

CUANTIFICACION DE HEMOGLOBINA FETAL

Evaluación de cinco métodos

Mario Chaves*, German F. Sáenz*, Eugenia Quintana*,
Alberto G. Montero*, Javier Jiménez*

key Word Index: Fetal hemoglobin, methodology

RESUMEN

Se hace un rápido análisis de las características estructurales y físico-químicas más importantes de la hemoglobina fetal, y de su concentración en diversos procesos hematológicos y no hematológicos. Se comparan estadísticamente los valores de dicha hemoglobina con base en cinco procedimientos, cuatro de ellos colorimétricos y de rutina y uno inmunológico. Se señalan los valores de referencia obtenidos con cada uno de ellos, haciéndose ver la imposibilidad de intercambiar los resultados de un método con respecto a otro, y se sugiere utilizar un determinado método de acuerdo con los valores presuntivos de dicha hemoglobina. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1984; 5(2): 189-199].

INTRODUCCION

Normalmente, el ser humano posee varios tipos de hemoglobina (Hb) durante su desarrollo. En la actualidad, se conoce muy bien la estructura molecular y las funciones de la hemoglobina. Dentro de ellas, la hemoglobina fetal (Hb F) es la predominante en el período fetal. El orden en que aparece y desaparece esta hemoglobina en el ser humano constituye uno de los ejemplos conocidos de la regulación de la síntesis protéica (4). La persistencia de altos niveles de síntesis de hemoglobina fetal en la época postnatal en prematuros, es una clara indicación de que la transición sintética de Hb F a Hb A no está influenciada por la época del nacimiento. Por tal motivo, el grado de la transición sintética de Hb F a Hb A es especie-específica, lo cual quiere decir, al menos en los humanos, que el desvío sintético de una a otra está relacionado el grado de maduración biológica y por tanto no se afecta por una exposición precoz a su vida extrauterina (5).

La hemoglobina fetal es un tetrámero estructural de tipo $\alpha_2\gamma_2$, con cualidades muy particulares. Se destaca su alta afinidad por el O_2 dada por su estructura y su baja interacción con el 2,3 difosfoglicerato (7), característica que le confiere su importante papel funcional en la vida intrauterina, en donde existe una baja tensión de oxígeno en el ambiente placentario.

La observación en 1968 (24, 27) de una heterogeneidad de las cadenas γ , demostró que en la posición 136 de las mismas puede estar presente un residuo de glicina o de alanina. La terminología G_{ϕ} y A_{ϕ} se emplea cuando una glicina o alanina, respectivamente, ocupan dicha posición, variando la tasa de cada una de ellas según la edad o el desorden hereditario en que la Hemoglobina fetal se ve comprometida (15, 24). Posteriormente, en 1976, se observó un nuevo tipo de cadenas γ con un residuo de treonina en lugar de isoleucina en posición 75 (22).

* Centro de Investigación en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA); Cátedra de Hematología, Departamento de Análisis Clínicos, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Hospital San Juan de Dios, San José, Costa Rica.

Por analogía con la anterior nomenclatura, estas globinas se denominan T ϕ e I ϕ .

Por otra parte, la Hemoglobina fetal es la única hemoglobina primaria en donde se presenta isoleucina en sus cadenas gama.

En la actualidad, existen varios métodos para la cuantificación de la hemoglobina fetal, basados la mayoría en la característica relevante de esta hemoglobina de ser resistente a la desnaturalización por álcalis (6, 30). Otros procedimientos son cromatográficos (2, 3, 26), por inmunodifusión radial (IDR) (9, 14) y radioinmunoensayo (13). También existen técnicas citoquímicas, que permiten evaluar la presencia y distribución de esta hemoglobina en los eritrocitos. Una de ellas es de tipo eminentemente fisicoquímico (18) y otra lo es de carácter inmunocitológico (19) Ambas se utilizan tanto para la evaluación de hemorragias materno-fetales (10), como para establecer fenotipos en diversos trastornos hemoglobinopáticos, tales como síndromes talasémicos y los de la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal. El presente trabajo pretende establecer valores de referencia de hemoglobina fetal en una población aparentemente sana, a través de un estudio comparativo de cinco métodos. Asimismo, pretendemos evaluar la bondad de cada uno en diversas condiciones clínicas, en donde dicha determinación es importante para establecer un diagnóstico presuntivo o de certeza.

MATERIALES Y METODOS

Para el estudio se tomaron muestras de sangre periférica de 25 personas aparentemente sanas, 25 de cordón umbilical de recién nacidos sanos, y de un número variable de pacientes que presentaban algún fenotipo hemoglobínico anormal: AS, SS, SS + F, S- β tal, AS- α tal y rasgo de β - tal. Para los estudios comparativos en torno a la hemoglobina fetal se utilizaron cinco métodos cuantitativos para los efectos: inmunodifusión radial (IDR) (Hb F Quiplate, Helena Laboratories, 1530 Lindberg Drive, P.O. Box 752, Beaumont, Texas 77704), Singer *et al* (30), Betke *et al* (6), microtécnica de Serjeant *et al* (29), y un micrométodo como modificación al original de Betke, de acuerdo con Schroeder (28). El método de la IDR es poco conocido en nuestro medio. La IDR tiene como fundamento la reacción antígeno (Ag) anticuerpo (Ac), en un sistema donde existe una fase sólida (Agar con Ac), y una móvil (Hb F= Ag) la cual difunde en el medio. Utilizando diversas diluciones de un patrón de concentración conocida, se puede establecer una curva de calibración y luego extrapolar los valores de la incógnita. Estos principios son aplicados por la Casa Helena, de acuerdo con el método original de Chudwin *et al* (15).

Los métodos de Singer *et al* (30), Betke *et al* (6), Serjeant *et al* (29) y Schroeder (28), se basan en la propiedad de la hemoglobina fetal de no desnaturalizarse cuando se pone en presencia de un álcali (NaOH), en tanto que las restantes hemoglobinas conocidas (A, S, C, etc.), sí lo hacen (salvo la Bart y la Rainier), precipitándoseles posteriormente en una solución de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. En cuanto al micrométodo de Schroeder, preconizado por Huisman (16), no se ha descrito en la literatura, por lo que lo indicamos en su totalidad, toda vez que ya se utiliza en el CIHATA, especialmente para estudios de la hemoglobina fetal en niños: El contenido de tres a cuatro capilares de microhematocrito (o en su defecto, 0,1 ml de sangre venosa) se deposita en un tubo 13 x 100 mm que contiene 5,0 ml de solución salina fisiológica. Se mezcla bien la suspensión, centrifugándose luego por cinco minutos a 2.500 g, con eliminación posterior de todo el sobrenadante. Al sedimento globular se añade 5,0 ml de solución de Drabkin (modificación de Van Kampen y Zijlstra). Mezclar

bien. Tres alícuotas de 1,5 ml de la mezcla se pipetea en tubos separados (12 x 75 mm); dos de ellos se usan para la prueba y el otro como patrón. A los de prueba, se añade 0,1 ml de NaOH 1,2 M, y al patrón 0,1 ml de H₂O. (Con la ayuda de un vortex se facilita la mezcla reactante). **Al minuto exacto**, añadir a cada uno de los tubos de prueba 1,0 ml de solución saturada de (NH₄)₂ SO₄ (*). Mezclar bien. Luego de 5 minutos, filtrar individualmente el contenido de los tubos a través de un pequeño círculo de papel filtro Whatman #1, y leer la A de cada filtrado a 540 nm contra blanco de agua destilada.

$$\% \text{ Hb F} = \frac{\text{A Promedio tubos de prueba}}{\text{A del patrón}} \times 100$$

Valores de referencia: con este microprocedimiento los valores son muy semejantes a los obtenidos con el método de Betke *et al* (6). Es importante destacar que al igual que en el método original (6), la micromodificación no se ve afectada por la presencia de HbCO, derivado hemoglobínico que causa valores erróneamente elevados con los otros métodos de desnaturalización alcalina (29).

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se pueden apreciar los valores de la hemoglobina fetal que se obtuvieron en 25 muestras de adultos aparentemente sanos. Se destaca en el mismo que la IDR es el que ofrece el menor valor de hemoglobina fetal. Analizados dichos valores en cuanto a su grado de correlación, se obtuvieron los datos consignados en el Cuadro 2, donde se aprecia una pobre correlación ($r = 0,52$) entre el método de IDR y el de Singer, y el de Singer con el de Schroeder. Entre los restantes se aprecia un buen coeficiente que varía entre 0,71 - 0,81. Al aplicar las pruebas de significancia se logró ver que la IDR difiere estadísticamente de todos los métodos restantes ($p < 0,05$). Se apreció asimismo una diferencia estadísticamente no significativa entre los pares de métodos Singer-Schroeder y Betke-Serjeant ($p > 0,05$). Por otro lado, se demostró la existencia de diferencias estadísticas entre los pares restantes (Singer-Betke, Singer-Serjeant, Betke-Schroeder, Serjeant-Schroeder) ($p < 0,05$). En las 25 muestras de sangre de cordón umbilical se obtuvo con los métodos de Singer y Betke los valores indicados en el Cuadro 3, donde se aprecia que con el Betke se obtienen valores más bajos que con el Singer, siendo su coeficiente de correlación bajo ($r = 0,62$), existiendo por lo tanto diferencias estadísticamente significativas entre ambos procedimientos ($p < 0,05$).

En el estudio de diferentes cuadros hemoglobinopáticos, se representan, en el Cuadro 4, los hallazgos de los valores promedio encontrados para hemoglobina fetal en síndrome talasémicos, destacándose, con base en los datos, que los índices de correlación de algunos métodos correlacionan bastante bien ($p > 0,05$), en tanto que otros no lo hacen adecuadamente, encontrándose además hallazgos que ponen en duda la posibilidad de interrelacionar los resultados obtenidos con dichos métodos. El mismo problema se presenta en los casos estudiados de hemoglobinas anormales (Cuadro 5), pues no se manifiestan tendencias hacia una correlación aceptable. En algunas ocasiones es buena pero se pierde en otras, presentándose incongruencias analíticas respecto de los resultados obtenidos con las muestras de referencia.

(*) 769,3 g de (NH₄)₂SO₄ se llevan a un litro con agua destilada. Agitar con la ayuda de un magneto por una hora. Utilizar el sobrenadante.

En los casos de beta talasemia menor tipo A₂ alta la relación de los métodos químicos con la IDR no da diferencias estadísticas ($p > 0,05$), pero al correlacionar aquellos se aprecia que el Serjeant versus Schroeder sí ofrecen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), no así en las otras relaciones. En los casos con rasgo de Hb S, hay diferencias estadísticas entre los pares de métodos comparados; IDR versus Schroeder, Betke versus Schroeder ($p < 0,05$), y no se encontraron en los restantes ($p > 0,05$). En cuanto a los casos que presentan niveles ligeramente elevados de Hb F (delta-beta talasemia) se encontró que en la relación del IDR con el Betke y el Serjeant hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), siendo las restantes iguales ($p > 0,05$), lo que demuestra la falta de correlación entre dichos métodos, situación ya señalada en la literatura (29). En la condición SS + F (anemia drepanocítica con Hb F alta) no se encontró diferencias entre los métodos aplicados ($p > 0,05$), lo que viene a reforzar el hecho de la poca concordancia con respecto a lo encontrado en los normales y con otros cuatro estudiados, es decir, no existe una tendencia aceptable de correlación entre los métodos.

DISCUSION

La hemoglobina fetal es un elemento de importancia en la evaluación de diversos procesos clínicos, en su gran mayoría relacionados con la actividad de los genes gama. Normalmente el mecanismo que controla el paso gama \rightarrow beta ("switch") no es reversible, pero en ciertos procesos hematológicos y no hematológicos se evidencia una actividad del genoma fetal, lo cual produce un incremento en los niveles de Hb F. En la eritroleucemia y en la leucemia granulocítica crónica juvenil la reversión es casi total al estado celular fetal (31). Dentro de otros cuadros clínicos en los que se establece el proceso genético anormal, se describen trastornos hereditarios del tipo de las hemoglobinopatías, las de carácter adquirido, en donde se encuentran procesos neoplásicos y algunos tipos de anemias (HPN, anemia megaloblástica etc.), y finalmente, un grupo en donde se incluyen anormalidades cromosómicas y otros problemas que involucran diversos mecanismos etiopatogénicos (1, 17, 23, 32) (Cuadro 6). En torno a los procesos hemoglobinopáticos, hoy en día se están estudiando los mecanismos que regulan el "switch" que cambia la producción de cadenas gama por beta y los factores que en estos y otros desórdenes hacen que se mantengan activos o se reactiven los genes gama. Esta línea de investigación básica persigue establecer, con miras terapéuticas, la bien conocida influencia de la hemoglobina fetal sobre la expresión clínica de determinados problemas, como la drepanocitosis (SS) (12, 21) y síndromes talasémicos mayores (7). En cuanto al incremento de cadenas gama en algunos procesos neoplásicos, se piensa en la existencia de una sustancia de origen humoral producida por la célula tumoral, la cual estimula la síntesis de hemoglobina fetal (8). En el embarazo se ha postulado un mecanismo similar (20). Otros mecanismos están involucrados con su mutación génica y con anormalidades cromosómicas, éstas últimas incluyen translocaciones, deleciones, inversiones y otras, que se traducen en un fenómeno del tipo efecto *cis*, comprendido como una eliminación de la actividad de los genes y/o delta e incremento de la actividad de los genes gama en un mismo cromosoma (17).

El estudio de la hemoglobina fetal como parámetro clínico, hace necesario el establecimiento de una correcta estandarización del método que se utilice. Los procedimientos más usados se basan en la desnaturalización alcalina (6, 28, 29, 30), pero son métodos que se han criticado por ser inexactos, es decir, no ofrecen

valores reales de la hemoglobina fetal. Sin embargo, su uso a nivel clínico no precisa de una buena exactitud. Esta última sí es importante en proyectos de investigación, por lo que para ello se usan los métodos cromatográficos, en unión de análisis de aminoácidos, lo cual permite eliminar la desventaja de la contaminación de la hemoglobina fetal con pequeñas fracciones de hemoglobina (A_{1c} , A_3 , etc). De no procederse así, se pierde exactitud (25). El diseño futuro de mejores y rápidos métodos cromatográficos permitirá sustituir a los de desnaturalización alcalina a corto plazo.

Es claro que los procedimientos de desnaturalización alcalina ofrecen una información adecuada para efectos clínicos, pero una serie de consideraciones deben tomarse en cuenta para obtener resultados confiables. La temperatura, el pH y la concentración del hemolizado son condiciones críticas en estos tipos de determinación (33), lo cual exige estricto control de calidad en la preparación de los reactivos y en las condiciones de la prueba. Por ejemplo, la microtécnica de Serjeant *et al* (29), involucra un control exacto de la temperatura (25°C), circunstancia que dificulta su aplicación en áreas tropicales. La microtécnica de Schroeder (16) elimina el crítico control de temperatura, siendo una técnica sencilla de realizar y que utiliza los reactivos de la técnica de Betke *et al* (6). Además tiene la ventaja de que requiere hemolizados libres de impurezas plasmáticas (proteínas), ya que usa glóbulos rojos lavados. Estas impurezas proteicas en otros métodos tienden a elevar los niveles de Hb F (29).

En nuestro estudio logramos confirmar algunos de los comentarios sobre las bondades o desventajas de los métodos que fueron comparados. La conclusión principal de este trabajo es que los valores obtenidos por cada método no se pueden intercambiar, hecho ya mencionado en la literatura (29). Pareciera prudente que, a fin de poder establecer comparaciones entre un método y otro, se recomiende el uso de un procedimiento para evaluar tasas altas de Hb F y otro para bajas. El popular método de Singer es capaz de dar valores cercanos a los reales cuando los valores son altos o moderados, no siendo tan eficaz cuando lo son bajos (29, 30). Es un método cuyos valores son influenciados por los niveles de metahemoglobina y de carboxihemoglobina, produciéndose, por una interferencia positiva, valores superiores a los reales (6). Para evitar este problema deben utilizarse hemolizados frescos y excluir su aplicación en casos clínicos en donde estos dos derivados hemoglobínicos estén presentes en niveles importantes. También se han descrito problemas con el método de Betke, *et al* (6), pues se ha visto una subestimación de los niveles de hemoglobina fetal cuando los valores están por encima de 10-15 por ciento pudiendo llegar la misma al 30 por ciento del valor real (11), en tanto que los valores son más exactos si éstos son menores del 10-15 por ciento del total de la hemoglobina. En nuestro estudio, logramos apreciar que el método de Betke, en sangre de cordones, dio valores francamente más bajos que el método de Singer, confirmándose aquella apreciación. Un hecho importante que se debe mencionar a favor del método de Betke *et al* (6), es la incorporación en la prueba de HiCN en vez de oxihemoglobina, que es el derivado que utiliza el método de Singer. Esta ventaja de la HiCN elimina o reduce grandemente los dos interferentes más importantes del método de Singer, la metahemoglobina y la carboxihemoglobina (6) Analizando los datos obtenidos y cotejados con algunas publicaciones al respecto, hemos intentado señalar algunas consideraciones sobre los métodos para cuantificar hemoglobina fetal. De los métodos comparados el más exacto y el de elección para el trabajo, es la IDR con la desventaja de que es una técnica que eleva marcadamente el costo de la determinación, hecho que no se justifica en una época de crisis.

En relación a los métodos de desnaturalización alcalina, recomendamos que se debe utilizar una determinada técnica de acuerdo a los niveles presuntivos (observación electroforética) de hemoglobina fetal, bien sea la técnica de Singer para niveles altos, la de Betke para niveles bajos, y la microtécnica de Schroeder cuando la cantidad de muestra dificulte la realización de otro procedimiento.

Todas estas consideraciones nos llevan a proporcionar los valores de referencia para cada uno de los métodos utilizados (Cuadro 1).

ABSTRACT

A brief review of the most important structural, physical and chemical characteristics of fetal hemoglobin is undertaken, as well as an analysis of the usual concentration found in various hematological and non-hematological processes. Based on five different methodologies, four colorimetric ones, and one of immunological nature, the values of this hemoglobin was determined and statistically compared. A reference value for each method is established, and the impossibility of interchanging results between methods is commented upon. According to the expected value of fetal hemoglobin in a given sample, one or another of the methods is recommended.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a HELENA LABORATORIES, Beaumont, Texas la ayuda para la realización de esta investigación, por el obsequio de las placas de inmunodifusión radial para la cuantificación de hemoglobina fetal (Hb F Quiplate Kit).

CUADRO 1
VALORES NORMALES DE Hb F EN ADULTOS POR CINCO METODOS DE CUANTIFICACION

Método	\bar{X}	D.S.	Rango (2 D.S.)
I.D.R. (*)	0,33	0,17	0,00 - 0,65
Singer <i>et al.</i>	0,43	0,20	0,03 - 0,63
Betke <i>et al.</i>	0,59	0,24	0,11 - 1,00
Serjeant <i>et al.</i>	0,61	0,40	0,00 - 1,20
Schroeder	0,50	0,20	0,10 - 0,70

(*) Inmunodifusión radial (%).

CUADRO 2
COEFICIENTES DE CORRELACION ENTRE LOS CINCO METODOS PARA CUANTIFICAR Hb F EN MUESTRAS NORMALES (n= 25)

Método	Singer	Betke	Serjeant	Schroeder
I.D.R.	0,52	0,73	0,74	0,65
Singer	—	0,79	0,71	0,51
Betke	—	—	0,71	0,70
Serjeant	—	—	—	0,60

CUADRO 3

VALORES DE Hb F
EN SANGRE DE CORDON UMBILICAL
(n = 25)

Método	\bar{X}	D.S.	Rango (2 D.S.)
Singer <i>et al.</i>	52,8	6,0	40 - 64,8
Betke, <i>et al.</i>	32,5	8,3	16,2 - 49,1

CUADRO 4

VALORES PROMEDIO (\bar{X}) DE Hb F EN PACIENTES
CON SÍNDROMES TALAEMICOS MENORES

Síndrome	I.D.R.	Singer	Betke	Serjeant	Schroeder
β - tal (n = 14)	1,8	1,6	1,7	1,9	1,4
$\delta\beta$ - tal (n = 6)	9,4	8,0	7,6	7,8	—
α - tal (n = 1)	0,8	1,9	2,9	0,6	0,7

CUADRO 5

VALORES PROMEDIO DE Hb F EN DIFERENTES HEMOGLOBINOPATIAS

Hemoglobinopatía	I.D.R.	Singer	Betke	Serjeant	Schroeder
AS (n = 28)	1,00	0,80	1,10	1,20	1,50
SS + F (n = 7)	14,60	12,20	13,30	12,00	14,40
SS (n = 3)	3,80	2,40	2,17	3,30	—
SC (n = 2)	1,90	1,90	1,30	2,40	2,50
S- $\delta\beta$ tal (n = 2)	27,80	20,50	17,50	25,40	—
AC (n = 2)	0,75	0,47	0,54	0,95	0,61

CUADRO 6

CONDICIONES ASOCIADAS CON ELEVACION DE LOS NIVELES DE LA Hb F

HEREDITARIAS

- I Síndrome de beta—tal
- Estados homocigotos de todos los genes de beta—tal, con niveles que varían entre 60 y 100 por ciento.
 - Rasgo de $\delta\beta$ -tal (F—tal).
 - Doble heterocigotos para β -tal y una variante de la Hb.
 - Doble heterocigotos para β -tal y Persistencia Hereditaria de Hb F heterocelular.
- II Síndromes de alfa—tal:
- Doble heterocigotos para α -tal y una variante estructural de la Hb.
- III Variantes estructurales
Homocigotos para una variante anormal de Hb; particularmente de la Hb S (otras como: Hb Lepore, Hb Pylos, otras).
- IV Persistencia Hereditaria de la Hb Fetal (PHHBF)
- Heterocigotos

1- Tipo negro americano	9—35	(% de Hb F)
2- Tipo griego	10—18	
3- Tipo caucásico no griego	4—7	
4- Tipo inglés	8	
5- Tipo europeo (Suizo)	1—3	
 - Homocigotos tipo negro (100%)
- V PHHBF de carácter heterocelular en heterocigotos (2—5%)
- VI Eliptocitosis y esferocitosis hereditarias; porfiria eritropoyética.

ADQUIRIDAS

Anemia aplásica; anemia megaloblástica; hemoglobinuria paroxismal nocturna; embarazo; eritroleucemia; leucemia aguda y crónica; otros hemosarcomas; mielofibrosis; carcinoma metastásico a médula ósea; enfermedades tiroideas y mola hidatiforme.

OTRAS

Fallo renal crónico; anemia de Fanconi; anomalías cromosómicas (Trisomía D₁, Traslocación C/D con Trisomía D₁).

Tomado de White, J.M. (32), ligeramente modificado (1, 17, 23).

BIBLIOGRAFIA

1. Abraham, E.C. Ozawa, T., Niazi, G.A., Hudson, J.B., Garver, F., Huisman, T.H.J. Hemoglobin F levels in patients with chronic renal failure. *Hemoglobin* 1977; 1:691-695.
2. Abraham, E.C., Carver, J., Dobler, J., Milner, P.F. Huisman, T.H. Microchromatographic quantitation of fetal hemoglobin in patients with sickle cell disease. *Hemoglobin* 1979; 3: 341 -351.
3. Arnold, S. Measurement of foetal hemoglobin. *Project* 1979; 6:95-109.
4. Bard, H. The postnatal decline of Hemoglobin F. Synthesis in normal full term infants. *J. Clin. Invest.* 1975; 55:395-406.
5. Bard, H. Post natal fetal and adult hemoglobin synthesis in early preterm newborn infants. *J. Clin. Invest.* 1975; 55:385-394.
6. Betke, K., Marti, H.R., Schlicht, I. Estimation of small percentage of foetal haemoglobin. *Nature* 1959; 184:1877-1878.
7. Bunn, F., Forget, B.G. Ranney, H.M. *Hemoglobinopathies*. W.B. Saunders Co. New York, 1977; 28-94.
8. Chudwin, D., Rucknagel, D., Scholnick, A., Waldmann, T., McIntire, R. Fetal hemoglobin and alpha-fetoprotein in various malignancies. *Act. Haemat.* 1977; 58:288-293.
9. Chudwin, D., Rucknagel, D. Immunological quantification of Hemoglobin F and A₂ *Clin. Chem. Acta.* 1974; 50:413-418.
10. Eich, G., Tripodi, D. Screening and quantitating fetal maternal hemorrhages. *Am. J. Clin. Pathol.* 1973; 61:192-198.
11. Fairbanks, V.F. Hemoglobin, Hemoglobin derivatives, and Myoglobin. IN: *Fundamentals of Chemical Chemistry*. Tietz, N.W. (ed): W.B. Saunders, New York. 1976; 431-434.
12. Gabuzda, T.G., Nathan, D.G., Gardner, F.H. The turnover of hemoglobins A, F, and A₂ in the peripheral blood of three patients with thalassemia. *J. Clin. Invest.* 1963; 42:1678-1683.
13. Garver, F. Specific radioimmunochemical identification and quantification of hemoglobin A₂ and F. *Am. J. Haemat.* 1976; 1:459-469.
14. Headings, V., Anyaibe, S., Bhattacharya, S., Hopkins, E. Early diagnosis of hemoglobinopathies. *Pediat. Res.* 1972; 12:932-938.
15. Huisman, T.H.J., Harris, H., Gravely, M., Schroeder, W.A., Shelton, J.R. Shelton, J.B. Evans, L. The chemical heterogeneity of the fetal hemoglobin in normal newborn infants and adults. *Molec. Cell Biochem.* 1977; 17:45-55.
16. Huisman, T.H.J. Jonxis, J.H.P. *The hemoglobinopathies: technics of identification*. MarcelDekker, Inc., London, 1977; 120-124.
17. Kazazian, H.H. Regulation of fetal hemoglobin production. *Sem. Hematol.* 1974; 11:525-548.
18. Kleihauer, E., Betke, K., Braun, M. Demonstration von fetalem hamoglobin in den erythrocytem eines blutausstrichs. *Klin. Wochenschr.* 1957; 35:637-638.
19. Makler, M.T., Kirkpatrick, B.A., Uyeda, C.H.T. An immunofluorescent procedure for detection of Hb F (β chain) in peripheral erythrocytes. *Am. J. Clin. Path.* 1975; 64:500-502
20. Pembrey, M.E., Weatherall, D.J. and Clegg, J.B. Maternal synthesis of hemoglobin F in pregnancy *Lancet* 1973; 1:1350-1355.

21. Perrine, R.P., Brown, M.J., Weatherall, D.J., Clegg, J.B., May, A. Benign sickle-cell anaemia. **Lancet** 1972; 2:1163-1167.
22. Ricco, G., Mazza, V., Turi, R.M., Piov, P.G., Camaschella, C., Saglio, G., Bernini, L.F. Significance of the new type of human fetal hemoglobin carrying a replacement isoleucine threonine at position 75 of the ρ chain. **Human Genetics** 1976; 32:305-311.
23. Sáenz, G.F., Moreira, J. **Laboratorio Hemoglobinopatías. Manual Latinoamericano.** Ministerio de Salud, Costa Rica, Depto. Publicaciones e impresos, 1980; 109-110.
24. Schroeder, W.A., Huisman, T.H.J., Shelton, J.R., Shelton, J.B., Kleihauer, E.F., Dozy, A.M. Robertson, B. Evidence for multiple structural genes for the ρ chain of human fetal hemoglobin **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1968; 60:537-544.
25. Schroeder, W.A., Huisman, T.H., Shelton, J. R. Wilson, J.B. An improved method for quantitative determination of human fetal hemoglobin. **Anal. Biochem.** 1970; 35:235-243.
26. Schroeder, W.A., Evans, L., Grussling, L., Abraham, E.C., Huisman, T.H., Lam, H., Shelton, J.B. Microchromatography of hemoglobins. V. Quantitative determination of hemoglobin F in samples with hemoglobin S and/ or C. **Am. J. Hemat.** 1976; 1:331-338.
27. Schroeder, W.A., Huisman, T.H.J., Efremov, G.D., Shelton, J.R., Phillips, R., Reese, A., Gravely, M., Harrison, J.M., Lam, T. Further studies of the frequency and significance of the T ρ chain of the human fetal hemoglobins. **J. Clin. Invest.** 1979; 63:268-274.
28. Schroeder, W.A. **The hemoglobinopathies.** (Huisman, T.H. & Jonxis, J.H.). Marcel Dekker Inc., London, 1977; 122-123.
29. Serjeant, B.E., Clarke, J.M., Desi, P., Serjeant, G.R. A simple micromethod for the measurement of fetal haemoglobin. **J. Clin. Pathol.** 1975; 28:761-764.
30. Singer, K., Chernoff, A.I., Singer, L. Studies on abnormal hemoglobins. I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. **Blood** 1951; 6:413-428.
31. Weatherall, D.J., Edwards, J.A. and Donohoe, W.T.A. Haemoglobin and red cell enzymes changes in juvenile myeloid leukaemia. **Brit. Med. J.** 1968; 1:679-685.
32. White, J.M. The hemoglobinopathies. **IN: Posgraduate Haematology** (Hoffbrand, A.V. and Lewis, S.M. edits), 2nd. Edit., W Heinemann Medical Books Ltd., London, 1981; 190-228.
33. Wolf, P. **Practical Clinical Hematology.** Interpretations and Techniques. John Wiley and Sons New York 1973; 137-140.