de 2 mois à -20 °C. Ces chercheurs suggèrent de préparer des frottis positifs et négatifs sur la même lame, ce qui permet d'obtenir des contrastes clairs et rapides comme référence pour la lecture des lames à tester.

Plages normales ⁷	
Âge	Hémoglobine foetale (%)
À la naissance	50-90
< 2 ans	0-4
> 2 ans	0-2

Procédure

1. La solution de tampon citrate-phosphate doit être chauffée à 37 °C dans une cuve à coloration de Coplin ou une cuve à coloration standard.
2. En utilisant des lames de microscope propres et étiquetées, réaliser des frottis sanguins fins. Préparer des lames de CONTRÔLE avec du sang contenant de l'HbF (sang de cordon) et du sang provenant d'un adulte en bonne santé. Laisser sécher à l'air libre pendant 10 minutes environ.
3. Fixer les lames en les immergeant dans le fixateur à base d'éthanol pendant 5 minutes, les rincer soigneusement sous l'eau du robinet puis les laisser sécher à l'air libre.
4. Immerger les lames À TESTER et les lames de CONTRÔLE dans une solution de tampon citrate-phosphate préchauffée à 37 °C pendant 5 minutes. Agiter après 1 et 3 minutes d'immersion. L'intensité de l'agitation peut varier en fonction des résultats souhaités. Rincer soigneusement à l'eau distillée et laisser sécher **complètement** à l'air libre pour éviter les artefacts de coloration.
5. Colorer les lames dans la solution d'hématoxyline acide pendant 3 minutes. Rincer soigneusement les lames à l'eau distillée et les secouer pour éliminer l'excès d'eau.
6. Contre-colorer les lames pendant 4 minutes dans la solution d'éosine B à 0,1 %. Rincer soigneusement à l'eau distillée et laisser sécher à l'air libre.
7. Placer une lamelle couvre-objet **sèche** sur chaque lame, puis examiner les lames au microscope avec un objectif à immersion (1000x). L'absence d'HbF est mise en évidence par la présence de cellules fantômes, tandis que l'HbF retenue fait apparaître les cellules en rouge vif. **Ne pas** appliquer l'huile à immersion directement sur la lame. (**Remarque** : le grossissement 400x peut être utilisé, mais le champ plus large qui en résulte peut rendre le comptage plus difficile.)

Caractéristiques de performance

La proportion d'érythrocytes contenant de l'hémoglobine foetale peut être estimée de plusieurs façons. Lorsqu'ils ont étudié la mise en évidence des cellules contenant de l'HbF dans le sang maternel, les recommandations de Oski et Naiman³ étaient les suivantes :

1. Compter le nombre total d'érythrocytes dans 5 champs, puis déterminer leur nombre moyen par champ.
2. Compter le nombre d'érythrocytes contenant de l'HbF fortement colorés dans environ 30 champs, puis déterminer leur nombre moyen par champ.
3. Calculer le pourcentage d'érythrocytes contenant de l'HbF d'après le nombre total d'érythrocytes par champ.

Les résultats sont rapportés en pourcentage d'HbF présente.

Selon Oski et Naiman³, cette méthode est capable de détecter au minimum 0,1 ml de sang fœtal dans la circulation sanguine maternelle.

Si les résultats observés diffèrent des résultats attendus, contacter le service technique de Sigma-Aldrich pour obtenir de l'aide.

Caractéristiques de performance analytique

Les résultats des performances analytiques pour les tests concernés effectués sur toutes les structures cibles confirment une sensibilité, une spécificité et une répétabilité de 100 %.

Réf.	Description du produit	Cible	Spécificité intra-série	Sensibilité intra-série	Spécificité inter-séries	Sensibilité inter-séries
2851	Tampon citrate-phosphate concentré	Hémoglobine foetale	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
2852	Solution d'hématoxyline acide	Noyaux	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3
2853	Solution d'éosine B	Hémoglobine foetale	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3	3 sur 3

Avertissements et risques

Se reporter à la fiche de données de sécurité et à l'étiquetage du produit pour obtenir des informations mises à jour concernant les risques, les dangers et la sécurité.

285C :



H319 Provoque une sévère irritation des yeux.

H331 Toxique par inhalation. Mention(s) de danger.

P261 Éviter de respirer les brouillards ou les vapeurs.

P264 Se laver la peau soigneusement après manipulation.

P271 Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé.

P280 Porter un équipement de protection des yeux/du visage.

P304 + P340 + P311 EN CAS D'INHALATION : transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

285D :



H319 Provoque une sévère irritation des yeux.

H331 Toxique par inhalation. Mention(s) de danger.

P261 Éviter de respirer les brouillards ou les vapeurs.

P264 Se laver la peau soigneusement après manipulation.

P271 Utiliser seulement en plein air ou dans un endroit bien ventilé.

P280 Porter un équipement de protection des yeux/du visage.

P304 + P340 + P311 EN CAS D'INHALATION : transporter la personne à l'extérieur et la maintenir dans une position où elle peut confortablement respirer. Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

Si, au cours de l'utilisation de ce dispositif ou à la suite de son utilisation, un incident grave se produit, le signaler au fabricant et/ou à son représentant agréé ainsi qu'aux autorités nationales compétentes.

Définition des symboles

Symboles tels que définis dans la norme EN ISO 15223-1:2021

	Fabricant		Référence catalogue
	Consulter le mode d'emploi		Numéro du lot
	Représentant agréé dans la Communauté européenne/ l'Union européenne		Déclaration de conformité de l'Union européenne (définie dans le règlement 2017/746 relatif aux dispositifs médicaux de diagnostic <i>in vitro</i>)
	Date limite d'utilisation		Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Limites de température		Attention
	Date de fabrication		Importateur
	Indique le représentant agréé en Suisse		

Références

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.
- Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512

Coordonnées

Pour passer commande, consulter notre site Web à l'adresse [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Pour le service technique, consulter la page du service technique sur notre site Web à l'adresse [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Historique des révisions

Rév. 4.0	2014
Rév. 5.0	2016
Rév. 6.0	2023

Transfert vers un nouveau modèle avec l'image de marque actuelle. Précision de l'usage professionnel dans l'utilisation prévue et les précautions. Révision de l'utilisation prévue afin de l'aligner sur les recommandations de la réglementation relative aux dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*. Remplacement du texte « Material Safety Data Sheet » par « Safety Data Sheet » dans la version anglaise. Mise à jour des coordonnées. Suppression de l'instruction indiquant de suivre les normes et recommandations du CLSI pour le prélèvement des échantillons. Remplacement de la norme EN 980 par la norme EN ISO 15223-1:2021 pour les symboles. Ajout de coordonnées en cas d'événements indésirables. Mise à jour des références bibliographiques. Ajout d'un tableau d'historique des révisions. Ajout de la section relative aux avertissements et risques. Ajout des informations sur le représentant agréé en Suisse.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Le M majuscule et Sigma-Aldrich sont des marques de commerce de Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne ou de ses filiales. Toutes les autres marques sont la propriété de leurs détenteurs respectifs. Des informations détaillées sur les marques de commerce sont disponibles via des ressources accessibles au public.

Istruzioni per l'uso

Kit emoglobina fetale

Procedura n. 285



Uso previsto

I reagenti per l'emoglobina fetale sono destinati all'uso come colorante istochimico generale di laboratorio per la determinazione dell'eluizione acida dell'emoglobina fetale negli strisci ematici. I reagenti per la colorazione dell'emoglobina fetale sono destinati alla "diagnostica in vitro". Solo per uso professionale. Questa procedura semiquantitativa manuale rileva l'emoglobina fetale negli eritrociti contenuti in strisci di sangue umano.

I progressi nelle tecniche per l'isolamento e la caratterizzazione delle proteine hanno consentito di appurare che esistono diverse proprietà distintive che favoriscono la differenziazione tra emoglobina fetale e adulta. Una di queste è la resistenza dell'emoglobina fetale (emoglobina F) all'eluizione acida. Ad esempio, quando uno striscio ematico viene immerso in un tampone acido, l'emoglobina adulta subisce l'eluizione, mentre l'emoglobina fetale rimane intatta. Se gli strisci ematici vengono trattati in questo modo e successivamente colorati, gli eritrociti fetali assorbiranno il colorante, mentre quelli adulti appariranno come "fantasmi".

La tecnica di colorazione dei vetrini per dimostrare l'emoglobina fetale in termini di resistenza all'eluizione acida è stata originariamente proposta da Kleihauer et al.,¹ e successivamente modificata da Shepard et al.² Il prodotto di Sigma rappresenta un'ulteriore evoluzione di quest'approccio descritto da Oski e Naiman.³

Nei casi di incompatibilità Rh si diffonde sempre di più la tendenza a sopprimere le reazioni immunitarie ai globuli rossi che entrano nella circolazione materna dal feto. La quantità di gammaglobuline specifiche contenenti anti Rh(D) da somministrare si calcola valutando l'entità dell'emorragia materno-fetale.⁴

Secondo la tecnica descritta, gli strisci ematici, opportunamente essiccati e fissati, vengono immersi in un tampone citrato con pH 3,3 a 37 °C. L'emoglobina A adulta (HbA) viene eliminata dalle cellule, mentre l'emoglobina fetale (HbF), che è resistente agli acidi, rimane in sede intracellulare e può essere colorata per l'esame microscopico.

Reagenti

Concentrato tampone fosfato di citrato (N. di cat. 2851)

Citrato di sodio, 0,7 mol/l, e fosfato di sodio, 0,6 mol/l, clorofornio aggiunto come conservante

Soluzione di ematossilina acida (N. di cat. 2852)

Ematossilina, certificata, 1 g/l, C.I. 75290, solfato di alluminio e ammonio, iodati di sodio e stabilizzanti, pH 3,3

Soluzione di eosina B (N. di cat. 2853)

Eosina B, 0,1%, soluzione acquosa, C.I. 45400. Azoturo di sodio, 0,1%, aggiunto come conservante

Materiali specifici necessari, ma non forniti in dotazione

- Microscopio
- Vetrini per microscopio, coprioggetti
- Rack per colorazione/vaschette tipo Coplin
- Bagnomaria, 37 °C
- Soluzione fissativa di etanolo (N. di cat. 2858) 80% v/v alcol etilico

Conservazione e stabilità

Conservare il concentrato tampone fosfato di citrato in frigorifero (2-8 °C). Scartare se la crescita microbica è evidente.

Conservare la soluzione tampone fosfato di citrato in frigorifero (2-8 °C). Stabile per 2 settimane. Utilizzare un'aliquota fresca ogni giorno. Scartare se la crescita microbica è evidente.

Conservare la soluzione di ematossilina acida e la soluzione di eosina B a temperatura ambiente (18-26 °C). Le soluzioni possono essere riutilizzate se conservate in vaschette per colorazione sigillate a chiusura ermetica in condizioni di luce soffusa.

Conservare la soluzione fissativa di etanolo a temperatura ambiente. Conservare ben sigillata e come liquido infiammabile. La soluzione può essere riutilizzata, ma deve essere scartata se la fissazione non è adeguata.

Deterioramento

Scartare la soluzione di ematossilina acida quando il tempo necessario per una colorazione adeguata è superiore a 8 minuti.

Preparazione

Per preparare la soluzione tampone fosfato di citrato diluire 1 volume di concentrato tampone fosfato di citrato con 9 volumi di acqua.

La soluzione di ematossilina acida, la soluzione di eosina B e la soluzione fissativa di etanolo sono pronti per l'uso.

Precauzioni

Questi IVD sono destinati alla diagnostica in vitro in un ambiente di laboratorio clinico. Questi IVD sono destinati esclusivamente all'uso professionale da parte di personale qualificato. Gli IVD Sigma-Aldrich devono essere utilizzati da personale di laboratorio addestrato alla manipolazione di campioni biologici umani potenzialmente infettivi, come anche all'uso di microscopi e altre apparecchiature di laboratorio, che abbia la percezione del colore e l'acuità visiva necessari a distinguere i colori e altri oggetti al microscopio.

Seguire le normali precauzioni adottate nella manipolazione dei reagenti di laboratorio. Smaltire i rifiuti attenendosi a tutte le normative vigenti a livello locale, provinciale, regionale o nazionale.

Procedura

Raccolta dei campioni

Etichettare tutti i campioni in modo chiaro. Per raccogliere e preparare i campioni si devono utilizzare strumenti adeguati. Seguire le istruzioni per l'uso del fabbricante.

Nessun metodo di analisi noto può garantire in modo assoluto che i campioni di sangue o tessuto non trasmettano infezioni. Pertanto, tutti i derivati del sangue o i campioni di tessuto devono essere considerati potenzialmente infettivi.

È possibile utilizzare sangue capillare o venoso. Il sangue capillare può essere trasferito direttamente su un vetrino per microscopio pulito. Versare il sangue venoso in una provetta con EDTA o ossalato. Per praticità, utilizzare 1-2 gocce di soluzione EDTA al 2% (N. di cat. 2854) per ml di sangue (1 goccia = 1 mg). Benché le miscele sangue-EDTA siano state ritenute soddisfacenti per l'uso fino a 2 settimane se refrigerate,² preparare gli strisci entro 24 ore dalla raccolta di sangue in ossalato.⁵ Se i campioni provengono da un neonato, diluire il sangue con soluzione fisiologica allo 0,85%, poiché tali campioni hanno un elevato contenuto in HbF. Gli strisci ematici non sono stabili e devono essere analizzati subito dopo la preparazione.

Note

Ai fini del controllo di qualità, includere in ogni serie di test campioni di sangue prelevati da un adulto normale (HbA) e da un neonato o lattante (HbF). Secondo Barr e Shafer⁶, i vetrini di controllo positivi, fissati, preparati con sangue da cordone ombelicale in EDTA possono essere conservati fino a 1 anno a -20 °C in una scatola di cartone sigillata. Tuttavia, i controlli negativi stabilizzati con EDTA non eluiscono completamente dopo essere stati conservati per più di 2 mesi a -20 °C. Questi ricercatori suggeriscono di preparare strisci positivi e negativi sullo stesso vetrino, fornendo così contrasti chiari e rapidi come riferimento nella lettura dei vetrini oggetto di esame.

Intervallo nei limiti della norma⁷

Età	Emoglobina fetale (%)
Alla nascita	50-90
< 2 anni	0-4
> 2 anni	0-2

Procedura

1. Scaldare la soluzione tampone fosfato di citrato a 37 °C in una vaschetta tipo Coplin o in una vaschetta per colorazione.
2. Con l'aiuto di vetrini per microscopio puliti ed etichettati, eseguire sottili strisci di sangue. Preparare i vetrini di CONTROLLO utilizzando sangue HbF-positivo (sangue da cordone ombelicale) e sangue da adulto normale. Asciugare all'aria per circa 10 minuti.
3. Fissare i vetrini immergendoli in soluzione fissativa di etanolo per 5 minuti, sciacquarli abbondantemente con acqua corrente e asciugare all'aria.
4. Immergere i vetrini di TEST e CONTROLLO in nella soluzione tampone fosfato di citrato preriscaldata a 37 °C per 5 minuti. Agitare dopo 1 e 3 minuti di immersione. Il grado dell'agitazione può essere variato per ottenere i risultati più desiderabili. Sciacquare abbondantemente con acqua distillata e asciugare all'aria **completamente** per evitare artefatti di colorazione.
5. Colorare i vetrini per 3 minuti in soluzione di ematossilina acida. Sciacquare accuratamente i vetrini con acqua distillata e scollare l'acqua in eccesso.
6. Controcolorare i vetrini per 4 minuti in soluzione di eosina B allo 0,1%. Sciacquare abbondantemente con acqua distillata e asciugare all'aria.
7. Posizionare un coprioggetto **asciutto** sul vetrino ed esaminarlo usando una lente speciale per immersione in olio (1000X). L'assenza di HbF è evidenziata dalla presenza di cellule fantasma mentre l'HbF trattenuta dona alle cellule un colore rosso vivo. **Non** applicare l'olio direttamente sul vetrino. (**Nota**: è possibile utilizzare l'ingrandimento 400X, ma il campo più ampio che si ottiene potrebbe essere più difficile da contare).

Caratteristiche prestazionali

La proporzione di eritrociti contenenti emoglobina fetale può essere stimata in vari modi. Con riferimento alla ricerca nel sangue materno di cellule contenenti HbF, Oski e Naiman³ hanno raccomandato quanto segue:

1. Contare il numero totale di eritrociti in 5 campi e calcolare la media per campo.
2. Contare il numero di eritrociti contenenti HbF, intensamente colorati presenti in circa 30 campi e calcolare la media per campo.
3. Calcolare la percentuale di eritrociti contenenti HbF rispetto al numero totale di eritrociti per campo.

I risultati sono riportati come percentuale di HbF presente.

Secondo Oski e Naiman³, questo metodo è in grado di rilevare anche solo 0,1 ml di sangue fetale nella circolazione materna.

Se i risultati osservati differiscono dai risultati attesi, rivolgersi al servizio di assistenza tecnica di Sigma-Aldrich.

Caratteristiche di prestazione analitica

I risultati delle prestazioni analitiche per i test dati condotti su tutte le strutture target confermano una sensibilità, specificità e ripetibilità del 100%.

N. di cat.	Descrizione del prodotto	Target	Specificità intra-saggio	Sensibilità intra-saggio	Specificità inter-saggio	Sensibilità inter-saggio
2851	Concentrato tampone fosfato di citrato	Emoglobina fetale	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
2852	Soluzione di ematossilina acida	Nuclei	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3
2853	Soluzione di eosina B	Emoglobina fetale	3 su 3	3 su 3	3 su 3	3 su 3

Avvertenze e pericoli

Per informazioni aggiornate su rischi, precauzioni e sicurezza, consultare la scheda dati di sicurezza e l'etichetta del prodotto.

285C:



- H319 Provoca grave irritazione oculare.
- H331 Tossico se inalato. Consigli di prudenza.
- P261 Evitare di respirare la nebbia o i vapori.
- P264 Lavare accuratamente la pelle dopo l'uso.
- P271 Utilizzare soltanto all'aperto o in luogo ben ventilato.
- P280 Proteggere gli occhi/il viso.
- P304 + P340 + P311 IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.
- P305 + P351 + P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente con acqua per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

285D:



- H319 Provoca grave irritazione oculare.
- H331 Tossico se inalato. Consigli di prudenza.
- P261 Evitare di respirare la nebbia o i vapori.
- P264 Lavare accuratamente la pelle dopo l'uso.
- P271 Utilizzare soltanto all'aperto o in luogo ben ventilato.
- P280 Proteggere gli occhi/il viso.
- P304 + P340 + P311 IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.
- P305 + P351 + P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente con acqua per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

Se durante l'utilizzo di questo dispositivo, o a seguito di questo, si è verificato un grave incidente, segnalarlo al fabbricante e/o al suo rappresentante autorizzato e alla propria autorità nazionale.

Definizioni dei simboli

Simboli da usare in conformità con la norma EN ISO 15223-1:2021

	Fabbricante		Numero di catalogo
	Consultare le istruzioni per l'uso		Codice del lotto
	Mandatario nella Comunità europea/Unione europea		Dichiarazione di conformità dell'Unione europea (definita in IVDR 2017/746)
	Data di scadenza		Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Limite di temperatura		Attenzione
	Data di fabbricazione		Importatore
	Mandatario in Svizzera		

Bibliografia

1. Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.

2. Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.

3. Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.

4. Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.

5. Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.

6. Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.

7. Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512.

Recapiti

Per effettuare un ordine, visitare il nostro sito web all'indirizzo SigmaAldrich.com. Per il servizio di assistenza tecnica, visitare l'apposita pagina dedicata sul nostro sito web all'indirizzo SigmaAldrich.com/techservice.

Cronologia delle revisioni

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023

Trasferito a un nuovo modello con il marchio attuale. Specificato "per uso professionale" nelle sezioni "Uso previsto" e "Precauzioni". Modificata la sezione "Uso previsto" per allinearla alle linee guida dell'IVDR. Modificato "scheda dati di sicurezza dei materiali" in "scheda dati di sicurezza". Aggiornati i recapiti. Eliminate le istruzioni per conformarsi allo standard CLSI per la raccolta dei campioni. Sostituita l'indicazione della norma EN 980 con quella della norma EN ISO 15223-1:2021 per i simboli. Aggiunti recapiti da contattare in caso di eventi avversi. Aggiornata la bibliografia. Aggiunta la cronologia delle revisioni. Aggiunta la sezione "Avvertenze e pericoli". Aggiunta informazione per Mandatario in Svizzera.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

L'iniziale "M" e Sigma-Aldrich sono marchi commerciali di Merck KGaA, Darmstadt, Germania o delle sue affiliate. Tutti gli altri marchi commerciali sono di proprietà dei rispettivi proprietari. Informazioni dettagliate sui marchi sono disponibili tramite risorse accessibili pubblicamente.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Instrucciones de uso

Kit de hemoglobina fetal

Procedimiento n.º 285



Uso previsto

Los reactivos de hemoglobina fetal están destinados al uso como tinción histoquímica general de laboratorio para la detección por elución ácida de la hemoglobina fetal en frotis sanguíneos. Los reactivos de tinción de hemoglobina fetal son para "uso diagnóstico in vitro". Solo para uso profesional. Este procedimiento manual y semicuantitativo detecta la hemoglobina fetal en los eritrocitos de las muestras de extensiones de sangre humana.

Los avances en las técnicas de aislamiento y caracterización de proteínas permitieron descubrir que existen varias propiedades distintivas que permiten diferenciar la hemoglobina fetal de la adulta. Entre ellas, se encuentra la resistencia de la hemoglobina fetal (hemoglobina F) a la elución ácida. Cuando las extensiones de sangre se sumergen en amortiguador ácido, por ejemplo, la hemoglobina adulta se eluye de los eritrocitos, mientras que la hemoglobina fetal no lo hace. Si las extensiones de sangre se tratan de esta manera y se tiñen posteriormente, los eritrocitos que tienen hemoglobina F tomarán la tinción, mientras que los que sólo contienen hemoglobina adulta aparecen como «fantasmas».

La técnica de portaobjetos para demostrar la hemoglobina fetal en términos de su resistencia a la elución ácida fue propuesta originalmente por Kleihauer y cols.,¹ y posteriormente modificada por Shepard y cols.² El sigma producido representa una mejora de este enfoque descrito por Oski y Naiman.³

Cada vez es más frecuente en los casos de incompatibilidad Rh suprimir las reacciones inmunitarias a los glóbulos rojos que entran en la circulación materna procedentes del feto. La cantidad de gammaglobulina específica, que contiene anti Rh(D) que debe administrarse, se calcula evaluando la magnitud de la hemorragia materno-fetal.⁴

Según la técnica descrita, las extensiones de sangre, debidamente secadas y fijadas, se sumergen en una solución amortiguadora de citrato de pH 3,3 a 37 °C. La hemoglobina A adulta (HbA) se disuelve fuera de las células, mientras que la hemoglobina fetal (HbF), que es resistente a los ácidos, permanece en el espacio intracelular y puede teñirse para el examen microscópico.

Reactivos

Concentrado de solución amortiguadora con fosfato y citrato (N.º de cat. 2851)
Citrato de sodio, 0,7 mol/l, y fosfato de sodio, 0,6 mol/l, cloroformo añadido como conservante

Solución de hematoxilina ácida (N.º de cat. 2852)
Hematoxilina certificada, 1 g/l, C.I. 75290, sulfato amónico de aluminio, yodatos sódicos y estabilizadores, pH 3,3

Solución de eosina B (N.º de cat. 2853)
Eosina B, 0,1 %, solución acuosa, C.I. 45400. Azida sódica, al 0,1 %, añadida como conservante

Material especial necesario pero no suministrado

- Microscopio
- Portaobjetos para microscopio, cubreobjetos
- Gradilla de tinción/frascos Coplin
- Baño de agua a 37 °C
- Fijador de etanol (N.º de cat. 2858) al 80 % v/v de alcohol etílico

Almacenamiento y estabilidad

Almacenar el concentrado de amortiguador de fosfato y citrato en el refrigerador (2-8 °C). Descartar si hay evidencias de crecimiento microbiano.

Almacenar la solución amortiguadora de fosfato y citrato en el refrigerador (2-8 °C). Estable durante 2 semanas. Utilizar una alícuota nueva cada día. Descartar si hay evidencias de crecimiento microbiano.

Conservar la solución de hematoxilina ácida y la solución de eosina B a temperatura ambiente (18-26 °C). Las soluciones pueden reutilizarse si se guardan en frascos de tinción bien cerrados y con luz tenue.

El fijador de etanol debe conservarse a temperatura ambiente. Almacenar bien cerrado y como líquido inflamable. La solución puede reutilizarse, pero debe desecharse si la fijación no es adecuada.

Deterioro

Desechar la solución de hematoxilina ácida cuando el tiempo necesario para una tinción adecuada sea superior a 8 minutos.

Preparación

La solución amortiguadora de fosfato y citrato se prepara diluyendo 1 volumen de concentrado de solución amortiguadora de fosfato y citrato con 9 volúmenes de agua.

La solución de hematoxilina ácida, la solución de eosina B y el fijador de etanol están listos para su uso.

Precauciones

Estos dispositivos médicos de diagnóstico in vitro (DMDIV) están destinados a un uso de diagnóstico in vitro en un entorno de laboratorio clínico. Estos DMDIV están destinados a un uso profesional por parte de personal cualificado. El personal de laboratorio capacitado de Sigma-Aldrich puede utilizar los DMDIV para manipular muestras humanas que puedan ser infecciosas, utilizar microscopios y otros equipos de laboratorio y tener percepción de los colores y agudeza visual para distinguir los colores y otros objetos bajo el microscopio.

Se deben seguir las precauciones normales ejercidas en el manejo de reactivos de laboratorio. Se deben eliminar los residuos respetando todas las normativas locales, estatales, regionales o nacionales.

Procedimiento

Recogida de la muestra

Todas las muestras deben estar claramente etiquetadas. Se deben utilizar instrumentos adecuados para la obtención y preparación de muestras. Siga las instrucciones de uso del fabricante.

Ningún método de prueba conocido puede ofrecer total garantía de que las muestras de sangre o tejidos no transmitan infecciones. Por lo tanto, todos los derivados de la sangre o muestras de tejido deben considerarse potencialmente infecciosos.

Se puede utilizar sangre capilar o venosa. La sangre capilar puede transferirse directamente a un portaobjetos limpio. La sangre venosa debe añadirse a un tubo que contenga EDTA u oxalato. Para mayor comodidad, utilice 1-2 gotas de solución de EDTA al 2 % (N.º de cat. 2854) por ml de sangre (1 gota = 1 mg). Aunque se ha informado de que las mezclas de sangre con EDTA son satisfactorias para su uso hasta 2 semanas cuando están refrigeradas.² Los frotis deben prepararse en un plazo de 24 horas a partir de la sangre recogida en oxalato.⁵ Si se utilizan muestras de recién nacidos, se recomienda diluir la sangre con solución salina al 0,85 %, ya que estas muestras tienen un alto contenido de HbF. Las extensiones de sangre no son estables y deben ser analizadas inmediatamente después de su preparación.

Notas

A efectos de control de calidad, se recomienda incluir en cada serie de pruebas sangre de un adulto normal (HbA) y de un recién nacido o de un lactante (HbF). Barr y Shafer⁶ informan de que los portaobjetos de control positivo fijados de la sangre del cordón umbilical en EDTA pueden conservarse hasta 1 año a -20 °C, en una caja de cartón sellada. Sin embargo, los controles negativos de EDTA no se eluyen completamente después de ser almacenados durante más de 2 meses a -20 °C. Estos investigadores sugieren que se preparen extensiones positivas y negativas en el mismo portaobjetos; de este modo, se obtienen contrastes claros y rápidos como referencia en la lectura de los portaobjetos.

Intervalos normales⁷

Edad	Hemoglobina fetal (%)
Al nacer	50-90
<2 años	0-4
>2 años	0-2

Procedimiento

1. La solución amortiguadora de fosfato y citrato debe calentarse hasta 37 °C en un frasco Coplin o en una cubeta de tinción.
2. Con portaobjetos de microscopio limpios y etiquetados, hacer extensiones de sangre finas. Preparar portaobjetos de CONTROL utilizando sangre HbF positiva (sangre de cordón umbilical) y sangre normal de adulto. Secar al aire unos 10 minutos.
3. Fijar los portaobjetos sumergiéndolos en fijador de etanol durante 5 minutos, enjuagar bien con agua del grifo y secar al aire.
4. Sumergir los portaobjetos de PRUEBA y CONTROL en la solución amortiguadora de fosfato y citrato precalentada a 37 °C durante 5 minutos. Agitar después de 1 y 3 minutos de inmersión. El grado de agitación puede variar para conseguir los resultados más deseados. Aclarar bien con agua destilada y secar al aire **completamente** para evitar los artefactos de tinción.
5. Teñir los portaobjetos durante 3 minutos en solución de hematoxilina ácida. Aclarar los portaobjetos a fondo con agua destilada y sacudir el exceso de agua.
6. Tintar los portaobjetos durante 4 minutos en solución de eosina B al 0,1 %. Aclarar bien con agua destilada y secar al aire.
7. Colocar el cubreobjetos **seco** en el portaobjetos y examinarlo mediante inmersión en aceite (1000X). La ausencia de HbF es evidente por la presencia de células fantasma mientras que la HbF retenida hace que las células aparezcan de color rojo brillante. **No** aplicar aceite directamente a la preparación. **Nota:** Se puede utilizar el aumento de 400X, pero el mayor campo resultante puede ser más difícil de contar.

Características de funcionamiento

La proporción de eritrocitos que contienen hemoglobina fetal puede estimarse de varias maneras. Al estudiar las pruebas de sangre materna de las células que contienen HbF, Oski y Naiman³ recomendaron lo siguiente:

1. Contar el número total de eritrocitos en 5 campos y determinar el número en promedio por campo.
2. Contar el número de eritrocitos que contienen HbF profundamente teñidos en unos 30 campos y determinar el número en promedio por campo.
3. Calcular el porcentaje de eritrocitos HbF sobre la base del número total de eritrocitos por campo.

Los resultados se presentan como el porcentaje de HbF presente.

Según Oski y Naiman³, este método es capaz de detectar una cantidad tan pequeña como 0,1 ml de sangre fetal en la circulación materna.

Si los resultados observados varían de los esperados, póngase en contacto con el Servicio técnico de Sigma-Aldrich.

Características de funcionamiento analítico

Los resultados del funcionamiento analítico de las pruebas realizadas en todas las estructuras objetivo confirman una sensibilidad, especificidad y repetibilidad del 100 %.

N.º de cat.	Descripción del producto	Objetivo	Especificidad intraensayo	Sensibilidad intraensayo	Especificidad interensayo	Sensibilidad interensayo
2851	Concentrado de solución amortiguadora con fosfato y citrato	Hemoglobina fetal	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
2852	Solución de hematoxilina ácida	Núcleos	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
2853	Solución de eosina B	Hemoglobina fetal	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3

Advertencias y peligros

Consulte la ficha de seguridad y el etiquetado del producto para obtener información actualizada sobre riesgos, peligros o seguridad.

285C:



- H319 Provoca irritación ocular grave.
- H331 Tóxico en caso de inhalación. Declaración de precaución
- P261 Evitar respirar nieblas o vapores.
- P264 Lavarse cuidadosamente la piel después de la manipulación.
- P271 Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado.
- P280 Usar equipo de protección para los ojos/la cara.
- P304 + P340 + P311 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar. Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.
- P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando.

285D:



- H319 Provoca irritación ocular grave.
- H331 Tóxico en caso de inhalación. Declaración de precaución.
- P261 Evitar respirar nieblas o vapores.
- P264 Lavarse cuidadosamente la piel después de la manipulación.
- P271 Utilizar únicamente en exteriores o en un lugar bien ventilado.
- P280 Usar equipo de protección para los ojos/la cara.
- P304 + P340 + P311 EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar. Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.
- P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir enjuagando.

Si durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se produce un incidente grave, infórmelo al fabricante o a su representante autorizado y a su autoridad nacional.

Definiciones de los símbolos

Símbolos definidos en la norma EN ISO 15223-1:2021

	Fabricante		Número de catálogo
	Consultar instrucciones de uso		Código de lote
	Representante autorizado en la Comunidad Europea/Unión Europea		Declaración UE de conformidad (definida en el Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro)
	Fecha de caducidad		Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Límite de temperatura		Precaución
	Fecha de fabricación		Importador
	Representante autorizado en Suiza		

Referencias

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstrichs [Demostración de hemoglobina fetal en eritrocitos de un frotis sanguíneo]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. Alemán. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.
- Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512

Información de contacto

Para hacer un pedido, visite nuestro sitio web en [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Para solicitar el Servicio técnico, visite la página de servicio técnico en nuestro sitio web en [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Historial de revisiones

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023
Transferido a la nueva plantilla con la marca actual. Especificado para uso profesional en uso previsto y precauciones. Se ha revisado el uso previsto para adaptarlo a las directrices europeas sobre DIV. Se ha actualizado la ficha de datos de seguridad del material a la ficha de datos de seguridad. Se ha actualizado la información de contacto. Se ha eliminado la instrucción de seguir el CLSI para la recogida de muestras. Se ha eliminado la norma EN 980 y se ha cambiado a la norma EN ISO 15223-1:2021 en los símbolos. Se ha añadido la información de contacto en caso de acontecimientos adversos. Se han actualizado las referencias bibliográficas. Se ha añadido una tabla del historial de revisiones. Se han añadido advertencias y peligros. Información del CH-REP añadida.	

Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany

Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

La M inicial y Sigma-Aldrich son marcas comerciales registradas de Merck KGaA, Darmstadt, Alemania o sus filiales. Todas las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos dueños. Puede consultarse la información detallada sobre las marcas comerciales en recursos accesibles al público.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Brugsanvisning

Fosterhæmoglobinsæt

Procedure nr. 285



Tilsigtet brug

Fosterhæmoglobinnreagenser er beregnet til brug som en histokemisk farvning til almindelig laboratoriebrug med henblik på syreelueringsbestemmelse af fosterhæmoglobin i blodudstrygninger. Fosterhæmoglobin-farvningsreagenser er beregnet til "in vitro-diagnostisk brug". Kun til professionel brug. Denne manuelle, semikvantitative procedure detekterer fosterhæmoglobin i erythrocytter fra humane blodudstrykningsprøver.

Fremskridt inden for teknikker til proteinisolering og -karakterisering førte til opdagelsen af, at der er flere karakteristiske egenskaber, som gør det muligt at differentiere fosterhæmoglobin fra voksenhæmoglobin. Blandt disse er fosterhæmoglobins (hæmoglobin F) resistens over for syreeluering. Når blodudstrygninger for eksempel nedsænkes i syrebuffer, elueres voksenhæmoglobin fra erythrocytterne, hvorimod fosterhæmoglobin ikke elueres. Hvis blodudstrygninger behandles på denne måde og efterfølgende farves, vil erythrocytter med hæmoglobin F optage farvningen, mens dem, der kun indeholder voksenhæmoglobin, fremstår som "spøgelse".

Objektglastechnikken til påvisning af fosterhæmoglobin via dets modstandsdygtighed over for syreeluering blev oprindeligt foreslået af Kleihauer et al.¹ og senere modificeret af Shepard et al.² Teknikken fra Sigma repræsenterer en yderligere forbedring af denne tilgang som beskrevet af Oski og Naiman.³

Det bliver mere og mere almindeligt i tilfælde af Rh-inkompatibilitet at undertrykke immunreaktioner på røde blodlegemer, der kommer ind i moderens kredsløb fra fosteret. Mængden af specifikt gammaglobulin, der indeholder anti-Rh(D), som skal administreres, beregnes ved at vurdere graden af føtal-maternal blødning.⁴

I henhold til den beskrevne teknik nedsænkes blodudstrygninger, som er blevet korrekt tørret og fikseret, i en citratbuffer med pH 3,3 ved 37 °C. Voksenhæmoglobin A (HbA) skylles ud af cellerne, hvorimod fosterhæmoglobin (HbF), som er syreresistent, forbliver intracellulært og kan farves med henblik på mikroskopisk undersøgelse.

Reagenser

Citratfosfatbufferkoncentrat (kat.nr. 2851)
Natriumcitrat, 0,7 mol/l, og natriumfosfat, 0,6 mol/l, kloroform tilsat som konserveringsmiddel.

Sur hæmatoxylinopløsning (kat.nr. 2852)
Hæmatoxylin, certificeret, 1 g/l, CI 75290, aluminiumammoniumsulfat, natriumiodat og stabilisatorer, pH 3,3.

Eosin B-opløsning (kat.nr. 2853)
Eosin B, 0,1 %, vandig opløsning, CI 45400. Natriumazid, 0,1 %, tilsat som konserveringsmiddel.

Særlige materialer, som er påkrævede, men ikke medfølger

- Mikroskop
- Objektglas, dækglass
- Farvningsstativ/Coplin-skåle
- Vandbad, 37 °C
- Ethanolfixativ (kat.nr. 2858) 80 % vol./vol. ethylalkohol

Opbevaring og stabilitet

Opbevar citratfosfatbufferkoncentrat i køleskab (2-8 °C). Skal bortskaffes, hvis der er tegn på mikrobiel vækst.

Opbevar citratfosfatbufferopløsning i køleskab (2-8 °C). Holdbar i 2 uger. Brug en frisk alikvot hver dag. Skal bortskaffes, hvis der er tegn på mikrobiel vækst.

Opbevar sur hæmatoxylinopløsning og eosin B-opløsning ved stuetemperatur (18-26 °C). Opløsningerne kan genbruges, hvis de opbevares i tæt lukkede farvningsglas ved dæmpet belysning.

Ethanolfixativ skal opbevares ved stuetemperatur. Skal opbevares tæt lukket og som brandfarlig væske. Opløsningen kan genbruges, men skal kasseres, hvis fikseringen ikke er tilstrækkelig.

Forringelse

Sur hæmatoxylinopløsning skal kasseres, når den nødvendige tid til passende farvning overstiger 8 minutter.

Forberedelse

Citratfosfatbufferopløsning fremstilles ved at fortynde 1 del citratfosfatbufferkoncentrat med 9 dele vand.

Sur hæmatoxylinopløsning, eosin B-opløsning og ethanolfixativ er klar til brug.

Forsigtighedsregler

Disse IVD'er er beregnet til in vitro-diagnostisk brug i et klinisk laboratoriemiljø. Disse IVD'er er udelukkende beregnet til professionel brug udført af kvalificeret personale. IVD'er fra Sigma-Aldrich kan benyttes af laboratoriepersonale, som er uddannet til at håndtere potentielt smittefarlige humane prøver, bruge mikroskoper og andet laboratorieudstyr og har en farveopfattelse og synsstyrke, som gør dem i stand til at skelne mellem farver og andre genstande under et mikroskop.

Normale forsigtighedsregler, der iagttages ved håndtering af laboratoriereagenser, skal følges. Bortskaf affald under overholdelse af alle lokale, regionale eller nationale forskrifter.

Procedure

Prøveindsamling

Alle prøver skal være tydeligt mærket. Egnede instrumenter skal bruges til at indhente og klargøre prøver. Følg producentens brugsanvisning.

Ingen kendt testmetode kan give fuldstændig sikkerhed for, at blodprøver eller væv ikke overfører smitte. Derfor skal alle blodderivater eller vævsprøver betragtes som potentielt smittefarlige.

Der kan anvendes enten kapillært eller venøst blod. Kapillærblod kan overføres direkte til et rent objektglas. Venøst blod skal tilsættes i et rør med EDTA eller oxalat. Af praktiske hensyn kan der bruges 1-2 dråber 2 % EDTA-opløsning (kat.nr. 2854) pr. ml blod (1 dråbe = 1 mg). Selvom blod-EDTA-blandinger er blevet rapporteret at være tilfredsstillende til brug i op til 2 uger ved opbevaring i køleskab.² Udstrygninger skal fremstilles inden for 24 timer ved brug af blod opsamlet i oxalat.⁵ Når der benyttes prøver fra nyfødte, anbefales det, at blodet fortyndes med 0,85 % saltvand, da sådanne prøver har et højt indhold af HbF. Blodudstrygninger er ikke stabile og skal analyseres umiddelbart efter klargøring.

Bemærkninger

Til kvalitetskontrolformål anbefales det, at blod fra en normal voksen (HbA) og fra en nyfødt eller et spædbarn (HbF) inkluderes i hver serie af tests. Barr og Shafer⁶ rapporterer, at fikserede positive kontrolglas fra navlestrengsblod i EDTA kan opbevares i op til 1 år ved -20 °C i en forsegleet papæske. Negative kontroller i EDTA eluerer dog ikke fuldstændigt efter at have været opbevaret i mere end 2 måneder ved -20 °C. Disse forskere foreslår, at positive og negative udstrygninger forberedes på det samme objektglas, hvilket giver klare og hurtige kontraster som reference ved aflæsning af objektglas.

Normale områder ⁷	
Alder	Fosterhæmoglobin (%)
Ved fødslen	50-90
< 2 år	0-4
> 2 år	0-2

Procedure

1. Citratfosfatbufferopløsning skal opvarmes til 37 °C i en Coplin-skål eller farvningssskål.
2. Brug rene, mærkede objektglas til at lave tynde blodudstrygninger. Forbered KONTROL-objektglas ved brug af positivt HbF-blod (navlestrengsblod) og normalt voksenblod. Lad lufttørre i ca. 10 minutter.
3. Fikser objektglassene ved at nedsænke dem i ethanolfixativ i 5 minutter, skyl grundigt med postevand, og lad dem lufttørre.
4. Nedsenk TEST- og KONTROL-objektglas i forvarmet citratfosfatbufferopløsning ved 37 °C i 5 minutter. Rør i opløsningen efter 1 og 3 minutters nedsenkning. Graden af omrøring kan varieres for at opnå optimale resultater. Skyl grundigt med destilleret vand, og lad glassene lufttørre **helt** for at undgå farvningsartefakter.
5. Farv objektglassene i 3 minutter i sur hæmatoxylinopløsning. Skyl objektglassene grundigt med destilleret vand, og ryst overskydende vand af.
6. Kontrastfarv objektglassene i 4 minutter i 0,1 % eosin B-opløsning. Skyl grundigt med destilleret vand, og lad dem lufttørre.
7. Sæt et **tørt** dækglass på objektglasset, og undersøg det ved brug af olieimmersion (1000X). Fravær af HbF ses tydeligt ved tilstedeværelsen af spøgelsesceller, mens bibevaret HbF får cellerne til at fremstå klart røde. Påfør **ikke** olie direkte på objektglasset. (**Bemærk:** 400X-forstørrelsen kan bruges, men det resulterende større felt kan være sværere at optælle).

Præstationskarakteristika

Andelen af erythrocytter, der indeholder fosterhæmoglobin, kan vurderes på flere måder. Ved undersøgelse af evidens for HbF-holdige celler i maternelt blod anbefaler Oski og Naiman³ følgende:

1. Tæl det samlede antal erythrocytter i 5 felter, og bestem det gennemsnitlige antal pr. felt.
 2. Tæl antallet af dybt farvede HbF-holdige erythrocytter i ca. 30 felter, og bestem det gennemsnitlige antal pr. felt.
 3. Beregn procentdelen af HbF-erythrocytter på basis af det samlede antal erythrocytter pr. felt.
- Resultaterne rapporteres som procentvis HbF-forekomst.

Ifølge Oski og Naiman³ er denne metode i stand til at detektere ned til 0,1 ml fosterblod i moderens kredsløb.

Kontakt Sigma-Aldrich teknisk service for at få assistance, hvis de observerede resultater afviger fra de forventede resultater.

Analytiske præstationskarakteristika

Resultaterne for analyseydelsen for de givne tests, som blev udført på alle målstrukturer, bekræfter 100 % sensitivitet, specificitet og repetérbarhed.

Kat. nr.	Produkt-beskrivelse	Mål	Specificitet inden for analyse	Sensitivitet inden for analyse	Specificitet mellem analyser	Sensitivitet mellem analyser
2851	Citratfosfatbuffer-koncentrat	Foster-hæmoglobin	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
2852	Sur hæmatoxylinopløsning	Kerner	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3
2853	Eosin B-opløsning	Foster-hæmoglobin	3 af 3	3 af 3	3 af 3	3 af 3

Advarsler og farer

Se sikkerhedsdatabladet og produktmærkningen vedrørende opdaterede risiko-, fare- eller sikkerhedsoplysninger.

285C:



H319 Forårsager alvorlig øjenirritation.

H331 Giftig ved indånding. Sikkerhedssætning(er)

P261 Undgå indånding af tåge eller dampe.

P264 Vask huden grundigt efter brug.

P271 Brug kun udendørs eller i et rum med god udluftning.

P28 Bær øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

P304 + P340 + P311 VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vejtrækningen lettes. Ring til en GIFTINFORMATION/læge.

P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØJNE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

285D:



H319 Forårsager alvorlig øjenirritation.

H331 Giftig ved indånding. Sikkerhedssætning(er)

P261 Undgå indånding af tåge eller dampe.

P264 Vask huden grundigt efter brug.

P271 Brug kun udendørs eller i et rum med god udluftning.

P28 Bær øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

P304 + P340 + P311 VED INDÅNDING: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vejtrækningen lettes. Ring til en GIFTINFORMATION/læge.

P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØJNE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning.

Hvis der er opstået en alvorlig hændelse under brugen af dette produkt eller som følge af dets brug, skal det indberettes til producenten og/eller dennes autoriserede repræsentant og til den nationale myndighed i brugerens land.

Symboldefinitioner

Symboler som defineret i EN ISO 15223-1:2021

	Producent		Katalognummer
	Se brugsanvisningen		Batchkode
	Autoriseret repræsentant i Det Europæiske Fællesskab/ Den Europæiske Union		Den Europæiske Unions overensstemmelseserklæring (defineret i IVDR 2017/746)
	Sidste anvendelsesdato		Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Temperaturgrænse		Forsigtig
	Fremstillingsdato		Importør
	Angiver autoriseret repræsentant i Schweiz		

Referencer

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.
- Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512

Kontaktoplysninger

Besøg vores websted på SigmaAldrich.com for at afgive en bestilling. Gå til siden for teknisk service på vores websted på SigmaAldrich.com/techservice for at få oplysninger om teknisk service.

Revisionshistorik

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023
Overført til ny skabelon med nuværende branding. Specificeret til professionel brug under tilsigtet brug og forsigtighedsregler. Revideret tilsigtet brug for at tilpasse til IVDR-retningslinjer. Opdateret materialesikkerhedsdatablad til sikkerhedsdatablad. Opdateret kontaktoplysninger. Fjernet instruks om at følge CLSI vedrørende prøveindsamling. Fjernet EN 980 og ændret til EN ISO 15223-1:2021 for symboler. Tilføjet kontaktoplysninger i tilfælde af uønskede hændelser. Opdateret litteraturhenvisninger. Tilføjet en revisionshistoriktabel. Tilføjet advarsler og farer. Tilføjet information om repræsentant i Schweiz.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

Forbogstavet M og Sigma-Aldrich er varemærker tilhørende Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland, eller deres tilknyttede virksomheder. Alle andre varemærker tilhører deres respektive ejere. Detaljerede oplysninger om varemærker kan indhentes via offentligt tilgængelige ressourcer.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Bruksanvisning

Fosterhemoglobin-sats

Förfarande nr. 285



Avsedd användning

Fosterhemoglobin-reagenser är avsedda att användas som en allmän histokemisk färgning i laboratoriet för fastställning av syraeluering av fosterhemoglobin i blodutstryk. Fosterhemoglobinfärgnings-reagenser är avsedda för in vitro-diagnostiskt bruk. Endast för yrkesmässigt bruk. I detta manuella, semikvantitativa förfarande detekteras fosterhemoglobin i erythrocyter från humana blodutstryksprover.

Framsteg inom tekniker för proteinisolering och karakterisering ledde till upptäckten att det finns flera särskiljande egenskaper som gör det möjligt att skilja fosterhemoglobin från vuxenhemoglobin. Bland dessa är fosterhemoglobinet (hemoglobin F) motståndskraft mot syraeluering. När blodutstryk till exempel nedsänks i syrabuffert elueras vuxenhemoglobin från erythrocyterna, medan fosterhemoglobin inte gör det. Om blodutstryk behandlas på detta sätt och därefter färgas kommer erythrocyter med hemoglobin F att ta upp färgningen, medan de som endast innehåller vuxenhemoglobin visas som "spöken".

Objektglastechniken för att demonstrera fosterhemoglobin med avseende på dess motståndskraft mot syraeluering föreslogs ursprungligen av Kleihauer et al.,¹ och modifierades senare av Shepard et al.² Den Sigma-producerade representerar en ytterligare förbättring av detta tillvägagångssätt som beskrivet av Oski och Naiman.³

Det blir allt vanligare i fall av Rh-inkompatibilitet att undertrycka immunreaktioner mot röda blodkroppar som kommer in i moderns cirkulation från fostret. Mängden specifikt gammaglobulin, innehållande anti-Rh(D) som ska administreras, beräknas genom att bedöma omfattningen av fetomaternal blodning.⁴

Enligt beskriven teknik nedsänks blodutstryk, som har torkats och fixerats ordentligt, i en citratbuffert pH 3,3 vid 37 °C. Vuxenhemoglobin A (HbA) löses ut ur cellerna, medan fosterhemoglobin (HbF) som är syraresistent, förblir intracellulärt och kan färgas för mikroskopisk undersökning.

Reagenser

Citratfosfatbuffertkoncentrat (kat.-nr. 2851)
Natriumcitrat, 0,7 mol/l, och natriumfosfat, 0,6 mol/l, kloroform tillsatt som konserveringsmedel

Sur hematoxylinlösning (kat.-nr. 2852)
Hematoxylin (certifierat), 1 g/l, C.I. 75290, aluminiumammoniumsulfat, natriumjodat och stabiliseringsmedel, pH 3,3

Eosin B-lösning (kat.-nr. 2853)
Eosin B, 0,1 %, vattenlösning, C.I. 45400. Natriumazid, 0,1 %, tillsatt som konserveringsmedel

Särskilt materiel som krävs men inte tillhandahålls

- Mikroskop
- Objektglas, täckglas
- Färgställ/Coplin-burkar
- Vattenbad, 37 °C
- Etanolfixeringsmedel (kat.-nr. 2858) 80 % v/v etylalkohol

Förvaring och hållbarhet

Förvara citratfosfatbuffertkoncentrat i kylskåp (2–8 °C). Kassera om det finns tecken på mikrobiell tillväxt.

Förvara citratfosfatbuffertlösning i kylskåp (2–8 °C). Stabil i två veckor. Använd en färsk alikvot varje dag. Kassera om det finns tecken på mikrobiell tillväxt.

Förvara sur hematoxylinlösning och eosin B-lösning i rumstemperatur (18–26 °C). Lösningar kan återanvändas om de förvaras i tätt förslutna färgningsburkar i dämpat ljus.

Etanolfixeringsmedel bör förvaras i rumstemperatur. Förvaras tätt förslutet och som brandfarlig vätska. Lösningen kan återanvändas men bör kasseras om fixeringen inte är tillräcklig.

Försämring

Kassera sur hematoxylinlösning när tiden som krävs för lämplig färgning överstiger 8 minuter.

Beredning

Citratfosfatbuffertlösning framställs genom att späda 1 volym citratfosfatbuffertkoncentrat med 9 volymer vatten.

Sur hematoxylinlösning, eosin B-lösning och etanolfixeringsmedel är klara att användas.

Försiktighetsåtgärder

Dessa medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik är avsedda att användas i klinisk laboratoriemiljö. Dessa medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik är endast avsedda att användas av kvalificerad personal. Medicintekniska produkter för in vitro-diagnostik från Sigma-Aldrich får användas av laboratoriepersonal som är utbildad i hantering av humanprover som kan vara smittsamma, användning av mikroskop och annan laboratorieutrustning samt har tillräckligt bra färgseende och synskärpa för att kunna urskilja färger och andra föremål under mikroskop.

Följ sedvanliga försiktighetsåtgärder vid hantering av laboratoriereagenser. Kassera avfall i enlighet med alla lokala, statliga, regionala och nationella bestämmelser.

Förfarande

Provtagning

Alla prover måste vara tydligt märkta. Lämpliga instrument måste användas för att ta och förbereda prover. Följ tillverkarens bruksanvisning.

Inga kända testmetoder kan erbjuda fullständig garanti för att inte smitta överförs genom blodprover eller vävnad. Därför måste alla blodderivat och vävnadsprover betraktas som potentiellt smittsamma.

Antingen kapillärt eller venöst blod kan användas. Kapillärt blod kan överföras direkt till ett rent objektglas. Venöst blod ska läggas till ett rör som innehåller EDTA eller oxalat. För enkelhetens skull bör du använda 1–2 droppar 2 % EDTA-lösning (kat.-nr. 2854) per ml blod (1 droppe = 1 mg). Blod-EDTA-blandningar har rapporterats vara lämpliga för användning i upp till två veckor i kylskåp.² Utstryk bör dock ändå förberedas inom 24 timmar från blod som samlats in i oxalat.⁵ När prover från en nyfödd används rekommenderas att blodet späds med 0,85 % koksaltlösning, eftersom sådana prover har en hög halt av HbF. Blodutstryk är inte stabila och måste testas omedelbart efter beredning.

Anmärkningar

För kvalitetskontrolländamål rekommenderas att blod från en normal vuxen (HbA) och från en nyfödd eller ett spädbarn (HbF) inkluderas i varje serie av tester. Barr och Shafer⁶ rapporterar att fixerade positiva kontrollobjektglas från navelsträngsblod i EDTA kan bevaras i upp till 1 år vid -20 °C i en förseglad kartong. Negativa kontroller med EDTA elueras dock inte helt efter att ha lagrats i mer än två månader vid -20 °C. Dessa utredare föreslår att man förbereder positiva och negativa utstryk på samma objektglas, vilket således ger tydliga och snabba kontraster som referens vid läsning av testbilder.

Normalintervall ⁷	
Ålder	Fosterhemoglobin (%)
Vid födseln	50–90
< 2 år	0–4
> 2 år	0–2

Förfarande

1. Citratfosfatbuffertlösning ska värmas till 37 °C i en Coplin-burk eller färgningsskål.
2. Använd rena, märkta objektglas för att göra tunna blodutstryk. Förbered KONTROLL-objektglas med positivt HbF-blod (navelsträngsblod) och normalt vuxenblod. Lufttorka i cirka 10 minuter.
3. Fixera objektglasen genom att doppa i etanolfixeringsmedel i 5 minuter, skölj noggrant med kranvatten och lufttorka.
4. Sänk ned TEST- och KONTROLL-objektglasen i förvärmad citratfosfatbuffertlösning vid 37 °C i 5 minuter. Rör om efter 1 och 3 minuters nedsänkning. Graden av omrörning kan varieras för att uppnå de mest önskvärda resultaten. Skölj noggrant med destillerat vatten och lufttorka **helt** för att undvika fläckar.
5. Färga objektglasen i 3 minuter i sur hematoxylinlösning. Skölj objektglasen noggrant med destillerat vatten och skaka av överflödigt vatten.
6. Motfärga objektglasen i 4 minuter i 0,1 % Eosin B-lösning. Skölj noggrant med destillerat vatten och lufttorka.
7. Placera **torrt** täckglas på objektglaset och undersök med oljeimmersion (1 000X). Frånvaron av HbF syns genom närvaron av spöckceller medan bibehållen HbF gör att celler ser ljusröda ut. Applicera **inte** olja direkt på objektglaset. (**Obs!** 400X förstoring kan användas, men det resulterande större fältet kan vara svårare att räkna.)

Prestandaegenskaper

Andelen erythrocyter som innehåller fosterhemoglobin kan beräknas på flera sätt. När man studerade bevis för HbF-innehållande celler i maternellt blod rekommenderade Oski och Naiman³ följande:

1. Räkna totalt antal erythrocyter i fem fält och bestäm det genomsnittliga antalet per fält.
2. Räkna totalt antal djupt färgade erythrocyter som innehåller HbF i ungefär 30 fält och bestäm det genomsnittliga antalet per fält.
3. Beräkna procentandelen HbF-erythrocyter på grundval av det totala antalet erythrocyter per fält. Resultaten rapporteras som procent HbF närvarande.

Enligt Oski och Naiman³ kan denna metod detektera så lite som 0,1 ml fosterblod i moderns cirkulation.

Kontakta teknisk service på Sigma-Aldrich för hjälp ifall resultaten som observeras avviker från de förväntade resultaten.

Analytiska prestandaegenskaper

De analytiska prestandaresultaten för de givna testerna utförda på alla målstrukturer bekräftar 100 % sensitivitet, specificitet och repeterbarhet.

Kat.-nr.	Produktbeskrivning	Mål	Specificitet inom analys	Sensitivitet inom analys	Specificitet mellan analyser	Sensitivitet mellan analyser
2851	Citratfosfatbuffertkoncentrat	Fosterhemoglobin	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
2852	Sur hematoxylinlösning	Kärnor	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
2853	Eosin B-lösning	Fosterhemoglobin	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3

Varningar och faror

Se säkerhetsdatabladet och produktmärkningen för uppdaterad information om risker, fara och säkerhet.

285C:



H319 Orsakar allvarlig ögonirritation.

H331 Giftigt vid inandning. Skyddsangivelse(r)

P261 Undvik att andas in dimma eller ångor.

P264 Tvätta huden noggrant efter hantering.

P271 Använd endast utomhus eller i ett välventilerat utrymme.

P280 Använd ögonskydd/ansiktsskydd.

P304 + P340 + P311 VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att personen andas utan problem. Ring en GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare.

P305 + P351 + P338 VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ut eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.

285D:



H319 Orsakar allvarlig ögonirritation.

H331 Giftigt vid inandning. Skyddsangivelse(r)

P261 Undvik att andas in dimma eller ångor.

P264 Tvätta huden noggrant efter hantering.

P271 Använd endast utomhus eller i ett välventilerat utrymme.

P280 Använd ögonskydd/ansiktsskydd.

P304 + P340 + P311 VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att personen andas utan problem. Ring en GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare.

P305 + P351 + P338 VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ut eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.

Om det har inträffat ett allvarligt tillbud medan denna enhet använts eller som ett resultat av att den har använts ska det rapporteras till tillverkaren och/eller dess auktoriserade representant samt myndigheten i ditt land.

Symbolförklaring

Symboler enligt definition i EN ISO 15223-1:2021

	Tillverkare		Katalognummer
	Se bruksanvisningen		Batchkod
	Auktoriserad representant i Europeiska gemenskapen/ Europeiska unionen		EU-försäkran om överensstämmelse (definieras i IVDR 2017/746)
	Utgångsdatum		Medicinteknisk produkt för in vitro-diagnostik
	Temperaturgräns		Försiktighet
	Tillverkningsdatum		Importör
	Anger den auktoriserade representanten i Schweiz		

Referenser

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2:a utg. Saunders, Philadelphia, 1972, sid. 62–63.
- Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9:e utg. Arlington (VA), 1985, sid. 320–322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4:e utg. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, sid. 511–512

Kontaktuppgifter

För att göra en beställning besöker du vår webbplats på [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). För teknisk service besöker du sidan för teknisk service på vår webbplats [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Revisionshistorik

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023
Överfört till ny mall med nuvarande varumärke. Specifierat "För yrkesmässigt bruk" under "Avsedd användning" och under "Försiktighetsåtgärder". Reviderat "Avsedd användning" så att det motsvarar riktlinjerna för IVDR. Uppdaterat "Materialsäkerhetsdatablad" till "Säkerhetsdatablad". Uppdaterat kontaktuppgifterna. Tagit bort anvisningen om att CLSI ska följas vid provtagning. Tagit bort EN 980 och ändrat till EN ISO 15223-1:2021 för symbolerna. Lagt till kontaktuppgifter för negativa händelser. Uppdaterat litteraturreferenserna. Lagt till en tabell över revisionshistoriken. Lagt till varningar och faror. Lagt till information om representant i Schweiz.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Initial M och Sigma-Aldrich är varumärken som tillhör Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland eller dess dotterbolag. Övriga varumärken tillhör respektive ägare. Detaljerad information om varumärken finns tillgänglig via allmänt tillgängliga resurser.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Instruções de utilização

Kit de Hemoglobina fetal

Procedimento N.º 285



Utilização prevista

Os reagentes para hemoglobina fetal destinam-se a ser utilizados como uma coloração histoquímica laboratorial geral para a determinação da hemoglobina fetal por eluição ácida em esfregaços de sangue. Os reagentes de coloração de hemoglobina fetal destinam-se a "Utilização para diagnóstico in vitro". Apenas para utilização profissional. Este manual, procedimento semi-quantitativo, deteta hemoglobina fetal em eritrócitos de amostras de esfregaços de sangue humano.

Os avanços nas técnicas de isolamento e caracterização de proteínas levaram à descoberta de que existem várias propriedades distintivas que permitem diferenciar a hemoglobina fetal da adulta. Entre estas encontra-se a resistência da hemoglobina fetal (hemoglobina F) à eluição ácida. Quando os esfregaços de sangue são imersos em tampão ácido, por exemplo, a hemoglobina adulta é eluída dos eritrócitos, enquanto que o mesmo não acontece com a hemoglobina fetal. Se os esfregaços de sangue forem tratados desta maneira e posteriormente corados, os eritrócitos com hemoglobina F ocuparão a coloração, enquanto que os que contêm apenas hemoglobina adulta aparecem como "fantasmas".

A técnica de lâmina para demonstrar a hemoglobina fetal em termos da sua resistência à eluição ácida foi originalmente proposta por Kleihauer et al.,¹ e posteriormente modificada por Shepard et al.² A Sigma produzida representa uma melhoria adicional nesta abordagem, conforme descrito por Oski e Naiman.³

Está a tornar-se cada vez mais comum nos casos de incompatibilidade de Rh suprimir as reações imunitárias aos glóbulos vermelhos que entram na circulação materna através do feto. A quantidade de gamaglobulina específica, contendo anti-Rh(D) a administrar, é calculada através da avaliação da magnitude da hemorragia fetal-materna.⁴

De acordo com a técnica descrita, os esfregaços de sangue, que foram devidamente secos e fixados, são imersos num tampão citrato de pH 3,3 a 37 °C. A hemoglobina A adulta (HbA) dissolve-se das células, enquanto que a hemoglobina fetal (HbF) que é resistente aos ácidos, permanece intracelular e pode ser corada para fins de exame microscópico.

Reagentes

Concentrado de Tampão fosfato-citrato (N.º de cat. 2851)

Citrato de sódio, 0,7 mol/l, e fosfato de sódio, 0,6 mol/l, clorórmio adicionado como conservante

Solução de Hematoxilina ácida (N.º de cat. 2852)

Hematoxilina, certificada, 1 g/l, C.I. 75290, sulfato de alumínio e amónio, iodatos de sódio e estabilizadores, pH 3,3

Solução de Eosina B (N.º de cat. 2853)

Eosina B, Solução aquosa a 0,1%, C.I. 45400. Azida de sódio, 0,1%, adicionada como conservante

Materiais especiais necessários mas não fornecidos

- Microscópio
- Lâminas para microscópio, lamelas
- Suporte de coloração/Jarras de Coplin
- Banho-maria, 37 °C
- Fixador de etanol (N.º de Cat. 2858) álcool etílico 80% v/v

Conservação e estabilidade

Conservar o Concentrado de Tampão fosfato-citrato no frigorífico (2–8 °C). Eliminar se houver evidências de crescimento microbiano.

Conservar a Solução de Tampão fosfato-citrato no frigorífico (2–8 °C). Estável durante 2 semanas. Utilizar uma alíquota fresca todos os dias. Eliminar se houver evidências de crescimento microbiano.

Armazenar a Solução de Hematoxilina ácida e a Solução de Eosina B à temperatura ambiente (18–26 °C). As soluções podem ser reutilizadas se forem conservadas em frascos de coloração firmemente selados num ambiente com luz ténue.

O Fixador de etanol deve ser conservado à temperatura ambiente. Conservar firmemente selado e como um líquido inflamável. A solução pode ser reutilizada mas deve ser eliminada se a fixação não for adequada.

Deterioração

Eliminar a Solução de Hematoxilina ácida quando o tempo necessário para uma coloração adequada exceder 8 minutos.

Preparação

A Solução de Tampão fosfato-citrato é preparada diluindo 1 volume de Concentrado de Tampão fosfato-citrato em 9 volumes de água.

A Solução de Hematoxilina ácida, a Solução de Eosina B e o Fixador de Etanol são fornecidos prontos a utilizar.

Precauções

Estes DIV destinam-se a utilização para diagnóstico in vitro num ambiente de laboratório clínico. Estes DIV destinam-se apenas a utilização profissional por pessoal qualificado. Os DIV da Sigma-Aldrich podem ser utilizados por técnicos de laboratório com formação no manuseamento de amostras humanas potencialmente infecciosas e na utilização de microscópios e outros equipamentos laboratoriais e com perceção cromática e acuidade visual para distinguir cores e outros objetos ao microscópio.

Devem seguir-se as precauções normais no manuseamento de reagentes laboratoriais. Eliminar os resíduos cumprindo todos os regulamentos locais, estatais, municipais ou nacionais.

Procedimento

Colheita de amostras

Todas as amostras devem ser rotuladas com clareza. Devem ser usados instrumentos adequados para a obtenção e preparação das amostras. Siga as instruções de utilização do fabricante.

Nenhum método de testagem conhecido pode oferecer uma garantia total de que as amostras sanguíneas ou tecido não transmitirão infeções. Por conseguinte, todos os derivados de sangue ou amostras de tecido devem ser considerados potencialmente infecciosos.

Pode ser utilizado sangue capilar ou venoso. O sangue capilar pode ser transferido diretamente para uma lâmina de microscópio limpa. O sangue venoso deve ser adicionado a um tubo contendo EDTA ou oxalato. Para fins de conveniência, use 1-2 gotas de Solução de EDTA a 2% (N.º de Cat. 2854) por ml de sangue (1 gota = 1 mg). Embora as misturas de sangue-EDTA tenham sido relatadas como sendo satisfatórias para utilização durante um período de até 2 semanas quando refrigeradas.² Os esfregaços devem ser preparados no prazo de 24 horas a partir da colheita de sangue em oxalato.⁴ Utilizando amostras do recém-nascido, recomenda-se que o sangue seja diluído com solução salina a 0,85%, visto que tais amostras têm um elevado teor de HbF. Os esfregaços de sangue não são estáveis e devem ser testados imediatamente após a sua preparação.

Notas

Para efeitos de controlo de qualidade, recomenda-se a inclusão de sangue de um adulto normal (HbA) e de um recém-nascido ou bebé (HbF) em cada série de testes. Barr and Shafer⁶ relatam que as lâminas de controlo positivo fixadas de sangue do cordão umbilical em EDTA podem ser conservadas até 1 ano a -20 °C, numa caixa de cartão selada. No entanto, os controlos negativos com EDTA não eluem completamente após serem armazenados durante mais de 2 meses a -20 °C. Estes investigadores sugerem a preparação de esfregaços positivos e negativos na mesma lâmina; fornecendo assim contrastes claros e rápidos como referência na leitura de lâminas de teste.

Intervalos normais⁷

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

Procedimento

1. A Solução de Tampão fosfato-citrato deve ser aquecida a 37 °C numa jarra de Coplin ou num tina de coloração.
2. Usando lâminas de microscópio limpas e rotuladas, efetuar esfregaços de sangue fino. Preparar lâminas de CONTROLO usando sangue HbF positivo (sangue de cordão) e sangue normal de adulto. Secar ao ar aproximadamente 10 minutos.
3. Fixar as lâminas submergindo em Fixador de Etanol durante 5 minutos, enxaguar cuidadosamente com água da torneira e deixar secar ao ar.
4. Submergir as lâminas de TESTE e CONTROLO na Solução de Tampão fosfato-citrato pré-aquecida a 37 °C durante 5 minutos. Agitar após 1 e 3 minutos de imersão. O grau de agitação pode ser variado para alcançar os resultados mais desejáveis. Enxaguar cuidadosamente com água destilada e secar ao ar **completamente** para evitar artefactos na coloração.
5. Corar as lâminas durante 3 minutos em Solução de Hematoxilina ácida. Enxaguar cuidadosamente as lâminas com água destilada e sacudir o excesso de água.
6. Efetuar a contracoloração durante 4 minutos com a Solução de eosina B a 0,1%. Enxaguar cuidadosamente com água destilada e deixar secar ao ar.
7. Colocar a lamela **seca** sobre a lâmina e examinar usando lente de imersão em óleo (1000X). A ausência de HbF é evidente pela presença de células fantasmas ao passo que a retenção de HbF faz com que as células surjam a vermelho vivo. **Não** aplicar óleo diretamente na lâmina. (**Nota:** Pode utilizar a ampliação de 400X, mas o campo maior resultante pode ser mais difícil de contar).

Características do desempenho

A proporção de eritrócitos contendo hemoglobina fetal pode ser estimada de várias formas. Ao estudar evidências de sangue materno de células contendo HbF, Oski e Naiman³ recomendaram o seguinte:

1. Contar o número total de eritrócitos em 5 campos e determinar o número médio por campo.
2. Contar o número total de eritrócitos contendo HbF profundamente corados em cerca de 30 campos e determinar o número médio por campo.
3. Calcular a percentagem de eritrócitos HbF com base no número total de eritrócitos por campo. Os resultados são relatados como a percentagem de HbF presente.

Segundo Oski e Naiman³ este método é capaz de detetar a partir de 0,1 ml de sangue fetal na circulação materna.

Se os resultados observados variarem dos resultados previstos, contacte a Assistência técnica da Sigma-Aldrich para obter ajuda.

Características do desempenho analítico

Os resultados do desempenho analítico para os testes indicados realizados em todas as estruturas alvo, confirmam uma sensibilidade de 100%, especificidade e repetibilidade.

N.º de cat.	Descrição do produto	Alvo	Especificidade intraensaio	Sensibilidade intraensaio	Especificidade interensaio	Sensibilidade interensaio
2851	Concentrado de Tampão fosfato-citrato	Hemoglobina fetal	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
2852	Solução de Hematoxilina ácida	Núcleos	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3
2853	Solução de Eosina B	Hemoglobina fetal	3 de 3	3 de 3	3 de 3	3 de 3

Avisos e Perigos

Consulte a Folha de Dados de Segurança e a rotulagem do produto para obter informações atualizadas sobre riscos, perigos ou segurança.

285C:



- H319 Provoca irritação ocular grave.
- H331 Tóxico por inalação. Frase(s) de prudência
- P261 Evitar respirar as névoas ou vapores.
- P264 Lavar a pele cuidadosamente após manuseamento.
- P271 Utilizar apenas ao ar livre ou em locais bem ventilados.
- P280 Usar proteção ocular/proteção facial.
- P304 + P340 + P311 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.
- P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Lavar cautelosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

285D:



- H319 Provoca irritação ocular grave.
- H331 Tóxico por inalação. Frase(s) de prudência
- P261 Evitar respirar as névoas ou vapores.
- P264 Lavar a pele cuidadosamente após manuseamento.
- P271 Utilizar apenas ao ar livre ou em locais bem ventilados.
- P280 Usar proteção ocular/proteção facial.
- P304 + P340 + P311 EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração. Contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico.
- P305 + P351 + P338 SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Lavar cautelosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

Caso tenha ocorrido algum incidente grave durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da sua utilização, comunique-o ao fabricante e/ou ao respetivo representante autorizado e à sua autoridade nacional.

Definições dos símbolos

Símbolos conforme definidos na norma EN ISO 15223-1:2021

	Fabricante		Número de catálogo
	Consultar as instruções de utilização		Código do lote
	Representante autorizado na Comunidade Europeia/ União Europeia		Declaração de Conformidade da União Europeia (definida na diretiva RDIV 2017/746)
	Data de validade		Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Limite de temperatura		Atenção
	Data de fabrico		Importador
	Indica o Representante Autorizado na Suíça		

Referências

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutaussstrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2ª ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.
- Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512

Informações de contacto

Para encomendar, visite o nosso site em [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Para Assistência técnica, visite a página de assistência técnica no nosso site [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Histórico de revisões

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023
Transferência para novo modelo com a marca atual. Especificação para utilização profissional na utilização prevista e nas precauções. Revisão da utilização prevista para alinhamento com as diretrizes do regulamento relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro (RDIV). Atualização de Folha de Dados de Segurança do Material para Folha de Dados de Segurança. Atualização das informações de contacto. Remoção da instrução para seguir o CLSI na colheita de amostras. Remoção da norma EN 980 e alteração para a norma EN ISO 15223-1:2021 nos símbolos. Adição de informações de contacto em caso de eventos adversos. Atualização das referências bibliográficas. Adição de uma tabela de histórico de revisões. Adição de Advertências e Perigos. Adicionadas informações CH-REP.	

Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany

Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Προειδοποιήσεις και κίνδυνοι

Ανατρέξτε στο Δελτίο δεδομένων ασφαλείας και στην επισήμανση προϊόντος για οποιαδήποτε ενημερωμένες πληροφορίες κινδύνων ή ασφαλείας.

285C:



- H319 Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.
- H331 Τοξικό σε περίπτωση εισπνοής. Δήλωση(εις) προφύλαξης
- P261 Αποφεύγετε να αναπνέετε σταγονίδια ή ατμούς.
- P264 Πλύνετε την επιδερμίδα σχολαστικά μετά τον χειρισμό.
- P271 Να χρησιμοποιείται μόνο σε ανοικτό ή καλά αεριζόμενο χώρο.
- P280 Να φοράτε μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.
- P304 + P340 + P311 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ: Μεταφέρετε τον παθόντα στον καθαρό αέρα και αφήστε τον να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή. Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό.
- P305 + P351 + P338 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Αν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, αν είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.

285D:



- H319 Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό.
- H331 Τοξικό σε περίπτωση εισπνοής. Δήλωση(εις) προφύλαξης
- P261 Αποφεύγετε να αναπνέετε σταγονίδια ή ατμούς.
- P264 Πλύνετε την επιδερμίδα σχολαστικά μετά τον χειρισμό.
- P271 Να χρησιμοποιείται μόνο σε ανοικτό ή καλά αεριζόμενο χώρο.
- P280 Να φοράτε μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/το πρόσωπο.
- P304 + P340 + P311 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ: Μεταφέρετε τον παθόντα στον καθαρό αέρα και αφήστε τον να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή. Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ/γιατρό.
- P305 + P351 + P338 ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Αν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, αν είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλένετε.

Εάν, κατά τη διάρκεια της χρήσης αυτού του βοηθήματος ή ως αποτέλεσμα της χρήσης του, έχει συμβεί κάποιο σοβαρό περιστατικό, παρακαλείστε να το αναφέρετε στον κατασκευαστή ή/και στον εξουσιοδοτημένο αντιπρόσωπό του και στην εθνική αρχή της χώρας σας.

Ορισμοί συμβόλων

Σύμβολα όπως ορίζονται στο EN ISO 15223-1:2021

	Κατασκευαστής		Αριθμός καταλόγου
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης		Αριθμός παρτίδας
	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα/ Ευρωπαϊκή Ένωση		Δήλωση συμμόρφωσης Ευρωπαϊκής Ένωσης (όπως ορίζεται στην οδηγία IVDR 2017/746)
	Ημερομηνία λήξης		In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Όριο θερμοκρασίας		Προσοχή
	Ημερομηνία παραγωγής		Εισαγωγέας
	Υποδεικνύει τον εξουσιοδοτημένο αντιπρόσωπο στην Ελβετία		

Βιβλιογραφικές αναφορές

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.
- Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512

Πληροφορίες επικοινωνίας

Για να κάνετε μια παραγγελία, παρακαλούμε επισκεφθείτε τον ιστότοπό μας στη διεύθυνση [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Για τεχνική εξυπηρέτηση, παρακαλούμε επισκεφθείτε τη σελίδα τεχνικής εξυπηρέτησης στον ιστότοπό μας στη διεύθυνση [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Ιστορικό αναθεωρήσεων

Αναθ. 4.0	2014
Αναθ. 5.0	2016
Αναθ. 6.0	2023
Έγινε μεταφορά σε νέο υπόδειγμα με την τρέχουσα επωνυμία. Προσδιορίστηκε για επαγγελματική χρήση στην προοριζόμενη χρήση και τις προφυλάξεις. Η προοριζόμενη χρήση αναθεωρήθηκε για ευθυγράμμιση με τις κατευθυντήριες γραμμές IVDR. Το Δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού ενημερώθηκε σε Δελτίο δεδομένων ασφαλείας. Ενημερώθηκαν οι πληροφορίες επικοινωνίας. Αφαιρέθηκε η οδηγία να ακολουθείται το CLSI για τη συλλογή δειγμάτων. Αφαιρέθηκε το EN 980 και άλλαξε σε EN ISO 15223-1:2021 για τα σύμβολα. Προστέθηκαν πληροφορίες επικοινωνίας για ανεπιθύμητα συμβάντα. Ενημερώθηκαν οι βιβλιογραφικές αναφορές. Προστέθηκε πίνακας ιστορικού αναθεωρήσεων. Προσθήκη προειδοποιήσεων και κινδύνων. Προστέθηκαν πληροφορίες εξουσιοδοτημένου αντιπροσώπου για την Ελβετία (CH-REP).	

	Sigma-Aldrich, Inc., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany +1(314) 771-5765		MDSS GmbH Schiffgraben 41 30175 Hannover, Germany		Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
	MDSS CH GmbH Laurenzenvorstadt 61 5000 Aarau Switzerland				

Το αρχικό γράμμα M και το Sigma-Aldrich είναι εμπορικά σήματα της Merck KGaA, Darmstadt, Germany ή των συνδεδεμένων με αυτήν εταιρειών. Όλα τα άλλα εμπορικά σήματα αποτελούν ιδιοκτησία των αντίστοιχων κατόχων. Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τα εμπορικά σήματα είναι διαθέσιμες μέσω δημοσίως προσβάσιμων πόρων.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Használati utasítás

Magzati hemoglobin készlet

285. sz. eljárás



Rendeltetésszerű használat

A magzati hemoglobin reagens a vérkenetben lévő magzati hemoglobin savas eluálással történő kimutatására szolgáló általános laboratóriumi hisztokémiai festék. A magzatihemoglobin-festő reagensek „*in vitro* diagnosztikai felhasználásra” szolgálnak. Kizárólag professzionális használatra. Ez a manuális, félkvantitatív eljárás kimutatja a magzati hemoglobint a humán vérkenetmintákban található eritrocitákból.

A fehérjeizolálás és -jellemzés technikáinak fejlődése ahhoz a felfedezéshez vezetett, hogy számos olyan megkülönböztető tulajdonság létezik, amely lehetővé teszi a magzati és a felnőtt hemoglobint megkülönböztetését. Ezek közé tartozik a magzati hemoglobin (hemoglobin F) savas eluálással szembeni rezisztenciája. Amikor a vérkeneteket például savas pufferbe merítik, a felnőttkori hemoglobint eluálódik az eritrocitákból, míg a magzati hemoglobin nem. Ha a vérkenetet így kezelik, majd megfestik, a hemoglobin F-et tartalmazó eritrociták elveszik a festéket, míg azok, amelyek csak felnőttkori hemoglobint tartalmaznak, „szellemképként” jelennek meg.

A magzati hemoglobint savas elúcióval szembeni ellenálló képessége alapján történő kimutatására szolgáló tárgylemezfestési technikát eredetileg Kleihauer és mtsai¹ javasolták, majd Shepard és mtsai² módosították. A gyártott Sigma termék további fejlesztést jelent ebben a megközelítésben, ahogy azt Oski és Naiman leírták.³

Rh-inkompatibilitás esetén egyre gyakoribbá válik a magzattól az anyai keringésbe bekerülő vörösvértestekre adott immunreakciók szuppresszálása. Az alkalmazandó, anti-Rh(D)-t tartalmazó specifikus gamma-globulin mennyiségét a magzati-anyai vérzés súlyosságának értékelésével számítják ki.⁴

A leírt technika szerint a megfelelően megszáritott és fixált vérkeneteket 37 °C-on citrát-pufferbe (pH: 3,3) merítik. A felnőttkori hemoglobin A (HbA) kioldódik a sejtekből, míg a saválló magzati hemoglobin (HbF) a sejten belül marad, és megfesthető mikroszkópos vizsgálathoz.

Reagens

Citrát-foszfát puffer koncentrátuma (kat. sz.: 2851)
Nátrium-citrát, 0,7 mol/l és nátrium-foszfát, 0,6 mol/l, tartósítószerként hozzáadott kloroformmal

Savas hematoxinoldat (kat. sz.: 2852)
Tanúsított hematoxin, 1 g/l, C.I. 75290; alumínium-ammonium-szulfát, nátrium-jodát és stabilizálószer, pH: 3,3

Eozin B oldat (kat. sz.: 2853)
Eozin B, 0,1%-os vizes oldat, C.I. 45400. Nátrium-azid (0,1%) tartósítószerként hozzáadva

Szükséges, de nem biztosított speciális anyagok

- Mikroszkóp
- Mikroszkópos tárgylemezek és fedőlemezek
- Festőállvány/küveták
- Vízfürdő, 37 °C
- Etanolos fixáló (kat. sz.: 2858), 80% (v/v) etil-alkohol

Tárolás és stabilitás

A citrát-foszfát puffer koncentrátumát hűtőszekrényben (2–8 °C) kell tárolni. Ha mikrobiális növekedés jelei tapasztalhatók, dobja ki.

A citrát-foszfát pufferoldatot hűtőszekrényben (2–8 °C) kell tárolni. 2 hétig stabil. Minden nap használjon friss alikvotot. Ha mikrobiális növekedés jelei tapasztalhatók, dobja ki.

A savas hematoxinoldatot és az eozin B oldatot szobahőmérsékleten (18–26 °C) kell tárolni. Az oldatokat újra fel lehet használni, ha azokat szorosan lezárít festőedényekben, tömptített fényben tárolják.

Az etanolos fixálót szobahőmérsékleten kell tárolni. Szorosan lezárva, gyűlékony folyadékként tárolandó. Az oldat újra felhasználható, de ha a használatával nem megfelelő a fixálás, ki kell dobni.

Bomlás

A savas hematoxinoldatot akkor kell kidobni, ha a megfelelő festődéshez szükséges idő meghaladja a 8 percet.

Előkészítés

A citrát-foszfát pufferoldat elkészítéséhez hígítson 1 térfogatrészt citrát-foszfát pufferkoncentrátumot 9 térfogatrészt vízzel.

A savas hematoxinoldat, az eozin B oldat és az etanolos fixáló használatra kész.

Óvintézkedések

Ezeket az *in vitro* diagnosztikai eszközöket klinikai laboratóriumi környezetben történő *in vitro* diagnosztikai felhasználásra szánták. Ezeket az *in vitro* diagnosztikai eszközöket csak képzett szakemberek használhatják. A Sigma-Aldrich *in vitro* diagnosztikai eszközöket olyan laboratóriumi személyzet üzemeltetheti, akik képzettek az esetlegesen fertőző emberi minták kezelésére, mikroszkópok és egyéb laboratóriumi berendezések használatában, valamint kellő színezékeléssel és látásélességgel rendelkeznek a színek és egyéb tárgyak mikroszkóp alatt történő megkülönböztetésére.

A laboratóriumi reagensok kezelése során a szokásos óvintézkedéseket kell követni. A hulladékot a helyi, állami, tartományi vagy nemzeti előírásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.

Eljárás

Mintavétel

Minden mintát egyértelműen fel kell címkézni. A mintavételhez és a minták elkészítéséhez megfelelő eszközöket kell használni. Kövesse a gyártó használati utasítását.

Egyetlen ismert vizsgálati módszer sem nyújt teljes bizonyosságot arra nézve, hogy a vérminták vagy szövetek nem továbbítanak fertőzést. Ezért minden vérkészítményt vagy szövetmintát potenciálisan fertőzőnek kell tekinteni.

Kapilláris- vagy vénás vér is használható. A kapillárisvér közvetlenül egy tiszta mikroszkópos tárgylemezre is felvihető. A vénás vérek EDTA-t vagy oxalátot tartalmazó csőbe kell kerülnie. A kényelem érdekében a vér 1 ml-éhez használjon 1-2 csepp 2%-os EDTA-oldatot (kat. sz.: 2854) (1 csepp = 1 mg). A beszámolókat szerint a vér-EDTA keverékek hűtőszekrényben történő tárolás esetén 2 hétig megfelelően felhasználhatók.² Az oxalátban gyűjtött vérből 24 órán belül kenetet kell készíteni.⁵ Újszülöttektől származó vérminták felhasználása esetén javasolt a vér 0,85%-os sóoldattal történő hígítása, mivel az ilyen minták HbF-tartalma magasabb. A vérkenetek nem stabilak, és az elkészítés után azonnal meg kell őket vizsgálni.

Megjegyzések

Minőség-ellenőrzési célból javasolt, hogy minden vizsgálatsorozatra bevegjenek egy normál felnőtt (HbA) és egy újszülötől vagy csecsemőtől (HbF) származó vérmintát. Barr és Shafer⁶ beszámolója alapján az EDTA-val a köldökzsinórvérből készült fixált pozitív kontroll tárgylemezek legfeljebb 1 évig tárolhatók –20 °C-on, lezárít kartondobozban. Az EDTA-val készült negatív kontrollok azonban nem eluálódnak teljesen, ha 2 hónapnál hosszabb ideig tárolták őket –20 °C-on. A kutatók azt javasolják, hogy ugyanazon tárgylemezre készítsenek pozitív és negatív keneteket is; így biztosítva referenciaként egyértelmű és gyors összehasonlítási lehetőséget a vizsgált tárgylemezeken.

Normál tartományok⁷

Életkor	Magzati hemoglobin (%)
Születéskor	50-90
< 2 év	0-4
> 2 év	0-2

Eljárás

1. A citrát-foszfát pufferoldatot küvetában vagy festőedényben 37 °C-ra kell melegíteni.
2. Tiszta, felcímkézett mikroszkópos tárgylemezek használatával készítsen vékony vérkenetet. Készítsen KONTROLL tárgylemezeket HbF-pozitív vér (köldökzsinórvér) és normál felnőtt vér felhasználásával. Hagyja levegőn száradni körülbelül 10 percig.
3. Fixálja a tárgylemezeket 5 percig tartó, etanolos fixálóba történő merítéssel, majd alaposan öblítse le őket csapvízzel és hagyja őket levegőn száradni.
4. Merítse a TESZT és KONTROLL tárgylemezeket előleegített citrát-foszfát pufferoldatba 37 °C-on 5 percig. 1 és 3 perc bemelegítés után rázogassa meg az edényt. A rázogatás erőssége változtatható a kívánt eredmények elérése érdekében. Végezzen alapos öblítést desztillált vízzel, és **teljesen** szárítsa meg a lemezeket levegőn, hogy elkerülje a festési műtermékek képződését.
5. Fesse a lemezeket 3 percig savas hematoxinoldattal. Alaposan öblítse le a tárgylemezeket desztillált vízzel, és rázza le a felesleges vizet.
6. Végezze el az ellenfestést a lemezekben 4 percig 0,1%-os eozin B oldatban. Alaposan öblítse le desztillált vízzel és hagyja a levegőn megszáradni.
7. Helyezzen **száraz** fedőlemezt a tárgylemezre, és vizsgálja meg olajimmerziós lencsével (1000x). A HbF hiányát a szellemképes sejtek jelenléte mutatja, míg a megmaradt HbF-ek miatt a sejtek élénkvrösek lesznek. **Ne** vigyen fel olajat közvetlenül a tárgylemezre. **(Megjegyzés:** 400x-os nagyítás is használható, de az így kapott nagyobb mezőt nehezebb megszámolni.)

Teljesítményjellemzők

A magzati hemoglobint tartalmazó eritrociták aránya többféleképpen becsülhető meg. A HbF-tartalmú sejtek anyai vérvizsgálata alapján Oski és Naiman³ ajánlása a következő:

1. Számolja meg az összes eritrocitát 5 mezőben, és határozza meg az egy mezőre eső átlagos számot.
2. Számolja meg az erősen festődött, HbF-tartalmú eritrocitákat 30 mezőben, és határozza meg az egy mezőre eső átlagos számot.
3. Számítsa ki a HbF-tartalmú eritrociták százalékos arányát a mezőnkénti eritrociták teljes száma alapján.

Az eredményeket a jelen lévő HbF százalékos értékeként kell jelenteni.

Oski és Naiman³ szerint ezzel a módszerrel akár 0,1 ml magzati vér is kimutatható az anyai keringésben.

Ha a megfigyelt eredmények eltérnek a várt eredményektől, kérjük, forduljon a Sigma-Aldrich műszaki szolgálatához segítségért.

Analitikai teljesítményjellemzők

Az adott tesztek analitikai teljesítményjellemzői az összes célstruktúrán vizsgálva 100% érzékenységet, specifitást és ismételhetőséget igazoltak.

Kat. sz.	Termékleírás	Cél	Tesztben belüli specifitás	Tesztben belüli érzékenység	Tesztek közötti specifitás	Tesztek közötti érzékenység
2851	Citrát-foszfát puffer koncentrátuma	Magzati hemoglobin	3/3	3/3	3/3	3/3
2852	Savas hematoxinoldat	Sejtmagok	3/3	3/3	3/3	3/3
2853	Eozin B oldat	Magzati hemoglobin	3/3	3/3	3/3	3/3

Figyelmeztetések és veszélyek

A frissített kockázati, veszélyességi és biztonsági információkért olvassa el a biztonsági adatlapot és a termék címkézését.

285C:



- H319 Súlyos szemirritációt okoz.
- H331 Belélegezve mérgező. Óvintézkedésre vonatkozó mondat(ok)
- P261 Kerülje a köd/gőzök belélegzését.
- P264 A használatot követően a bőrt alaposan meg kell mosni.
- P271 Kizárólag szabadban vagy jól szellőző helyiségben használható.
- P280 Szemvédő/arcvédő használata kötelező.
- P304 + P340 + P311 BELÉLEGZÉS ESETÉN: Az érintett személyt friss levegőre kell vinni, és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni. Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.
- P305 + P351 + P338 SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.

285D:



- H319 Súlyos szemirritációt okoz.
- H331 Belélegezve mérgező. Óvintézkedésre vonatkozó mondat(ok)
- P261 Kerülje a köd/gőzök belélegzését.
- P264 A használatot követően a bőrt alaposan meg kell mosni.
- P271 Kizárólag szabadban vagy jól szellőző helyiségben használható.
- P280 Szemvédő/arcvédő használata kötelező.
- P304 + P340 + P311 BELÉLEGZÉS ESETÉN: Az érintett személyt friss levegőre kell vinni, és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni. Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ/orvoshoz.
- P305 + P351 + P338 SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása.

Ha az eszköz használata során vagy annak használata következtében súlyos baleset történt, kérjük, jelentse azt a gyártónak és/vagy meghatalmazott képviselőjének és a helyi nemzeti hatóságnak.

Jelmagyarázat

Az EN ISO 15223-1:2021 szabványban meghatározott jelek

	Gyártó		Katalógusszám
	Lásd a használati utasítást		Gyártási tétel kódja
	Meghatalmazott képviselő az Európai Közösségben/ Európai Unióban		Az Európai Unió megfelelőségi nyilatkozata (az IVDR 2017/746 meghatározása szerint)
	Lejárat dátum		In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszköz
	Hőmérsékleti határértékek		Vigyázat!
	Gyártási dátum		Importőr
	A svájci hivatalos képviselőt jelöli		

Hivatkozások

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutaussstrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL. Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.
- Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512

Elérhetőségek

Megrendelés leadásához látogasson el weboldalunkra: [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Műszaki segítségért látogasson el weboldalunkra: [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Átdolgozási előzmények

Rev.: 4.0	2014
Rev.: 5.0	2016
Rev.: 6.0	2023
Áthelyezve az új sablonba a jelenlegi márkajelzéssel. A professzionális használatra vonatkozó megállapítás leírása a rendeltetésszerű használat és az óvintézkedések részekben. A rendeltetésszerű használatra vonatkozó részek átdolgozása az IVDR irányelveknek való megfelelés érdekében. Az Anyagbiztonsági adatlap frissítése Biztonsági adatlpra. Az elérhetőségek frissítése. A mintagyűjtés során a CLSI követésére vonatkozó utasítás eltávolítása. Az EN 980-as szabvány szerinti jelzések eltávolítása és az EN ISO 15223-1:2021 szabvány jelzéseire változtatása. A nemkívánatos eseményekkel kapcsolatos elérhetőségek hozzáadása. Frissített szakirodalmi hivatkozások. Átdolgozási előzménytáblázat hozzáadása. Figyelmeztetések és veszélyek hozzáadása. A CH-REP információ hozzáadva.	

	Sigma-Aldrich, Inc., 3050 Spruce Street, St. Louis, MO 63103 USA an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany +1(314) 771-5765		MDSS GmbH Schißgraben 41 30175 Hannover, Germany		Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
	MDSS CH GmbH Laurenzenvorstadt 61 5000 Aarau Switzerland				

Az „M” kezdőbetű és a Sigma-Aldrich a Merck KGaA (Darmstadt, Németország) vagy leányvállalatainak védjegyei. Minden egyéb védjegy a megfelelő tulajdonosok tulajdonát képezi. A védjegyekre vonatkozó részletes információk nyilvánosan hozzáférhető forrásokon keresztül érhetők el.

Návod k použití

Souprava pro stanovení fetálního hemoglobinu

Postup č. 285



Určené použití

Reagencie pro fetální hemoglobin jsou určeny k použití jako obecné laboratorní histochemické barvivo pro stanovení fetálního hemoglobinu v krevních nátěrech kyselou elucí. Činidla na barvení fetálního hemoglobinu jsou určena pro „diagnostické použití in vitro“. Pouze pro profesionální použití. Tento manuální semikvantitativní postup detekuje fetální hemoglobin v erytrocytech vzorků stěrů lidské krve.

Pokroky v technikách izolace a charakterizace bílkovin vedly k zjištění, že existuje několik rozlišovacích vlastností, které umožňují odlišit fetální od dospělého hemoglobinu. Mezi ně patří odolnost fetálního hemoglobinu (hemoglobin F) vůči kyselé eluci. Když se například krevní nátěry ponoří do kyselého pufru, dospělý hemoglobin se z erytrocytů eluuje, zatímco fetální hemoglobin nikoli. Pokud jsou krevní nátěry takto ošetřeny a následně obarveny, erytrocyty s hemoglobinem F zachytí barvivo, zatímco erytrocyty obsahující pouze dospělý hemoglobin se budou jevit jako „duchové“.

Techniku se sklíčky pro prokázání fetálního hemoglobinu z hlediska jeho odolnosti vůči kyselé eluci původně navrhl Kleihauer a kol.¹ a později upravil Shepard a kol.² Výrobek společnosti Sigma představuje další vylepšení tohoto přístupu, jak jej popsali Oski a Naiman.³

V případech Rh inkompatibility je stále běžnější potlačovat imunitní reakce na červené krvinky vstupující do krevního oběhu matky z plodu. Množství specifického gama globulinu obsahujícího anti Rh(D), které má být podáno, se vypočítá na základě posouzení závažnosti krvácení plodu a matky.⁴

Podle popsané techniky se krevní nátěry, které byly řádně vysušeny a fixovány, ponoří do citrátového pufru s pH 3,3 při 37 °C. Dospělý hemoglobin A (HbA) se v buňkách rozpustí, zatímco fetální hemoglobin (HbF), který je odolný vůči kyselinám, uvnitř buněk zůstává a může být obarven pro mikroskopické vyšetření.

Činidla

Konzentrát citrátového fosfátového pufru (kat. č. 2851)

Citronan sodný, 0,7 mol/l, a fosforečnan sodný, 0,6 mol/l, chloroform přidaný jako konzervační přísada

Roztok kyselého hematoxylinu (kat. č. 2852)

Hematoxylin, certifikovaný, 1 g/l, C.I. 75290, síran hlinito-amonný, jodičnany sodné a stabilizátory, pH 3,3

Roztok eosinu B (kat. č. 2853)

Eosin B, 0,1% vodný roztok, C.I. 45400. Azid sodný, 0,1%, přidaný jako konzervační přísada

Potřebné speciální materiály, které nejsou součástí dodávky

- Mikroskop
- Mikroskopická podložní sklíčka a krycí sklíčka
- Stojan na barvení / Coplinovy nádoby
- Vodní lázeň, 37 °C
- Ethanolový fixační prostředek (kat. č. 2858) 80% v/v ethylalkohol

Skladování a stabilita

Uchovávejte koncentrát citrátového fosfátového pufru v chladničce (2–8 °C). Pokud uvidíte známky mikrobiálního růstu, pufr zlikvidujte.

Uchovávejte roztok citrátového fosfátového pufru v chladničce (2–8 °C). Stabilní po dobu 2 týdnů. Každý den použijte čerstvou alikvotní část. Pokud uvidíte známky mikrobiálního růstu, roztok zlikvidujte.

Uchovávejte roztok kyselého hematoxylinu a roztok eosinu B při pokojové teplotě (18–26 °C). Roztoky mohou být znovu použity, pokud jsou skladovány v těsně uzavřených nádobách na barvení při tlumeném osvětlení.

Ethanolový fixační prostředek by měl být uchováván při pokojové teplotě. Uchovávejte pevně utěsněné a jako hořlavou kapalinu. Roztok může být znovu použit, ale pokud není fixace dostatečná, měl by být zlikvidován.

Znehodnocení

Roztok kyselého hematoxylinu zlikvidujte, pokud doba potřebná pro vhodné zbarvení přesáhne 8 minut.

Příprava

Citrátový fosfátový pufr se připraví zředěním 1 objemu koncentráту citrátového fosfátového pufru 9 objemy vody.

Roztok kyselého hematoxylinu, roztok eosinu B a ethanolový fixační prostředek jsou připraveny k použití.

Bezpečnostní opatření

Tyto diagnostické zdravotnické prostředky in vitro jsou určeny pro diagnostické použití in vitro v klinickém laboratorním prostředí. Tyto diagnostické zdravotnické prostředky in vitro jsou určeny pouze pro profesionální použití kvalifikovaným personálem. Diagnostické zdravotnické prostředky in vitro Sigma-Aldrich mohou být používány laboratorními pracovníky, kteří jsou vyškoleni k manipulaci s lidskými vzorky, které mohou být infekční, k používání mikroskopů a jiného laboratorního vybavení a jejich barevné vidění a ostrost zraku jsou dostatečné pro rozlišení barev a různých objektů pod mikroskopem.

Při zacházení s laboratorními činidly dodržujte běžná bezpečnostní opatření. Odpad zlikvidujte podle všech místních, regionálních či národních předpisů.

Postup

Odběr vzorků

Všechny vzorky musí být zřetelně označeny. Pro odběr a přípravu vzorků je nutno používat vhodné nástroje. Dodržujte návod výrobce k použití.

Žádná známá zkušební metoda nemůže nabídnout naprosté ujištění, že vzorky krve nebo tkáně nebudou zdrojem infekce. Všechny krevní deriváty nebo vzorky tkání je proto nutné považovat za potenciálně infekční.

Lze použít kapilární nebo žilní krev. Kapilární krev může být přenesena přímo na čisté podložní sklíčko mikroskopu. Žilní krev by měla být přidána do zkumavky obsahující EDTA nebo šfavelan. Pro pohodlné použití použijte 1–2 kapky 2% roztoku EDTA (kat. č. 2854) na 1 ml krve (1 kapka = 1 mg). Ačkoliv bylo hlášeno, že směsi krve a EDTA jsou vhodné pro použití po dobu až 2 týdnů při uchovávání v chladničce.⁵ Nátěry by měly být připraveny do 24 hodin z krve odebrané do šfavelanu.⁵ Při použití vzorků od novorozenců se doporučuje zředit krev 0,85% fyziologickým roztokem, protože tyto vzorky mají vysoký obsah HbF. Krevní nátěry nejsou stabilní a musí být testovány ihned po přípravě.

Poznámky

Pro účely kontroly kvality se doporučuje, aby byla do každé série testů zahrnuta krev normálního dospělého (HbA) a novorozence nebo kojence (HbF). Barr a Shafer⁶ hlásí, že fixní pozitivní kontrolní sklíčka z pupečnickové krve v EDTA lze uchovávat v uzavřené kartonové krabici až 1 rok při teplotě –20 °C. Negativní kontroly v EDTA se však po skladování po dobu delší než 2 měsíce při teplotě –20 °C zcela neeluuji. Tito výzkumníci navrhuji přípravu pozitivních a negativních nátěrů na stejném podložním sklíčku, čímž se zajistí jasné a rychlé kontrasty jako reference při čtení testovacích podložních sklíček.

Normální rozsahy⁷

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

Postup

1. Citrátový fosfátový pufr by měl být zahřátý v Coplinově nádobě nebo misce na barvení na 37 °C.
2. Pomocí čistých, označených mikroskopických podložních sklíček vytvořte tenké krevní nátěry. Připravte KONTROLNÍ sklíčka s použitím pozitivní HbF krve (pupečnickové krve) a normální dospělé krve. Vysušte na vzduchu po dobu přibližně 10 minut.
3. Zařijte sklíčka ponořením do ethanolového fixačního prostředku na dobu 5 minut, důkladně opláchněte vodou z vodovodu a vysušte na vzduchu.
4. ZKUŠEBNÍ a KONTROLNÍ sklíčka ponořte do předehřátého roztoku citrátového fosfátového pufru při teplotě 37 °C na dobu 5 minut. Po 1 a 3 minutách od ponoření protřeptejte. Míra protřeptání se může lišit, aby bylo dosaženo co nejlepších výsledků. Důkladně opláchněte destilovanou vodou a **zcela** vysušte na vzduchu, aby nedošlo k obarvení artefaktů.
5. Barvěte sklíčka po dobu 3 minut v roztoku kyselého hematoxylinu. Důkladně opláchněte destilovanou vodou a setřeptejte přebytečnou vodu.
6. Kontrastně barvěte sklíčka po dobu 4 minut v 0,1% roztoku eosinu B. Důkladně opláchněte destilovanou vodou a vysušte na vzduchu.
7. Položte **suché** krycí sklíčko na podložní sklíčko a prohlédněte je pomocí olejové imerze (1000X). Nepřítomnost HbF je patrná z přítomnosti stínových buněk – ghost cells – zatímco v případě výskytu HbF vypadají buňky jasné červeně. **Nenanášejte** olej přímo na podkladní sklíčko. (**Poznámka:** Lze použít zvětšení 400X, ale spočítat výsledné větší pole může být obtížnější.)

Pracovní charakteristiky

Podíl erytrocytů obsahujících fetální hemoglobin lze odhadnout několika způsoby. Při studiu důkazů buněk obsahujících HbF v krvi matek Oski a Naiman³ doporučili následující:

1. Spočítat celkový počet erytrocytů v 5 polích a určit průměrný počet na jedno pole.
2. Spočítat počet hluboce obarvených erytrocytů obsahujících HbF asi ve 30 polích a určit průměrný počet na jedno pole.
3. Vypočítat procento erytrocytů s HbF na základě celkového počtu erytrocytů na jedno pole.

Výsledky jsou uváděny jako procento přítomného HbF.

Podle Oskiho a Naimana³ je tato metoda schopna detekovat už 0,1 ml fetální krve v krevním oběhu matky.

Pokud se pozorované výsledky liší od očekávaných výsledků, obraťte se na technický servis společnosti Sigma-Aldrich.

Analytické pracovní charakteristiky

Analytické výsledky daných testů provedených na všech cílových strukturách potvrzují 100% citlivost, specifčnost a opakovatelnost.

Kat. č.	Popis produktu	Cíl	Specifičnost v rámci testu	Citlivost v rámci testu	Specifičnost mezi testy	Citlivost mezi testy
2851	Konzentrát citrátového fosfátového pufru	Fetální hemoglobin	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
2852	Roztok kyselého hematoxylinu	Jádra	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3
2853	Roztok eosinu B	Fetální hemoglobin	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3	3 ze 3

Varování a rizika

Aktuální informace o rizicích, nebezpečích a bezpečnosti si přečtěte v bezpečnostním listu a na označení výrobku.

285C:



H319 Způsobuje vážné podráždění očí.

H331 Toxický při vdechování. Pokyny pro bezpečné zacházení

P261 Zamezte vdechování mlhy nebo výparů.

P264 Po manipulaci si důkladně omyjte pokožku.

P271 Používejte pouze venku nebo na dobře větraném místě.

P280 Používejte ochranu očí/obličeje.

P304 + P340 + P311 PŘI VDECHNUTÍ: Odvedte postiženého na čerstvý vzduch a zajistěte mu pohodlné dýchání. Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO / lékaře.

P305 + P351 + P338 PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazené a dají se snadno vyjmout. Pokračujte ve vyplachování.

285D:



- H319 Způsobuje vážné podráždění očí.
- H331 Toxický při vdechování. Pokyny pro bezpečné zacházení
- P261 Zamezte vdechování mlhy nebo výparů.
- P264 Po manipulaci si důkladně omyjte pokožku.
- P271 Používejte pouze venku nebo na dobře větraném místě.
- P280 Používejte ochranu očí/obličeje.

P304 + P340 + P311 PŘI VDECHNUTÍ: Odvedte postiženého na čerstvý vzduch a zajistěte mu pohodlné dýchání. Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO / lékaře.

P305 + P351 + P338 PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, pokud jsou nasazené a dají se snadno vyjmout. Pokračujte ve vyplachování.

Pokud během používání tohoto prostředku nebo v důsledku jeho používání došlo k závažné nežádoucí příhodě, nahlase to výrobcí a/nebo jeho autorizovanému zástupci a vašemu národnímu úřadu.

Definice symbolů

Symbody definované v normě EN ISO 15223-1:2021

	Výrobce		Katalogové číslo
	Přečtěte si Návod k použití		Kód šarže
	Autorizovaný zástupce v Evropském společenství / Evropské unii		Prohlášení o shodě s předpisy Evropské unie (podle definice v IVDR 2017/746)
	Datum spotřeby		Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Teplotní limit		Upozornění
	Datum výroby		Dovozce
	Označuje autorizovaného zástupce ve Švýcarsku		

Reference

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.
- Technická příručka. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512

Kontaktní informace

Chcete-li podat objednávku, navštivte naše webové stránky na [SigmaAldrich.com](https://sigmaaldrich.com). Technický servis naleznete na stránkách technického servisu na naší webové stránce [SigmaAldrich.com/techservice](https://sigmaaldrich.com/techservice).

Historie revizí

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023

Přeneseno do nové šablony s aktuálním značením. Určeno pro profesionální použití v rámci určeného použití a bezpečnostních opatření. Revidované určené použití k dosažení souladu s pokyny IVDR. Aktualizovaný bezpečnostní list materiálu k bezpečnostnímu listu. Aktualizované kontaktní informace. Odstraněn pokyn k dodržení CLSI pro odběr vzorků. Odstraněna norma EN 980 a změněna na normu EN ISO 15223-1:2021 pro symboly. Přidány kontaktní informace pro případ nežádoucí události. Aktualizované reference na literaturu. Přidána tabulka historie revizí. Přidána varování a rizika. Přidány informace CH-REP.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Počáteční M a Sigma-Aldrich jsou ochranné známky společnosti Merck KGaA, Darmstadt, Německo nebo jejich přidružených společností. Všechny ostatní ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků. Podrobné informace o ochranných známkách jsou k dispozici prostřednictvím veřejně přístupných zdrojů.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Bruksanvisning

Føtalt hemoglobin-sett

Prosedyre nr. 285



Tiltenkt bruk

Føtalt hemoglobin-reagenser er beregnet for bruk som en generell laboratoriehistokjemisk farging for syreelueringsbestemmelse av føtalt hemoglobin i blodutstryk. Føtalt hemoglobin-fargingsreagenser er til "in vitro-diagnostisk bruk". Kun for profesjonell bruk. Denne manuelle, semikvantitative prosedyren påviser føtalt hemoglobin i erythrocytter fra humane blodutstryksprøver.

Fremskritt innen teknikker for proteinisolering og karakterisering førte til oppdagelsen av at det er flere kjennetegn som gjør det mulig å skjelne mellom føtalt og voksent hemoglobin. Blant disse er resistensen til føtalt hemoglobin (hemoglobin F) mot syreeluering. Når blodutstryk f.eks. nedsenkes i syrebuffer, elueres voksent hemoglobin fra erythrocyttene, mens føtalt hemoglobin ikke gjør det. Hvis blodutstryk behandles på denne måten og deretter farges, vil erythrocytter som har hemoglobin F ta opp fargingen, mens de som bare inneholder voksent hemoglobin vises som "spøkelse".

Objektglassteknikken for å vise det føtale hemoglobinet resistens mot syreeluering ble opprinnelig foreslått av Kleihauer et al.¹ og senere modifisert av Shepard et al.² Sigma som ble produsert, representerer en ytterligere forbedring i denne tilnærmingen, som beskrevet av Oski og Naiman.³

Det blir stadig mer vanlig i tilfeller med Rh-inkompatibilitet å undertrykke immunreaksjoner på røde blodlegemer som kommer inn i den maternale sirkulasjonen fra fosteret. Mengden spesifikt gammaglobulin, som inneholder anti-Rh(D) som skal administreres, beregnes ved å vurdere omfanget av føtal-maternal blødning.⁴

I henhold til beskrevet teknikk senkes blodutstryk, som er korrekt tørket og fiksert, ned i en sitratbuffer med pH 3,3 ved 37 °C. Voksent hemoglobin A (HbA) løses ut av cellene, mens føtalt hemoglobin (HbF) som er syreressistent, forblir intracellulært og kan farges for mikroskopisk undersøkelse.

Reagenser

Sitratfosfatbufferkonsentrat (kat.nr. 2851)
Natriumsitrat, 0,7 mol/l, og natriumfosfat, 0,6 mol/l, kloroform tilsatt som konserveringsmiddel

Syrehematoksylinløsning (kat.nr. 2852)
Hematoksylin, sertifisert, 1 g/l, C.I. 75290, aluminiumsammoniumsulfat, natriumjodater og stabiliseringsmidler, pH 3,3

Eosin B-løsning (kat.nr. 2853)
Eosin B, 0,1 %, vandig løsning, C.I. 45400. Natriumazid, 0,1 %, tilsatt som konserveringsmiddel

Spesielle materialer som kreves, men som ikke medfølger

- Mikroskop
- Mikroskopobjektglass, dekkglass
- Fargestativ/Coplin-beholdere
- Vannbad, 37 °C
- Etanolfiksativ (kat.nr. 2858) 80 % volum/volum etylalkohol

Oppbevaring og stabilitet

Oppbevar sitratfosfatbufferkonsentrat i kjøleskap (2–8 °C). Kast ved tegn på mikrobiell vekst.
Oppbevar sitratfosfatbufferløsning i kjøleskap (2–8 °C). Stabil i 2 uker. Bruk en fersk alikvot hver dag. Kast ved tegn på mikrobiell vekst.

Oppbevar syrehematoksylinløsning og eosin B-løsning i romtemperatur (18–26 °C). Løsninger kan brukes på nytt hvis de oppbevares i tett lukkede fargingsbeholdere i dempet lys.

Etanolfiksativ skal oppbevares i romtemperatur. Oppbevares tett lukket og som brennbar væske. Løsningen kan brukes på nytt, men skal kastes ved utilstrekkelig fiksering.

Forringelse

Kast syrehematoksylinløsningen når mer enn 8 minutter kreves for egnet farging.

Fremstilling

Sitratfosfatbufferløsning fremstilles ved å fortynne 1 volum sitratfosfatbufferkonsentrat med 9 volum vann.

Syrehematoksylinløsningen, eosin B-løsningen og etanolfiksativet er klare til bruk.

Forsiktighetsregler

Disse IVD-ene er tiltenkt for in vitro-diagnostisk bruk i et klinisk laboratoriemiljø. Disse IVD-ene er kun for profesjonell bruk av kvalifisert personell. Sigma-Aldrich-IVD-er kan betjenes av laboratoriepersonell som er opplært i å håndtere humane prøver som kan være smittsomme, bruke mikroskoper og annet laboratorieutstyr og som har fargeoppfatning og synsskarphet for å skille farger og andre elementer under et mikroskop.

Normale forsiktighetsregler for håndtering av laboratoriereagenser bør følges. Avfall må kastes i samsvar med alle lokale, statlige, provinsielle eller nasjonale forskrifter.

Prosedyre

Prøvetaking

Alle prøvene må være tydelig merket. Egnede instrumenter må brukes til å samle inn og klargjøre prøver. Følg bruksanvisningen fra produsenten.

Ingen kjent testmetode kan fullt ut forsikre at blodprøver eller vev ikke utgjør en smittefare. Alle bloderivater eller vevsprøver bør derfor betraktes som potensielt smittefarlige.

Enten kapillært eller venøst blod kan brukes. Kapillært blod kan overføres direkte til et rent objektglass. Venøst blod skal tilsettes i et rør som inneholder EDTA eller oksalat. For enkelthets skyld bruk 1–2 dråper 2 % EDTA-løsning (kat.nr. 2854) per ml blod (1 dråpe = 1 mg). Selv om blod-EDTA-blandinger er rapportert å være tilfredsstillende for bruk i opptil 2 uker i kjøleskap.² Utstryk bør fremstilles innen 24 timer fra blod samlet inn i oksalat.³ Ved bruk av prøver fra nyfødte anbefales det at blodet fortynnes med 0,85 % saltvann, siden slike prøver har et høyt innhold av HbF. Blodutstryk er ikke stabile og må testes umiddelbart etter fremstilling.

Merknader

For kvalitetskontrollformål anbefales det at blod fra en normal voksen (HbA) og fra en nyfødt eller et spedbarn (HbF) inkluderes i hver testserie. Barr og Shafer⁶ rapporterer at fikserte positive kontrollobjektglass fra navlestrengsblod i EDTA kan bevares i opptil 1 år ved -20 °C, i en forseglett pappeske. EDTA-negative kontroller elueres imidlertid ikke fullstendig etter å ha vært oppbevart i mer enn 2 måneder ved -20 °C. Disse utprøverne foreslår å fremstille positive og negative utstryk på samme objektglass, hvilket gir tydelige og raske kontraster som referanse ved avlesning av testobjektglass.

Normale områder ⁷	
Alder	Føtalt hemoglobin (%)
Ved fødselen	50–90
< 2 år	0–4
> 2 år	0–2

Prosedyre

1. Sitratfosfatbufferløsning skal varmes opp til 37 °C i en Coplin-beholder eller fargingsskål.
2. Bruk rene, merkede objektglass til å lage tynne blodutstryk. Fremstill KONTROLL-objektglass ved å bruke positivt HbF-blod (navlestrengsblod) og normalt blod fra voksne. Lufttørk i omtrent 10 minutter.
3. Fikser objektglassene ved å senke dem ned i etanolfikseringsmiddel i 5 minutter, skylle grundig med vann fra springen og lufttørk.
4. Senk TEST- og KONTROLL-objektglass ned i forvarmet sitratfosfatbufferløsning ved 37 °C i 5 minutter. Rist etter 1 og 3 minutters nedsenking. Graden av rising kan varieres for å oppnå de mest ønskelige resultatene. Skyll grundig med destillert vann og lufttørk **helt** for å unngå fargingsartefakter.
5. Farg objektglassene 3 minutter i syrehematoksylinløsning. Skyll objektglassene grundig med destillert vann og rist av overflødig vann.
6. Kontrastfarg objektglass 4 minutter i 0,1 % eosin B-løsning. Skyll grundig med destillert vann og lufttørk.
7. Plasser **tørt** dekkglass på objektglasset og undersøk ved bruk av oljenedsenking (1000X). Fargeset av HbF er tydelig ved tilstedeværelsen av spøkelsesceller, mens bevart HbF får celler til å se knallrøde ut. Påfør **ikke** olje direkte på objektglasset. (**Merke:** 400X forstørrelse kan brukes, men det resulterende større feltet kan være vanskeligere å telle.)

Ytelsesegenskaper

Andelen erythrocytter som inneholder føtalt hemoglobin, kan estimeres på flere måter. Når de undersøkte holdepunkter for HbF-holdige celler i maternalt blod, anbefalte Oski og Naiman³ følgende:

1. Tell totalt antall erythrocytter i 5 felt og bestem gjennomsnittlig antall per felt.
2. Tell antallet dypt fargede HbF-holdige erythrocytter i omtrent 30 felt og bestem gjennomsnittlig antall per felt.
3. Beregn prosentandelen av HbF-erythrocytter på grunnlag av det totale antallet erythrocytter per felt.

Resultatene rapporteres som forekomsten av HbF i prosent.

Ifølge Oski og Naiman³ er denne metoden i stand til å oppdage så lite som 0,1 ml føtalt blod i den maternale sirkulasjonen.

Hvis observerte resultater avviker fra forventede resultater, kontakt teknisk service hos Sigma-Aldrich for å få hjelp.

Analytiske ytelsesegenskaper

De analytiske ytelsesresultatene for de gitte testene utført på alle målstrukturer bekrefter 100 % følsomhet, spesifisitet og repetérbarhet.

Kat. nr.	Produkt-beskrivelse	Mål	Spesifisitet innen analyse	Følsomhet innen analyse	Spesifisitet mellom analyser	Følsomhet mellom analyser
2851	Sitratfosfatbuffer-konsentrat	Føtalt hemoglobin	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
2852	Syrehematoksylin-løsning	Kjerner	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3
2853	Eosin B-løsning	Føtalt hemoglobin	3 av 3	3 av 3	3 av 3	3 av 3

Advarsler og farer

Se sikkerhetsdatablad og produktmerking for oppdatert risiko-, fare- eller sikkerhetsinformasjon.

285C:



H319 Gir alvorlig øyeirritasjon.

H331 Giftig ved innånding. Sikkerhetssetning(er).

P261 Unngå innånding av tåke eller damp.

P264 Vask huden grundig etter bruk.

P271 Brukes bare utendørs eller i et godt ventilert område.

P280 Benytt øyevern/ansiktsvern.

P304 + P340 + P311 VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet. Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER / en lege.

P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.

285D:



H319 Gir alvorlig øyeirritasjon.

H331 Giftig ved innånding. Sikkerhetssetning(er).

P261 Unngå innånding av tåke eller damp.

P264 Vask huden grundig etter bruk.

P271 Brukes bare utendørs eller i et godt ventilert område.

P280 Benytt øyevern/ansiktsvern.

P304 + P340 + P311 VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet. Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER / en lege.

P305 + P351 + P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.

Hvis det har oppstått en alvorlig hendelse under bruk av denne enheten eller som et resultat av bruken, rapporter det til produsenten og/eller produsentens autoriserte representant og til din nasjonale myndighet.

Symbolforklaring

Symboler som definert i EN ISO 15223-1:2021

	Produsent		Katalognummer
	Se bruksanvisning		Batchkode
	Autorisert representant i Det europeiske fellesskap / EU		EU-samsvarserklæring (definert i IVDR 2017/746)
	Best før-dato		In vitro-diagnostisk medisinsk utstyr
	Temperaturgrense		Forsiktighetsregel
	Produksjonsdato		Importør
	Angir autorisert representant i Sveits		

Referanser

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutaussstrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.
- Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512

Kontaktinformasjon

For å legge inn en bestilling, besøk nettstedet vårt på SigmaAldrich.com. Besøk siden for teknisk service på nettstedet vårt på SigmaAldrich.com/techservice for teknisk service.

Revisjonshistorikk

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023
Overførte til ny mal med gjeldende varemerke. Spesifiserte at utstyret er for profesjonell bruk, i tiltenkt bruk og forsiktighetsregler. Reviderte tiltenkt bruk for å overholde IVDR-retningslinjer. Oppdaterte materialsikkerhetsdatablad til sikkerhetsdatablad. Oppdaterte kontaktinformasjon. Fjernet instruksjon om å følge CLSI for prøvetaking. Fjernet EN 980 og endret til EN ISO 15223-1:2021 for symboler. La til kontaktinformasjon for bivirkninger. Oppdaterte litteraturreferanser. La til en tabell med revisjonshistorikk. La til advarsler og farer. La til informasjon om CH-REP.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Initialen M og Sigma-Aldrich er varemerker for Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland eller dets tilknyttede selskaper. Alle andre varemerker tilhører sine respektive eiere. Detaljert informasjon om varemerker er tilgjengelig via offentlig tilgjengelige ressurser.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Kullanma Talimatı

Fetal Hemoglobin Kiti

Prosedür No. 285



Kullanım Amacı

Fetal Hemoglobin reaktifleri, kan smear'larındaki fetal hemoglobinin asit elüsyonuyla belirlenmesi için genel laboratuvar histokimyasal boyası olarak kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Fetal Hemoglobin boya reaktifleri "In Vitro Tanı Amaçlı Kullanım" içindir. Yalnızca profesyonel kullanım içindir. Bu manuel, yarı kantitatif prosedür, insan kan smear numunelerinin eritositlerinde fetal hemoglobin sapar.

Protein izolasyonu ve karakterizasyonuna yönelik tekniklerdeki gelişmeler, fetal hemoglobini yetişkin hemoglobininin ayırt etmeyi mümkün kılan birkaç ayırt edici özelliğin keşfedilmesine yol açmıştır. Bunlar arasında fetal hemoglobinin (hemoglobin F) asit elüsyonuna direnci vardır. Örneğin kan smear'ları asit tamponuna daldırıldığında, yetişkin hemoglobini eritositlerden ayrıştırılırken, fetal hemoglobin ayrıştırılmaz. Kan smear'ları bu şekilde işlenir ve ardından boyanırsa, hemoglobini F'ye sahip eritositler boyayı tutarken sadece yetişkin hemoglobini içerenler "hayalet" olarak görünür.

Asit elüsyonuna direnci açısından fetal hemoglobinin gösterilmesine yönelik lam tekniği ilk olarak Kleihauer et al.¹ tarafından önerilmiş ve daha sonra Shepard et al.² tarafından modifiye edilmiştir. Üretilen Sigma, Oski ve Naiman³ tarafından tanımlandığı şekilde bu yaklaşımda daha fazla gelişmeyi temsil etmektedir.

Rh uyumsuzluğu vakalarında, fetüsten maternal dolaşıma giren kırmızı kan hücrelerine karşı immün reaksiyonları baskılamak giderek yaygınlaşmaktadır. Uygulanacak anti Rh(D) içeren spesifik gama globulin miktarı, fetal-maternal kanamanın büyüklüğü değerlendirilerek hesaplanır.⁴

Açıklanan tekniğe göre, uygun şekilde kurutulan ve sabitlenen kan smear'ları, 37°C'de pH 3,3 olan bir sitrat tamponuna daldırılır. Olgun hemoglobin A (HbA) hücrelerin dışında çözünürken, aside dirençli olan fetal hemoglobin (HbF) hücre içinde kalır ve mikroskopik inceleme için boyanabilir.

Reaktifler

Sitrat Fosfat Tampon Konsantresi (Kat. No. 2851)

Sodyum sitrat, 0,7 mol/L ve sodyum fosfat, 0,6 mol/L, koruyucu olarak kloroform eklenir.

Asit Hematoksilen Çözeltisi (Kat. No. 2852)

Hematoksilen, sertifikalı, 1 g/L, C.I. 75290, alüminyum amonyum sülfat, sodyum iyodatl ve stabilizatörler, pH 3,3.

Eosin B Çözeltisi (Kat. No. 2853)

Eosin B, %0,1, sulu çözelti, C.I. 45400. Sodyum azit, %0,1, koruyucu olarak eklenir.

Sağlanmayan Gerekli Özel Malzemeler

- Mikroskop.
- Mikroskop lamaları, lamelleri
- Boyama rafı/Coplin kavanozları
- Su banyosu, 37°C
- Etanol Fiksatif (Kat. No. 2858) %80 h/h etil alkol

Saklama ve Stabilité

Sitrat Fosfat Tampon Konsantresini buzdolabında (2–8°C) saklayın. Mikrobiyal üreme belirginse atın.

Sitrat Fosfat Tampon Çözeltisini buzdolabında (2–8°C) saklayın. 2 hafta boyunca stabildir. Her gün yeni bir alikot kullanın. Mikrobiyal üreme belirginse atın.

Asit Hematoksilen Çözeltisi ve Eosin B Çözeltisini oda sıcaklığında (18–26°C) saklayın. Çözeltiler, loş ışıktaki ağzı sıkıca kapalı boyama kavanozlarında saklanırsa yeniden kullanılabilir.

Etanol Fiksatif oda sıcaklığında saklanmalıdır. Ağzı sıkıca kapalı ve yanıcı bir sıvı olarak saklayın. Çözelti yeniden kullanılabilir ancak fiksasyon yeterli değilse atılmalıdır.

Bozulma

Uygun boyama için gereken süre 8 dakikayı geçerse Asit Hematoksilen Çözeltisini atın.

Hazırlama

Sitrat Fosfat Tampon Çözeltisi, 1 ölçü Sitrat Fosfat Tampon Konsantresini 9 ölçü su ile seyrelterek hazırlanır.

Asit Hematoksilen Çözeltisi, Eosin B Çözeltisi ve Etanol Fiksatif kullanıma hazırdır.

Önemler

Bu IVD'ler, klinik laboratuvar ortamında in vitro tanı amaçlı kullanıma yöneliktir. Bu IVD'ler yalnızca kalifiye personel tarafından profesyonel kullanım içindir. Sigma-Aldrich IVD'ler, bulaşıcı olabilen insan numunelerini işlemek, mikroskop ve diğer laboratuvar ekipmanlarını kullanmak üzere eğitilmiş, renkleri ve mikroskop altında diğer nesneleri ayırt etmek için renk algısına ve görme keskinliğine sahip laboratuvar personeli tarafından kullanılabilir.

Laboratuvar reaktiflerini kullanırken uygulanan normal önlemlere uyulmalıdır. Atıkları tüm yerel, eyalet, il veya ulusal seviyedeki yönetmeliklere uygun olarak atın.

Prosedür

Numune Toplama

Tüm numuneler net bir şekilde etiketlenmelidir. Numune almak ve hazırlamak için uygun aletler kullanılmalıdır. Üreticinin kullanım talimatlarını izleyin.

Bilinen hiçbir test yöntemi, kan numunelerinin veya dokunun enfeksiyon bulaştırmayacağını tam olarak garanti edemez. Bu nedenle, tüm kan türevleri veya doku numuneleri potansiyel olarak bulaşıcı kabul edilmelidir.

Kapiller veya venöz kan kullanılabilir. Kapiller kan doğrudan temiz bir mikroskop lamına aktarılabilir. EDTA veya oksalat içeren bir tüpe venöz kan eklenmelidir. Kolaylık sağlamak için, mL kan başına 1–2 damla %2 EDTA Çözeltisi (Kat. No. 2854) kullanın (1 damla = 1 mg). Kan-EDTA karışımının buzdolabında 2 haftaya kadar kullanım için tatmin edici olduğu bildirilmiş olsa da,² smear'lar oksalat içinde kan toplandıktan sonra 24 saat içinde hazırlanmalıdır.⁵ Yenidoğandan alınan numuneler kullanılarak, bu tür numuneler yüksek HbF içeriğine sahip olduğundan, kanın %0,85 salinle seyreltilmesi önerilir. Kan smear'ları stabil değildir ve hazırlandıktan hemen sonra test edilmelidir.

Notlar

Kalite kontrol amacıyla, her bir test serisine normal bir yetişkinden (HbA) ve yeni doğmuş bir bebekten (HbF) alınan kanların dahil edilmesi önerilir. Barr ve Shafer⁶, EDTA'lı kordon kanından alınan sabit pozitif kontrol lamalarının, kapalı bir karton kutuda –20°C'de 1 yıla kadar korunabileceğini bildirmiştir. Ancak, EDTA negatif kontrolleri –20°C'de 2 aydan fazla saklandıktan sonra tamamen ayrışmaz. Bu araştırmacılar aynı lam üzerinde pozitif ve negatif smear hazırlamayı önermektedir; böylece test lamaları okurken referans olarak net ve hızlı karşılaştırma sağlanır.

Normal Aralıklar⁷

Yaş	Fetal Hemoglobin (%)
Doğumda	50-90
< 2 yaş	0-4
> 2 yaş	0-2

Prosedür

1. Sitrat Fosfat Tampon Çözeltisi, bir Coplin kavanozu veya boyama kabı içinde 37°C'ye ısıtılmalıdır.
2. Temiz, etiketli mikroskop lamaları kullanarak ince kan smear'ları oluşturun. Pozitif HbF kanı (kordon kanı) ve normal yetişkin kanı kullanarak KONTROL lamalarını hazırlayın. Yaklaşık 10 dakika kurumaya bırakın.
3. Etanol Fiksatif 5 dakika daldırarak lamalara fiksasyon uygulayın, musluk suyuyla iyice durulayın ve kurumaya bırakın.
4. TEST ve KONTROL lamalarını 37°C'de önceden ısıtılmış Sitrat Fosfat Tampon Çözeltisine 5 dakika daldırın. 1 ve 3 dakika daldırmadan sonra çalkalayın. Çalkalama seviyesi, arzu edilen sonuçlara ulaşmak için değiştirilebilir. Boyama artefaktlarını önlemek için distile suyla iyice durulayın ve **tamamen** kurumaya bırakın.
5. Lamalara Asit Hematoksilen Çözeltisinde 3 dakika boyama yapın. Lamaları distile suda iyice durulayın ve fazla suyu atın.
6. Lamaları %0,1 Eosin B Çözeltisinde 4 dakika zıt boyama yapın. Distile suda iyice durulayın ve kurumaya bırakın.
7. Lam üzerine **kuruy** lameli yerleştirin ve yağa batırarak inceleyin (1000X). HbF'nin yokluğu, hayalet hücrelerin varlığından anlaşılırken tutulan HbF, hücrelerin parlak kırmızı görünmesine neden olur. Lama doğrudan yağ **uygulamayın**. (**Not:** 400X büyütme kullanılabilir, ancak ortaya çıkan daha büyük alanda sayım gerçekleştirmek daha zor olabilir.)

Performans Özellikleri

Fetal hemoglobin içeren eritositlerin oranı çeşitli şekillerde tahmin edilebilir. HbF içeren hücrelerin maternal kandaki kanıtlarını incelerken, Oski ve Naiman³ aşağıdakileri tavsiye etmektedir:

1. 5 alandaki toplam eritosit sayısını hesaplayın ve alan başına ortalama sayıyı belirleyin.
2. Yaklaşık 30 alandaki derinlemesine boyanmış HbF içeren eritosit sayısını hesaplayın ve alan başına ortalama sayıyı belirleyin.
3. Alan başına toplam eritosit sayısını baz alarak HbF eritosit yüzdesini hesaplayın.

Sonuçlar, mevcut HbF yüzdesi olarak rapor edilir.

Oski ve Naiman'a³ göre bu yöntem, maternal dolaşımda 0,1 mL kadar küçük miktarda bir fetal kanı saptayabilmektedir.

Gözlemlenen sonuçlar beklenen sonuçlardan farklıysa, yardım için lütfen Sigma-Aldrich Teknik Servisi ile iletişime geçin.

Analitik Performans Özellikleri

Tüm hedef yapılar üzerinde yürütülen belirli testlere ait analitik performans sonuçları %100 duyarlılık, özgüllük ve tekrarlanabilirliği doğrulamaktadır.

Kat. No.	Ürün Tanımı	Hedef	Tahlil İçi Özgüllük	Tahlil İçi Duyarlılık	Tahliiller Arası Özgüllük	Tahliiller Arası Duyarlılık
2851	Sitrat Fosfat Tampon Konsantresi	Fetal Hemoglobin	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
2852	Asit Hematoksilen Çözeltisi	Çekirdekler	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3
2853	Eosin B Çözeltisi	Fetal Hemoglobin	3'te 3	3'te 3	3'te 3	3'te 3

Uyarılar ve Tehlikeler

Güncellenmiş herhangi bir risk, tehlike veya güvenlik bilgisi için Güvenlik Veri Formuna ve ürün etiketine bakın.

285C:



H319 Ciddi göz tahrişine neden olur.

H331 Solunması durumunda toksiktir. Önlem açıklamaları.

P261 Sisini veya buharını solumayın.

P264 Elleçlemeden sonra cildinizi iyice yıkayın.

P271 Sadece dışarıda veya iyi havalandırılan bir alanda kullanın.

P280 Göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

P304 + P340 + P311 SOLUNMASI HALİNDE: Kişiyi temiz havaya çıkarın ve rahatça nefes alabileceği bir durumda tutun. Bir ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİ/doktoru arayın.

P305 + P351 + P338 GÖZLE TEMASI HALİNDE: Birkaç dakika suda dikkatlice durulayın. Varsa ve yapması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin.

285D:



H319 Ciddi göz tahrişine neden olur.

H331 Solunması durumunda toksiktir. Önlem açıklamaları.

P261 Sisini veya buharını solumayın.

P264 Elleçlemeden sonra cildinizi iyice yıkayın.

P271 Sadece dışarıda veya iyi havalandırılan bir alanda kullanın.

P280 Göz koruyucu/yüz koruyucu kullanın.

P304 + P340 + P311 SOLUNMASI HALİNDE: Kişiyi temiz havaya çıkarın ve rahatça nefes alabileceği bir durumda tutun. Bir ZEHİR DANIŞMA MERKEZİNİ/doktoru arayın.

P305 + P351 + P338 GÖZLE TEMASI HALİNDE: Birkaç dakika suda dikkatlice durulayın. Varsa ve yapması kolaysa kontakt lensleri çıkarın. Durulamaya devam edin.

Bu cihazın kullanımı sırasında veya kullanımı sonucunda ciddi bir olay meydana gelirse, lütfen bunu üreticiye ve/veya yetkili temsilcisine ve ulusal yetkili makamınıza bildirin.

Sembol Tanımları

EN ISO 15223-1:2021'de tanımlanan semboller

	Üretici		Katalog Numarası
	Kullanma Talimatına bakın		Parti Kodu
	Avrupa Topluluğu'nda/Avrupa Birliği'nde Yetkili Temsilci		Avrupa Birliği Uygunluk Beyanı (IVDR 2017/746'da tanımlanmıştır)
	Son Kullanma Tarihi		İn vitro tanı amaçlı tıbbi cihaz
	Sıcaklık Sınırı		Dikkat
	Üretim Tarihi		İthalatçı
	İsviçre'deki Yetkili Temsilciyi Belirtir		

Referanslar

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.
- Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512

İletişim Bilgileri

Sipariş vermek için lütfen [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com) adresinden web sitemizi ziyaret edin. Teknik Servis için lütfen [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice) adresinden web sitemizin teknik servis sayfasını ziyaret edin.

Revizyon Geçmişi

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023

Mevcut markalama ile yeni şablona aktarıldı. Kullanım amacı ve önlemler bölümünde profesyonel kullanım amaçlı olduğu belirtildi. Kullanım amacı, IVDR yönergelerine uyumlu şekilde revize edildi. Malzeme Güvenlik Bilgi Formu, Güvenlik Bilgi Formu olarak güncellendi. İletişim bilgileri güncellendi. Numune toplama için CLSI'yi takip etme talimatı kaldırıldı. Semboller için EN 980 kaldırıldı ve EN ISO 15223-1:2021 olarak değiştirildi. Advers olay iletişim bilgileri eklendi. Literatür referansları güncellendi. Bir revizyon geçmişi tablosu eklendi. Uyarılar ve Tehlikeler eklendi. İsviçre'deki yetkili temsilci bilgileri eklendi.



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Initial M ve Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Almanya veya bağlı kuruluşlarının ticari markalandır. Diğer tüm ticari markalar ilgili sahiplerinin mülkiyetindedir. Ticari markalar hakkında ayrıntılı bilgi, herkesin erişebileceği kaynaklar aracılığıyla edinilebilir.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.

Käyttöohje

Fetaalihemoglobiinipakkaus

Menetelmänro 285



Käyttötarkoitus

Fetaalihemoglobiiniireagenssit on tarkoitettu käytettäväksi histokemiallisena väriaineena yleisessä laboratoriotöissä fetaalihemoglobiinin Kleihauer-Betken määrityksessä veren sivelynäytteistä. Fetaalihemoglobiinvärjäysreagenssit on tarkoitettu "in vitro -diagnostiikkaan". Vain ammattilaisten käyttöön. Tämä manuaalinen, semikvantitatiivinen menetelmä tunnistaa ihmisveren sivelynäytteiden erytrosyyteissä olevan fetaalihemoglobiinin.

Proteiinien eristys- ja karakterisointiteknikoiden edistyminen johti havaintoon, että sikiön ja aikuisen hemoglobiinin välillä on useita havaittavissa olevia eroavaisuuksia. Yksi näistä on fetaalihemoglobiinin resistenssi happoeluointia vastaan (Kleihauer-Betken testi). Kun veren sivelynäytteet upotetaan esimerkiksi happopuskuriin, aikuisen hemoglobiini eluoituu erytrosyyteistä mutta fetaalihemoglobiini ei. Jos veren sivelynäytteet käsitellään tällä tavalla ja myöhemmin värjätään, väri jää fetaalihemoglobiinia sisältäviin erytrosyytteihin, kun taas vain aikuisen hemoglobiinia sisältävät erytrosyytit näkyvät varjosoluina.

Objektilasien fetaalihemoglobiinin tunnistusta happoeluoitiresistenssin avulla ehdottivat tekniikaksi alun perin Kleihauer et al.¹ ja myöhemmin edeltävää mukaillen Shepard et al.² Sigman tuotteet parantavat lähestymistapaa Oskin ja Naimanin kuvaamalla tavalla.³

Rh-veriryhmien yhteensopimattomuustapauksissa on yhä yleisempää hillitä immuunireaktioita punasoluihin, jotka siirtyvät sikiöstä äidin verenkiertoon. Annettavaa anti-Rh(D):tä sisältävän spesifisen gammaglobuliinin määrä lasketaan arvioimalla fetomaternaalivuodon suuruus.⁴

Kuvatun tekniikan mukaisesti asianmukaisesti kuivatut ja kiinnitetyt veren sivelynäytteet upotetaan sitraattipuskuriin, jonka pH on 3,3 ja lämpötila 37 °C. Aikuisen hemoglobiini A (HbA) liukenee pois soluista, kun taas haponkestävä fetaalihemoglobiini (HbF) säilyy solussa ja voidaan värjätä mikroskooppitutkimusta varten.

Reagenssit

Sitraattifosfaattipuskurikonsentraatti (luettelonro 2851)
Natriumsitraatti, 0,7 mol/l, ja natriumfosfaatti, 0,6 mol/l, säilöntäaineeksi lisätty kloroformi

Hapan hematoksyliiniliuos (luettelonro 2852)
Hematoksyliini, sertifioitu, 1 g/l, väri-indeksi 75290, alumiiniammoniumsulfaatti, natriumjodaatit ja stabilointiaineet, pH 3,3

Eosiini B -liuos (luettelonro 2853)
Eosiini B, 0,1 %, vesiliuos, väri-indeksi 45400. Natriumtarsi, 0,1 %, lisätty säilöntäaineeksi

Tarvittavat erityismateriaalit, jotka eivät sisälly pakkaukseen

- Mikroskooppi
- Objektilaseja, peitinlaseja
- Värjäysteline/Coplin-astioita
- Vesihaude, 37 °C
- Etanolifiksatiivi (luettelonro 2858), 80-prosenttinen (v/v) etyylialkoholi

Säilytys ja stabiilius

Säilytä sitraattifosfaattipuskurikonsentraatti jääkaapissa (2–8 °C). Hävitä, jos siinä on merkkejä mikrobikasvusta.

Säilytä sitraattifosfaattipuskuriliuos jääkaapissa (2–8 °C). Stabiili kahden viikon ajan. Käytä joka päivä tuoretta alikuoittia. Hävitä, jos siinä on merkkejä mikrobikasvusta.

Säilytä hapan hematoksyliiniliuos ja eosiini B -liuos huoneenlämmössä (18–26 °C). Liuoksia voidaan käyttää uudelleen, jos niitä säilytetään tiiviisti suljetuissa värjäysastioissa himmeässä valossa.

Etanolifiksatiivi on säilytettävä huoneenlämmössä. Säilytä tiiviisti suljetuna ja syttyviä nesteitä koskevien ohjeistusten mukaisesti. Liuosta voidaan käyttää uudelleen, mutta se on hävitettävä, jos kiinnitys ei ole riittävä.

Pilaantuminen

Hävitä hapan hematoksyliiniliuos, kun soveltuvaan värjäykseen kuluva aika ylittää kahdeksan minuuttia.

Valmistelu

Sitraattifosfaattipuskuriliuos valmistetaan laimentamalla 1 tilavuusosa sitraattifosfaattipuskurikonsentraattia 9 tilavuusosalla vettä.

Hapan hematoksyliiniliuos, eosiini B -liuos ja etanolifiksatiivi ovat käyttövalmiita.

Varoimet

Nämä in vitro -diagnostiset (IVD) laitteet on tarkoitettu käytettäväksi "in vitro -diagnostiikassa" kliinisessä laboratorioympäristössä. Nämä IVD-laitteet on tarkoitettu vain pätevän ammattihenkilöstön käyttöön. In vitro -diagnostisia Sigma-Aldrich-laitteita saa käyttää laboratoriohenkilöstö, joka on koulutettu käsittelemään mahdollisesti tartuntavaarallisia ihmisperäisiä näytteitä ja käyttämään mikroskooppia ja muita laboratoriarvikkeita ja jolla on riittävä värinäkö ja näöntarkkuus värien ja muiden kohteiden erottamiseen mikroskoopiilla.

Normaaleja laboratorioreagenssien käsittelyyn liittyviä varoituksia tulee noudattaa. Hävitä jätteet kaikkien paikallisten, alueellisten ja kansallisten määräysten mukaisesti.

Menettely

Näytteenotto

Kaikki näytteet on merkittävä selkeästi. Näytteiden ottamiseen ja valmisteluun on käytettävä sopivia välineitä. Noudata valmistajan antamia käyttöohjeita.

Millään tunnetulla testimenetelmällä ei voida täysin taata, että veri- tai kudonsäytteet eivät tartuttaisi infektiota. Siksi kaikkia verijohdannaisia ja kudonsäytteitä on pidettävä mahdollisesti tartuntavaarallisina.

Menettelyssä voidaan käyttää joko kapillaari- tai laskimoverta. Kapillaariveri voidaan siirtää suoraan puhtaaseen objektilasiin. Laskimoveri on lisättävä EDTA:ta tai oksalaattia sisältävään putkeen. Ohjeena voidaan käyttää 1–2 tippaa 2-prosenttista EDTA-liuosta (luettelonro 2854) per milliliitra verta (1 tippa = 1 mg). Vaikka veren ja EDTA:n seosten on raportoitu olevan käyttökelpoisia jopa kahden viikon ajan jääkaapissa säilytettynä,² sivelynäytteet tulee valmistella 24 tunnin kuluessa veren keräämisestä oksalaattiin.⁵ Vastasytynneiden näytteitä käytettäessä veri on suositeltavaa laimentaa 0,85-prosenttisella keittosuolaliuoksella, sillä tällaisissa näytteissä on korkea HbF-pitoisuus. Veren sivelynäytteet eivät ole stabiileja, ja ne on testattava välittömästi valmistelun jälkeen.

Huomautukset

Laadunvalvontaa varten suositellaan, että jokaiseen testisarjaan sisällytetään normaalin aikuisen (HbA) ja vastasyntyneen tai imeväisikäisen (HbF) verta. Barr ja Shafer⁶ raportoivat, että EDTA:han kerätystä napaverestä valmistettuja kiinnitettyjä positiivisia kontrolliojektilaseja voidaan säilyttää enintään yhden vuoden ajan –20 °C:ssa suljetussa pähvilaatikossa. Negatiiviset EDTA-kontrollit eivät kuitenkaan eluoidu kokonaan sen jälkeen, kun niitä on säilytetty yli kaksi kuukautta –20 °C:ssa. Tutkimuksen tulokset ehdottavat positiivisten ja negatiivisten sivelynäytteiden valmistamista samalle objektilasille, jolloin saadaan selkeät ja nopeat kontrastit viitteeksi testiobjektilasien lukemiseen.

Normaalialueet ⁷	
Ikä	Fetaalihemoglobiini (%)
Syntymähetkellä	50–90
< 2 vuotta	0–4
> 2 vuotta	0–2

Menettely

1. Sitraattifosfaattipuskuriliuos on lämmitettävä 37 °C:n lämpötilaan Coplin-astiassa tai värjäysmaljassa.
2. Tee ohuita veren sivelynäytteitä puhtaille ja merkityille objektilaseille. Valmistele KONTROLLIobjektilasit käyttämällä positiivista HbF-verta (napaveri) ja normaalia aikuisen verta. Anna kuivua noin 10 minuuttia.
3. Kiinnitä objektilasit upottamalla ne etanolifiksatiiviin viideksi minuutiksi, huuhtelee huolellisesti vesijohtovedellä ja anna kuivua.
4. Upota TESTI- ja KONTROLLIobjektilasit esilämmitettyyn 37-asteiseen sitraattifosfaattipuskuriliuokseen viiden minuutin ajaksi. Ravista, kun upotuksesta on mennyt yksi minuutti, ja uudelleen kolmen minuutin kohdalla. Ravistusastetta voi vaihdella toivottujen tulosten saavuttamiseksi. Huuhtelee huolellisesti tislattulla vedellä ja anna kuivua **kokonaan** värjäysartefaktien välttämiseksi.
5. Värjää objektilaseja kolmen minuutin ajan happamassa hematoksyliiniliuoksessa. Huuhtelee objektilasit huolellisesti tislattulla vedellä ja ravista ylimääräinen vesi pois.
6. Vastavärjää objektilaseja neljän minuutin ajan 0,1-prosenttisessä eosiini B -liuoksessa. Huuhtelee huolellisesti tislattulla vedellä ja anna kuivua.
7. Aseta **kuiva** peitinlasi objektilasin päälle ja tutki öljymersion avulla (1000X). HbF:n puituminen näkyy varjosoluina, kun taas HbF:ää sisältävät solut näkyvät kirkkaanpunaisina. **Älä** levitä öljyä suoraan objektilasille. (**Huomautus:** 400-kertaista suurennusta voidaan käyttää, mutta siitä seuraavaa suurempaa kenttää voi olla vaikeampi laskea.)

Suorituskykyominaisuudet

Fetaalihemoglobiinia sisältävien erytrosyyttien osuus voidaan arvioida useilla tavoilla. Tutkiessaan äidin veressä havaittavia merkkejä HbF:ää sisältävistä soluista Oski ja Naiman³ suosittelevat seuraavaa:

1. Laske erytrosyyttien kokonaismäärä viidessä kentässä ja määritä keskimääräinen määrä kenttää kohden.
2. Laske voimakkaasti värjäytyneiden, HbF:ää sisältävien erytrosyyttien määrä noin 30 kentässä ja määritä keskimääräinen määrä kenttää kohden.
3. Laske HbF:ää sisältävien erytrosyyttien prosentuaalinen osuus erytrosyyttien kenttäkohtaisen kokonaismäärän perusteella.

Tulokset raportoidaan HbF:n esiintymisen prosentuaalisena osuutena.

Oskin ja Naimanin³ mukaan tällä menetelmällä pystytään havaitsemaan jopa 0,1 ml sikiön verta äidin verenkiertossa.

Jos havaitut tulokset eroavat odotetuista tuloksista, ota yhteyttä Sigma-Aldrichin tekniseen palveluun.

Analyttiset suorituskykyominaisuudet

Kaikilla kohderakenteilla suoritetuista testeistä saadut analyttiset suorituskykytulokset vahvistavat 100-prosenttisen herkkyyden, spesifisyyden ja toistettavuuden.

Luettelonro	Tuotteen kuvaus	Kohde	Määrittymisen sisäisen spesifisyys	Määrittymisen sisäisen herkkyyden	Määrittysten väliläin spesifisyys	Määrittysten väliläin herkkyyden
2851	Sitraattifosfaattipuskurikonsentraatti	Fetaalihe-moglobiini	3/3	3/3	3/3	3/3
2852	Hapan hematoksyliiniliuos	Tumat	3/3	3/3	3/3	3/3
2853	Eosiini B -liuos	Fetaalihe-moglobiini	3/3	3/3	3/3	3/3

Varoitukset ja vaarat

Katso päivitetyt riski-, vaara- ja turvallisuustiedot käyttöturvallisuustiedotteesta ja tuotemerkinnöistä.

285C:



- H319 Ärsyttää voimakkaasti silmiä.
- H331 Myrkyllistä hengitettynä. Turvalausekkeet
- P261 Vältä sumun tai höyryn hengittämistä.
- P264 Pese iho huolellisesti käsittelyn jälkeen.
- P271 Käytä ainoastaan ulkona tai tiloissa, joissa on hyvä ilmanvaihto.
- P280 Käytä silmiensuojainta/kasvonsuojainta.
- P304 + P340 + P311 JOS KEMIKAALIA ON HENGITETTY: Siirrä henkilö raittiiseen ilmaan ja varmista vaivaton hengitys. Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN/lääkäriin.
- P305 + P351 + P338 JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhto huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista.

285D:



- H319 Ärsyttää voimakkaasti silmiä.
- H331 Myrkyllistä hengitettynä. Turvalausekkeet
- P261 Vältä sumun tai höyryn hengittämistä.
- P264 Pese iho huolellisesti käsittelyn jälkeen.
- P271 Käytä ainoastaan ulkona tai tiloissa, joissa on hyvä ilmanvaihto.
- P280 Käytä silmiensuojainta/kasvonsuojainta.
- P304 + P340 + P311 JOS KEMIKAALIA ON HENGITETTY: Siirrä henkilö raittiiseen ilmaan ja varmista vaivaton hengitys. Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN/lääkäriin.
- P305 + P351 + P338 JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhto huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista.

Jos tämän laitteen käytön aikana tai sen seurauksena ilmenee vakava vaaratilanne, ilmoita siitä valmistajalle ja/tai sen valtuutetulle edustajalle sekä kansalliselle viranomaiselle.

Symbolien selitykset

Symbolit standardin EN ISO 15223-1:2021 mukaisesti

	Valmistaja		Luettelonumero
	Katso käyttöohje		Eräkoodi
	Valtuutettu edustaja Euroopan yhteisössä / Euroopan unionissa		Vaatimustenmukaisuusvakuutus Euroopan unionin määräysten mukaisesti (IVDR-asetus 2017/746)
	Viimeinen käyttöpäivä		in vitro -diagnostiikkaan tarkoitettu lääkinnällinen laite
	Lämpötilarajoitus		Huomio
	Valmistuspäivä		Maahantuoja
	Valtuutettu edustaja Sveitsissä		

Lähteet

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.
- Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512

Yhteystiedot

Voit tehdä tilauksen verkkosivuiltamme osoitteessa [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Tekniseen palveluumme voi ottaa yhteyttä teknisen palvelun sivulla osoitteessa [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Versiohistoria

Versio 4.0	2014
Versio 5.0	2016
Versio 6.0	2023

Siirretty uuteen pohjaan, jossa on ajantasaiset brändimerkit. Maininta ammattikäytöstä lisätty käyttötarkoitukseen ja varotoimiin. Käyttötarkoitus tarkistettu IVDR-ohjeistusten mukaisesti. "Materiaalin käyttöturvallisuustiedote" päivitetty muotoon "käyttöturvallisuustiedote". Yhteystiedot päivitetty. Poistettu ohje CLSI-ohjeistuksen noudattamisesta näytteenotossa. Symboliosiota poistettu "EN 980" ja tilalle vaihdettu "EN ISO 15223-1:2021". Lisätty haittatapahtumien yhteydessä käytettävät yhteystiedot. Kirjallisuusviitteet päivitetty. Lisätty versiohistoriataulukko. Lisätty kohta Varoitukset ja vaarat. Lisätty CH-REP-tiedot.

Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany

Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

M-alkukirjain ja Sigma-Aldrich ovat Merck KGaA -yhtiön, Darmstadt, Saksa, tai sen tytäryhtiöiden tavaramerkkejä. Kaikki muut tavaramerkit ovat haltijoidensa omaisuutta. Yksityiskohtaiset tavaramerkkitiedot ovat saatavilla julkisista lähteistä.

Gebruiksaanwijzing

Foetaal-hemoglobinekit

Procedurenr. 285



Beoogd gebruik

Foetale-hemoglobine reagentia zijn bedoeld voor gebruik als een algemene histochemische laboratoriumkleuring voor de zuurelutie bepaling van foetaal hemoglobine in bloedsmears. Foetaal-hemoglobinekleuring-reagentia zijn voor 'in-vitro diagnostisch gebruik'. Uitsluitend voor professioneel gebruik. Deze handmatige, semikwantitatieve procedure detecteert foetaal hemoglobine in erythrocyten in humane bloedsmears.

Vooruitgang in technieken voor het isoleren en karakteriseren van eiwitten leidde tot de ontdekking dat er verschillende onderscheidende eigenschappen zijn die het mogelijk maken om foetaal hemoglobine van volwassen hemoglobine te onderscheiden. Een daarvan is de weerstand van foetaal hemoglobine (hemoglobine F) tegen zure elutie. Wanneer bloedsmears bijvoorbeeld in een zure buffer worden ondergedompeld, wordt volwassen hemoglobine geëluëerd uit de erythrocyten, terwijl dat niet het geval is bij foetale hemoglobine. Als bloedsmears op deze manier worden behandeld en vervolgens gekleurd, zullen erythrocyten met hemoglobine F de kleuring opnemen, terwijl erythrocyten met alleen volwassen hemoglobine als 'geesten' verschijnen.

De objectglasjestechniek voor het aantonen van foetaal hemoglobine met betrekking tot de weerstand ervan tegen zure elutie werd oorspronkelijk voorgesteld door Kleihauer e.a.,¹ en later gewijzigd door Shepard e.a.² De door Sigma geproduceerde techniek vertegenwoordigt een verdere verbetering van deze aanpak zoals beschreven door Oski en Naiman.³

Het wordt in gevallen van Rh-incompatibiliteit steeds gebruikelijker om immuunreacties tegen rode bloedcellen die vanuit de foetus in de maternale circulatie komen, te onderdrukken. De hoeveelheid toe te dienen specifiek gammaglobuline, die anti-Rh(D) bevat, wordt berekend door de omvang van de foetaal-maternale bloeding te beoordelen.⁴

Volgens de beschreven techniek worden bloedsmears, die goed gedroogd en gefixeerd zijn, ondergedompeld in een citraatbuffer met pH 3,3 bij 37 °C. Volwassen hemoglobine A (HbA) lost op uit de cellen, terwijl foetaal hemoglobine (HbF), dat zuurbestendig is, intracellulair blijft en gekleurd kan worden voor microscopisch onderzoek.

Reagentia

Citraat-fosfaat-bufferconcentraat (cat. nr. 2851)
Natriumcitraat, 0,7 mol/L, en natriumfosfaat, 0,6 mol/L, chloroform toegevoegd als conserveermiddel

Zure hematoxyline-oplossing (cat. nr. 2852)
Hematoxyline, gecertificeerd, 1 g/L, C.I. 75290, aluminiumammoniumsulfate, natriumjodaten en stabilisatoren, pH 3,3

Eosine B-oplossing (cat. nr. 2853)
Eosine B, 0,1%, waterige oplossing, C.I. 45400. Natriumazide, 0,1%, toegevoegd als conserveermiddel

Vereiste, maar niet meegeleverde speciale materialen

- Microscoop
- Microscoopglasjes, dekglasjes
- Kleurrek/Coplin-potten
- Waterbad, 37 °C
- Ethanolfixatief (cat. nr. 2858) 80% w/w ethylalcohol

Opslag en stabiliteit

Bewaar citraat-fosfaat-bufferconcentraat in de koelkast (2-8 °C). Gooi weg als er sprake is van microbiële groei.

Bewaar citraat-fosfaat-bufferoplossing in de koelkast (2-8 °C). Stabiel gedurende 2 weken. Gebruik elke dag een nieuwe aliquot. Gooi weg als er sprake is van microbiële groei.

Bewaar zure hematoxyline-oplossing en eosine B-oplossing bij kamertemperatuur (18-26 °C). Oplossingen kunnen worden hergebruikt als ze in goed afgesloten kleuringspotjes in gedempt licht worden bewaard.

Ethanolfixatief moet bij kamertemperatuur worden bewaard. Goed afgesloten en als ontvlambare vloeistof bewaren. De oplossing kan worden hergebruikt, maar moet worden weggegooid als de fixatie niet afdoende is.

Verslechtering

Gooi de zure hematoxyline-oplossing weg als de tijd die nodig is voor een geschikte kleuring langer is dan 8 minuten.

Voorbereiding

Citraat-fosfaat-bufferoplossing wordt bereid door 1 deel citraat-fosfaat-bufferconcentraat te verdunnen met 9 delen water.

Zure hematoxyline-oplossing, eosine B-oplossing en ethanolfixatief zijn klaar voor gebruik.

Voorzorgsmaatregelen

Deze IVD's zijn bedoeld voor in-vitro diagnostisch gebruik in een klinische laboratoriumomgeving. Deze IVD's zijn uitsluitend bestemd voor professioneel gebruik door gekwalificeerd personeel. IVD's van Sigma-Aldrich mogen bediend worden door laboratoriumpersoneel dat opgeleid is om om te gaan met humane monsters die infectieus kunnen zijn, microscopen en andere laboratoriumapparatuur te gebruiken en met voldoende kleurwaarneming en gezichtsscherpte om kleuren en andere objecten onder een microscoop te onderscheiden.

De normale voorzorgsmaatregelen bij het hanteren van laboratoriumreagentia moeten worden opgevolgd. Voer afval af met inachtneming van alle plaatselijke, provinciale of nationale voorschriften.

Procedure

Monsterafname

Alle monsters moeten duidelijk gelabeld zijn. Voor het afnemen en bereiden van monsters moeten geschikte instrumenten worden gebruikt. Volg de gebruiksaanwijzing van de fabrikant.

Geen enkele bekende testmethode kan volledige zekerheid bieden dat bloedmonsters of weefsels geen infectie overdragen. Daarom moeten alle bloederivaten of weefselsonsters als mogelijk infectieus worden beschouwd.

Er kan zowel capillair als veneus bloed worden gebruikt. Capillair bloed kan rechtstreeks op een schoon microscoopglasje worden overgebracht. Veneus bloed moet worden toegevoegd aan een buisje met EDTA of oxalaat. Gebruik voor het gemak 1-2 druppels 2% EDTA-oplossing (cat. nr. 2854) per mL bloed (1 druppel = 1 mg). Bloed-EDTA-mengsels kunnen in principe tot 2 weken worden gebruikt mits ze in de koelkast worden bewaard.⁵ Smears moeten binnen 24 uur worden bereid uit bloed dat in oxalaat is afgenomen.⁵ Bij gebruik van monsters van pasgeborenen wordt aanbevolen het bloed te verdunnen met 0,85% zoutoplossing, aangezien dergelijke monsters een hoog gehalte aan HbF hebben. Bloedsmears zijn niet stabiel en moeten onmiddellijk na bereiding getest worden.

Opmerkingen

Voor kwaliteitscontroledoelinden wordt aanbevolen om in elke testserie bloed van een normale volwassene (HbA) en van een pasgeborene of zuigeling (HbF) op te nemen. Barr en Shafer⁶ melden dat gefixeerde positieve controleglasjes van navelstrengbloed in EDTA tot 1 jaar bewaard kunnen worden bij -20 °C, in een afgesloten kartonnen doos. Negatieve EDTA-controles elueren echter niet volledig wanneer ze langer dan 2 maanden bij -20 °C zijn bewaard. Deze onderzoekers stellen voor om positieve en negatieve smears op hetzelfde glasje te prepareren, zodat er duidelijke en snelle contrasten ontstaan als referentie bij het aflezen van de testglasjes.

Normale bereiken⁷

Leeftijd	Foetaal hemoglobine (%)
Bij de geboorte	50-90
< 2 jaar	0-4
> 2 jaar	0-2

Procedure

1. Citraat-fosfaat-bufferoplossing moet worden verwarmd tot 37 °C in een Coplin-potje of kleurschaal.
2. Maak met behulp van schone, gelabelde microscoopglasjes dunne bloedsmears. Maak CONTROLE-glasjes met positief HbF-bloed (navelstrengbloed) en normaal volwassen bloed. Laat ongeveer 10 minuten drogen aan de lucht.
3. Fixeer de objectglasjes door ze 5 minuten onder te dompelen in ethanolfixatief, spoel ze grondig af met kraanwater en laat ze aan de lucht drogen.
4. Dompel TEST- en CONTROLE-objectglasjes gedurende 5 minuten onder in voorverwarmde citraat-fosfaat-bufferoplossing bij 37 °C. Beweeg de glasjes na 1 en 3 minuten onderdompeling. De mate van beweging kan gevarieerd worden om de meest gewenste resultaten te bereiken. Spoel grondig met gedestilleerd water en laat **volledig** aan de lucht drogen om kleurartefacten te voorkomen.
5. Kleur de objectglasjes 3 minuten in zure hematoxylineoplossing. Spoel de objectglasjes grondig af met gedestilleerd water en schud het overtollige water eraf.
6. Laat de objectglasjes 4 minuten lang tegenkleuren in 0,1% eosine B-oplossing. Spoel grondig met gedestilleerd water en laat aan de lucht drogen.
7. Plaats een **droog** dekglasje op het glasje en onderzoek met olie-immersie (1000X). De afwezigheid van HbF wordt duidelijk door de aanwezigheid van geestcellen, terwijl ingesloten HbF ervoor zorgt dat cellen helderrood worden. Breng **geen** olie rechtstreeks op het objectglasje aan. (**Opmerking:** De 400X-vergroting kan worden gebruikt, maar het resulterende grotere veld kan moeilijker te tellen zijn.)

Prestatiekenmerken

Het deel erythrocyten met foetaal hemoglobine kan op verschillende manieren worden geschat. Bij het bestuderen van maternaal bloed dat bewijs levert van HbF-bevattende cellen, adviseerden Oski en Naiman³ het volgende:

1. Tel het totale aantal erythrocyten in 5 velden en bepaal het gemiddelde aantal per veld.
2. Tel het totale aantal diep gekleurde HbF-bevattende erythrocyten in ongeveer 30 velden en bepaal het gemiddelde aantal per veld.
3. Bereken het percentage HbF-erythrocyten op basis van het totale aantal erythrocyten per veld. Resultaten worden gerapporteerd als het percentage aanwezig HbF.

Volgens Oski en Naiman³ kan met deze methode slechts 0,1 ml foetaal bloed in de maternale circulatie al worden gedetecteerd.

Als de waargenomen resultaten afwijken van de verwachte resultaten, neem dan contact op met de technische dienst van Sigma-Aldrich voor assistentie.

Analytische prestatiekenmerken

De resultaten van de analytische prestaties voor de gegeven tests, uitgevoerd op alle doelstructuren, bevestigen 100% gevoeligheid, specificiteit en herhaalbaarheid.

Cat. nr.	Productbeschrijving	Doel	Intra-assay specificiteit	Intra-assay gevoeligheid	Inter-assay specificiteit	Inter-assay gevoeligheid
2851	Citraat-fosfaat-bufferconcentraat	Foetaal hemoglobine	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
2852	Zure hematoxyline-oplossing	Kernen	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3
2853	Eosine B-oplossing	Foetaal hemoglobine	3 van 3	3 van 3	3 van 3	3 van 3

Waarschuwingen en gevaren

Raadpleeg het veiligheidsinformatieblad en de etikettering van het product voor bijgewerkte informatie over risico's, gevaren of veiligheid.

285C:



- H319 Veroorzaakt ernstige oogirritatie.
- H331 Giftig bij inademing. Veiligheidsaanbeveling(en)
- P261 Inademing van nevel of dampen vermijden.
- P264 Na het werken met dit product de huid grondig wassen.
- P271 Alleen buiten of in een goed geventileerde ruimte gebruiken.
- P280 Draag oogbescherming/gezichtsbescherming.
- P304 + P340 + P311 NA INADEMING: Breng de persoon in de frisse lucht en zorg dat hij comfortabel kan ademen. Bel een ANTIGIFCENTRUM of een arts.
- P305 + P351 + P338 BIJ CONTACT MET DE OGEN: Spoel zachtjes af met water gedurende enkele minuten. Contactlenzen verwijderen, indien aanwezig en gemakkelijk te doen. Blijven spoelen.

285D:



- H319 Veroorzaakt ernstige oogirritatie.
- H331 Giftig bij inademing. Veiligheidsaanbeveling(en)
- P261 Inademing van nevel of dampen vermijden.
- P264 Na het werken met dit product de huid grondig wassen.
- P271 Alleen buiten of in een goed geventileerde ruimte gebruiken.
- P280 Draag oogbescherming/gezichtsbescherming.
- P304 + P340 + P311 NA INADEMING: Breng de persoon in de frisse lucht en zorg dat hij comfortabel kan ademen. Bel een ANTIGIFCENTRUM of een arts.
- P305 + P351 + P338 BIJ CONTACT MET DE OGEN: Spoel zachtjes af met water gedurende enkele minuten. Contactlenzen verwijderen, indien aanwezig en gemakkelijk te doen. Blijven spoelen.

Als zich tijdens het gebruik van dit apparaat of als gevolg van het gebruik ervan een ernstig incident heeft voorgedaan, meld dit dan aan de fabrikant en/of zijn gemachtigde vertegenwoordiger en aan uw nationale autoriteit.

Symbooldefinities

Symbolen zoals gedefinieerd in EN ISO 15223-1:2021

	Fabrikant		Catalogusnummer
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing		Batchcode
	Gemachtigd vertegenwoordiger in de Europese Gemeenschap/ Europese Unie		Conformiteitsverklaring van de Europese Unie (gedefinieerd in IVDR 2017/746)
	Uiterste gebruiksdatum		Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	Temperatuurlimiet		Let op
	Productiedatum		Importeur
	Geeft de bevoegde vertegenwoordiger in Zwitserland aan		

Referenties

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausstrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.
- Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seivert CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512

Contactgegevens

Om een bestelling te plaatsen, bezoek onze website op [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Ga voor technische service naar de technische servicepagina op onze website: [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Herzieningsgeschiedenis

Herz. 4.0	2014
Herz. 5.0	2016
Herz. 6.0	2023
Overgezet naar nieuwe sjabloon met huidige huisstijl. Gespecificeerd voor professioneel gebruik in bedoeld gebruik en voorzorgsmaatregelen. Herzien beoogd gebruik om aan te sluiten bij IVDR-richtlijnen. Veiligheidsinformatieblad bijgewerkt tot veiligheidsinformatieblad. Contactgegevens bijgewerkt. Instructie om CLSI te volgen voor monsterafname verwijderd. EN 980 verwijderd en gewijzigd in EN ISO 15223-1:2021 voor symbolen. Contactinformatie over melding ongewenste voorvallen toegevoegd. Bijgewerkte literatuurreferenties. Een tabel met de herzieningsgeschiedenis toegevoegd. Waarschuwingen en gevaren toegevoegd. CH-REP informatie toegevoegd.	

Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany

Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany

MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Navodila za uporabo

Komplet za hemoglobin ploda

Postopek št. 285



Predvidena uporaba

Reagenti za hemoglobin ploda so namenjeni uporabi kot splošno laboratorijsko histokemično barvilo za določanje hemoglobina ploda s kislinosko elucijo v krvnih razmazih. Reagenti za barvanje hemoglobina ploda so namenjeni za »diagnostično uporabo in vitro«. Samo za strokovno uporabo. S tem ročnim, semikvantitativnim postopkom se v eritrocitih vzorcev človeškega krvnega razmaza odkriva hemoglobin ploda.

Napredek v tehnikah za izolacijo in karakterizacijo beljakovin je pripeljal do odkritja, da obstaja več razlikovalnih lastnosti, ki omogočajo razlikovanje med hemoglobinom ploda in odraslih. Med njimi je odpornost proti kislini eluciji so prvotno predlagali Kleihauer in sod.¹ Kasneje so jo spremenili Shepard in sod.² Izdelana metoda Sigma predstavlja nadaljnje izboljšanje tega pristopa, ki sta ga opisala Oski in Naiman.³

Tehniko uporabe mikroskopskih preparatov za dokazovanje hemoglobina ploda glede na njegovo odpornost proti kislini eluciji so prvotno predlagali Kleihauer in sod.¹ Kasneje so jo spremenili Shepard in sod.² Izdelana metoda Sigma predstavlja nadaljnje izboljšanje tega pristopa, ki sta ga opisala Oski in Naiman.³

V primerih nezdržljivosti Rh se vse pogosteje uporablja zaviranje imunskih reakcij na rdeče krvničke, ki vstopajo v materin krvni obtok iz ploda. Količina specifičnega globulina gama, ki vsebuje anti Rh(D), ki ga je treba dati, se izračuna z oceno velikosti krvavitve med plodom in materjo.⁴

V skladu z opisano tehniko se ustrezno posušeni in fiksirani krvni razmazi potopijo v citratni pufer z vrednostjo pH 3,3 pri 37 °C. Hemoglobin A pri odraslih (HbA) se raztopi iz celic, medtem ko hemoglobin ploda (HbF), ki je odporen proti kislinam, ostane znotraj celic in se lahko obarva za mikroskopski pregled.

Reagenti

Koncentrat citratnega fosfatnega pufera (kat. št. 2851)

Natrijev citrat, 0,7 mol/l, in natrijev fosfat, 0,6 mol/l, kloroform je dodan kot konzervans

Kisla raztopina hematoksilina (kat. št. 2852)

Hematoksin, certifikiran, 1 g/l, C.I. 75290, aluminij-amonijev sulfat, natrijevi jodati in stabilizatorji, pH 3,3

Raztopina eozina B (kat. št. 2853)

Eozin B, 0,1 %, vodna raztopina, C.I. 45400. Natrijev azid, 0,1 %, dodan kot konzervans

Posebni materiali, ki so potrebni, vendar niso priloženi

- Mikroskop
- Mikroskopska stekelca, krovna stekelca
- Stojalo za barvanje/kozarci Coplin
- Vodna kopel, 37 °C
- Etanolni fiksativ (kat. št. 2858), 80 vol% etilni alkohol

Shranjevanje in stabilnost

Koncentrat citratnega fosfatnega pufera hranite v hladilniku (2–8 °C). Če obstajajo dokazi o mikrobni rasti, ga zavrzite.

Citratno fosfatno pufrsko raztopino hranite v hladilniku (2–8 °C). Stabilno 2 tedna. Vsak dan uporabite sveže alikvot. Če obstajajo dokazi o mikrobni rasti, ga zavrzite.

Kislo raztopino hematoksilina in raztopino eozina B hranite pri sobni temperaturi (18–26 °C). Raztopine se lahko ponovno uporabijo, če so shranjene v trdno zaprtih kozarcih za barvanje na šibki svetlobi.

Etanolni fiksativ je treba hraniti pri sobni temperaturi. Shranjujte trdno zaprto in kot vnetljivo tekočino. Raztopina se lahko ponovno uporabi, vendar jo je treba zavreči, če fiksacija ni ustrezna.

Poslabšanje kakovosti

Kislo raztopino hematoksilina zavrzite, če je čas, potreben za ustrezno obarvanje, daljši od 8 minut.

Priprava

Raztopino citratnega fosfatnega pufera pripravimo tako, da 1 volumen koncentrata citratnega fosfatnega pufera razredčimo z 9 volumni vode.

Kisla raztopina hematoksilina, raztopina eozina B in etanolni fiksativ so pripravljeni za uporabo.

Previdnostni ukrepi

Ti izdelki IVD so namenjeni za diagnostično uporabo in vitro v kliničnem laboratoriju. Ti izdelki IVD so namenjeni le strokovni uporabi s strani usposobljenega osebja. Z napravo Sigma-Aldrich IVD lahko upravlja laboratorijsko osebje, ki je usposobljeno za ravnanje s človeškimi vzorci, ki so lahko kužni, za uporabo mikroskopov in druge laboratorijske opreme ter ima sposobnost zaznavanja barv in ostrino vida za razlikovanje barv in drugih predmetov pod mikroskopom.

Upoštevanje je treba običajne previdnostne ukrepe pri ravnanju z laboratorijskimi reagenti. Odpadke odstranite v skladu z vsemi lokalnimi, državnimi, pokrajinskimi ali nacionalnimi predpisi.

Postopek

Zbiranje vzorcev

Vsi vzorci morajo biti jasno označeni. Za pridobivanje in pripravo vzorcev je treba uporabiti ustrezne instrumente. Upoštevajte navodila proizvajalca za uporabo.

Nobena znana testna metoda ne more dati popolnega zagotovila, da vzorci krvi ali tkiva ne bodo prenesli okužbe. Zato je treba vse krvne derivate ali tkivne vzorce obravnavati kot potencialno kužne.

Uporabiti je mogoče kapilarno ali venosko kri. Kapilarno kri lahko prenesete neposredno na čisto mikroskopsko stekelce. Venosko kri je treba dodati v epruveto, ki vsebuje EDTA ali oksalat. Zaradi priročnosti uporabite 1–2 kapljici 2-odstotne raztopine EDTA (kat. št. 2854) na ml krvi (1 kapljica = 1 mg). Čeprav naj bi bile mešanice krvi in EDTA zadovoljive za uporabo do 2 tednov, če so shranjene v hladilniku.² Iz krvi, zbrane v oksalatu, je treba razmaze pripraviti v 24 urah.³ Pri vzorcih novorojenčkov je priporočljivo kri razredčiti z 0,85-% fiziološko raztopino, saj imajo taki vzorci visoko vsebnost HbF. Krvni razmazi niso stabilni in jih je treba testirati takoj po pripravi.

Opombe

Zaradi nadzora kakovosti je priporočljivo, da se v vsako serijo testov vključi kri normalnega odraslega (HbA) in novorojenčka ali dojenčka (HbF). Barr in Shafer⁶ poročata, da je mogoče fiksirane pozitivne kontrolne preparate iz popkovnične krvi v EDTA hraniti do 1 leta pri –20 °C v zaprti kartonski škatli. Vendar se negativne kontrole EDTA po več kot 2-mesečnem skladiščenju pri –20 °C ne eluirajo v celoti. Ti raziskovalci predlagajo pripravo pozitivnih in negativnih razmazov na istem stekelcu, kar omogoča jasne in hitre kontraste kot referenco pri branju testnih stekel.

Normalni razponi ⁷	
Starost	Hemoglobin ploda (%)
Ob rojstvu	50–90
< 2 leti	0–4
> 2 leti	0–2

Postopek

1. Citratno-fosfatno pufrsko raztopino je treba segreti na 37 °C v kozarcu Coplin ali posodi za barvanje.
2. Na čistih, označenih mikroskopskih stekelcih naredite tanke krvne razmaze. Pripravite KONTROLNA stekelca s pozitivno HbF krvjo (popkovnična kri) in normalno krvjo odraslih. Sušite na zraku približno 10 minut.
3. Stekelca fiksirajte tako, da jih za 5 minut potopite v etanolni fiksativ, temeljito sperite z vodo iz pipe in posušite na zraku.
4. TESTNA in KONTROLNA stekelca za 5 minut potopite v predhodno ogreto raztopino citratnega fosfatnega pufera pri 37 °C. Po 1 in 3 minutah potopitve premešajte. Moč mešanja lahko spreminjate, da dosežete najbolj zaželeno rezultate. Temeljito sperite z destilirano vodo in **popolnoma** osušite na zraku, da se izognete obarvanju artefaktov.
5. Stekelca 3 minute barvajte v kisli raztopini hematoksilina. Stekelca temeljito sperite z destilirano vodo in stresite odvečno vodo.
6. Stekelca 4 minute kontrastno barvajte v 0,1-odstotni raztopini eozina B. Temeljito sperite z destilirano vodo in osušite na zraku.
7. Na stekelce položite **suho** krovno stekelce in ga preglejte s potopitvijo v olje (1000X). Odsotnost HbF se kaže v prisotnosti celic »senc«, medtem ko zadržani HbF povzroči, da so celice videti svetlo rdeče. **Ne** nanašajte olja neposredno na stekelce. (**Opomba:** Uporabite lahko 400-kratno povečavo, vendar bo zaradi večjega polja morda težje šteti.)

Značilnosti delovanja

Delež eritrocitov, ki vsebujejo fetalni hemoglobin, lahko ocenimo na več načinov. Oski in Naiman³ sta pri preučevanju materine krvi z dokazom celic, ki vsebujejo HbF, priporočila naslednje:

1. Preštejte skupno število eritrocitov v 5 poljih in določite povprečno število na polje.
2. Preštejte število globoko obarvanih eritrocitov, ki vsebujejo HbF, v približno 30 poljih in določite povprečno število na polje.
3. Izračunajte odstotek eritrocitov HbF na podlagi skupnega števila eritrocitov na polje.

Rezultati so podani kot odstotek prisotnega HbF.

Oski in Naiman³ navajata, da je s to metodo mogoče odkriti že 0,1 ml krvi ploda v materinem krvnem obtoku.

Če opaženi rezultati odstopajo od pričakovanih, se za pomoč obrnite na oddelek za tehnično pomoč podjetja Sigma-Aldrich.

Značilnosti analitične učinkovitosti

Rezultati analitične učinkovitosti za dane teste, opravljene na vseh ciljnih strukturah, potrjujejo 100-odstotno občutljivost, specifičnost in ponovljivost.

Kat. št.	Opis izdelka	Cilj	Specifičnost znotraj testa	Občutljivost znotraj testa	Specifičnost med testi	Občutljivost med testi
2851	Koncentrat citratnega fosfatnega pufera	Hemoglobin ploda	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
2852	Kisla raztopina hematoksilina	Jedra	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3
2853	Raztopina eozina B	Hemoglobin ploda	3 od 3	3 od 3	3 od 3	3 od 3

Opozorila in nevarnosti

Vse posodobljene informacije o tveganju, nevarnosti ali varnosti najdete na varnostnem listu in oznaki izdelka.

285C:



H319 Povzroča hudo draženje oči.

H331 Strupeno pri vdihavanju. Previdnostni ukrepi

P261 Ne vdihavati meglice ali hlapov.

P264 Po uporabi temeljito umiti kožo.

P271 Uporabljati le zunaj ali v dobro prezračenem prostoru.

P280 Nositi zaščito za oči/zaščito za obraz.

P304 + P340 + P311 PRI VDIHAVANJU: Prenesti osebo na svež zrak in jo pustiti v udobnem položaju, ki olajša dihanje. Pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika.

P305 + P351 + P338 PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirati z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem.

285D:



H319 Povzroča hudo draženje oči.

H331 Strupeno pri vdihavanju. Previdnostni ukrepi

P261 Ne vdihavati meglice ali hlapov.

P264 Po uporabi temeljito umiti kožo.

P271 Uporabljati le zunaj ali v dobro prezračevanem prostoru.

P280 Nositi zaščito za oči/zaščito za obraz.

P304 + P340 + P311 PRI VDIHAVANJU: Prenesti osebo na svež zrak in jo pustiti v udobnem položaju, ki olajša dihanje. Pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE/zdravnika.

P305 + P351 + P338 PRI STIKU Z OČMI: Previdno izpirati z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem.

Če je med uporabo te naprave ali kot posledica njene uporabe prišlo do resnega incidenta, o tem obvestite proizvajalca in/ali njegovega pooblaščenega zastopnika ter ustrezen državni organ.

Definicije simbolov

Simboli, kot so opredeljeni v standardu EN ISO 15223-1:2021

	Proizvajalec		Kataloška številka
	Natančno preberite navodila za uporabo		Koda serije
	Pooblaščen zastopnik v Evropski skupnosti/Evropski uniji		Izjava Evropske unije o skladnosti (opredeljena v IVDR 2017/746)
	Rok uporabe		Medicinski diagnostični pripomoček in vitro
	Temperaturna omejitev		Pozor
	Datum izdelave		Uvoznik
	Označuje pooblaščenega zastopnika v Švici		

Reference

- Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hämoglobin in den Erythrocyten eines Blutausrichs [Demonstration of fetal hemoglobin in erythrocytes of a blood smear]. Klin Wochenschr. 1957 Jun 15; **35(12)**:637-8. German. doi: 10.1007/BF01481043. PMID: 13450287.
- Shepard MK, Weatherall DJ, Conley CL: Semi-quantitative estimation of the distribution of fetal hemoglobin in red cell populations. Bull Johns Hopkins Hosp. **110**:293, 1962.
- Oski FA, Naiman JL: Hematologic Problems in the Newborn, 2nd ed. Saunders, Philadelphia, 1972, pp. 62-63.
- Technical Manual. American Association of Blood Banks, 9th ed. Arlington (VA), 1985, pp. 320-322.
- Clayton EM, Feldhaus WD, Phythyon JM: The demonstration of fetal erythrocytes in the presence of adult blood cells. Am J Clin Pathol. **40**:487, 1963.
- Barr JK, Shafer JA: Preparation and storage of control slides for fetal hemoglobin determination by acid elution. Am J Med Technol. **42**:54, 1976.
- Seiverd CE: Hematology for Medical Technologist, 4th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1973, pp 511-512

Kontaktni podatki

Če želite oddati naročilo, obiščite naše spletno mesto [SigmaAldrich.com](https://www.sigmaaldrich.com). Če želite tehnično pomoč, obiščite stran tehničnega servisa na našem spletnem mestu [SigmaAldrich.com/techservice](https://www.sigmaaldrich.com/techservice).

Zgodovina revizij

Rev. 4.0	2014
Rev. 5.0	2016
Rev. 6.0	2023
Preneseno v novo predlogo s trenutno blagovno znamko. Navedeno za poklicno uporabo v okviru predvidene uporabe in previdnostnih ukrepov. Revidiran je namen uporabe za uskladiitev s smernicami IVDR. Posodobljen je varnostni list materiala v varnostni list. Posodobljeni so kontaktni podatki. Odstranjeno je navodilo, da je treba pri zbiranju vzorcev upoštevati standard CLSI. Odstranjen je standard EN 980 in za simbole spremenjen v standard EN ISO 15223-1:2021. Dodani so kontaktni podatki v primeru neženelih dogodkov. Posodobljeni so viri literature. Dodana je preglednica zgodovine revizij. Dodana so opozorila in nevarnosti. Dodane so bile informacije o zastopniku v Švici.	



Sigma-Aldrich, Inc.,
3050 Spruce Street,
St. Louis, MO 63103 USA
an affiliate of Merck KGaA,
Darmstadt, Germany
+1(314) 771-5765



MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germany



Merck KGaA,
64271
Darmstadt,
Germany



MDSS CH GmbH
Laurenzenvorstadt 61
5000 Aarau
Switzerland

Začetna črka M in Sigma-Aldrich sta blagovni znamki družbe Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija ali njenih pridruženih družb. Vse druge blagovne znamke so last posameznih lastnikov. Podrobne informacije o blagovnih znamkah so na voljo v javno dostopnih virih.

© 2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates. All rights reserved.

The life science business of Merck operates as MilliporeSigma in the U.S. and Canada.