



Hemocian-B

IVD

Método colorimétrico para la cuantificación de hemoglobina como cianuro de hemiglobina (Cianmetahemoglobina).

INTRODUCCIÓN

La determinación de hemoglobina es una de las más corrientes en el laboratorio bioquímico clínico y esto solo sería suficiente para entender la importancia de su correcta cuantificación y de la obtención de resultados comparables, independientemente del operador y cualquiera sea el instrumento empleado.

El método de elección en el ámbito internacional es el cianuro de hemoglobina (cianmetahemoglobina). Con esta reacción se valoran todos los derivados hemoglobínicos con la sola excepción de la sulfahemoglobina, el desarrollo de color es rápido y su estabilidad excelente.

USO AL QUE ESTÁ DESTINADO

Método colorimétrico para la cuantificación de hemoglobina como cianuro de hemiglobina (Cianmetahemoglobina).

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La hemoglobina y sus derivados se oxidan por acción del hexacianoferrato (III) de potasio (I) a hemiglobina y ésta se convierte en cianuro de hemiglobina, por unión con el cianuro de potasio.

El uso de una solución tamponada a pH 7,2-7,4 (25°C) permite que la reacción se complete de 3 a 5 minutos. El agregado de una sustancia tensioactiva evita el enturbiamiento de la solución por precipitación de las proteínas a un pH próximo a su punto isoeléctrico. El color que se obtiene es muy estable, (24 horas), y el pico de absorción, localizado a 540 nm, es lo suficientemente ancho como para disminuir los errores originados en pequeños desplazamientos de la longitud de onda nominal en los espectrofotómetros.

ELEMENTOS DEL SISTEMA

Provisto

- **Solución de Hemoglobina:** Solución estabilizada de Hemoglobina con concentración variable según cada lote (Ver rótulo de envase). Lista para usar. Contenido 3 ml.
- **Reactivo diluyente:** Cada frasco ampolla contiene 0,75 mmol de Cianuro de potasio, 0,6 mmol de hexacianoferrato de potasio, 1 mmol de fosfato monoácido de potasio y 1 mmol de fosfato diácido de sodio.
- **Solución de Tensioactivo:** Solución de tensioactivo no iónicos. Lista para usar. Contenido 4 ml.

No provisto

- Agua destilada.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivo diluyente

Preparación: Disolver el contenido de un frasco ampolla en un matraz de un litro, agregar 800 ml de agua destilada y 1 ml de la solución de Tensioactivo. Mezclar hasta completa disolución y llevar a volumen. Conservar refrigerado entre 2-10°C, en frasco color ámbar y mantener el envase bien cerrado.

Precauciones: Este reactivo contiene VENENO. Aplicar las precauciones y cuidados para residuos que contengan cianuros.

MATERIAL REQUERIDO

No provisto

- Matraz.
- Frasco ámbar.
- Cronómetro.
- Tubos de vidrio.
- Material volumétrico adecuado.
- Fotocolorímetro o Espectrofotómetro.
- Gradilla.

ESTABILIDAD Y CONSERVACIÓN

Los reactivos provistos son estables hasta la fecha de vencimiento indicado en cada uno de los rótulos, conservados entre 2-10°C.

MUESTRA

Utilizar sangre entera obtenida con anticoagulantes concentrados o bien desecados. La muestra puede mantenerse 3 días conservada entre 2-10°C. No congelar.

CONDICIONES DE REACCIÓN

Longitud de onda: 540 nm en espectrofotómetro o 520-550 nm en fotocolorímetro con filtro verde.

Temperatura de reacción: temperatura ambiente.

Tiempo de reacción: 5 minutos.

Volumen de muestra: 20 µl.

Volumen de reactivo: 5 ml.

Volumen final de reacción: 5,02 ml.

PROCEDIMIENTO

En dos tubos marcados T y P agregar:

	T	P
Reactivo. diluyente preparado	5 ml	5 ml
Solución de Hemoglobina	20 ul	-
Muestra (Homogeneizar bien)	-	20 ul

Una vez agregada la muestra, enjuagar la pipeta, dentro del tubo, varias veces con el diluyente para asegurar su completo vaciado.

Agitar el tubo durante algunos segundos. Leer después de 5 minutos, a 540 nm en espectrofotómetro, o en fotocolorímetro con filtro verde 520-550 nm, llevando a cero con reactivo diluyente. El color es estable 24 horas.

EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Hemoglobina gr/l = LP x Factor

Factor: CT/LT

Donde: LP = Lectura Problema. CT = Concentración (gr/l) de la solución de hemoglobina. LT= Lectura de la solución de hemoglobina.

La reacción sigue la ley de Beer hasta 260 gr/l, pero cuando se desee comprobar la linealidad de respuesta del aparato utilizado, se podrá realizar una curva de 2 puntos, de la siguiente manera:

Tubo	Solución de Hemoglobina	Solución diluyente	Concentración
1	20 ul	5 ml	Indicada en el Frasco
2	20 ul	10 ml	1:2 Indicada en el Frasco

Leer a 540 nm o filtro verde (520-550 nm). Graficar lecturas vs. concentraciones.

VALORES DE REFERENCIA

Mucho se ha escrito sobre valores de referencia en hemoglobinometría. De acuerdo al sexo se han propuesto:

Hombres: 130 a 180 gr/l.

Mujeres: 110 a 160 gr/l.

Determinaciones realizadas en la ciudad de Córdoba (7), calibrando el procedimiento de acuerdo con el estándar Internacional, se encontraron:

Hombres: 134 a 170 gr/l.

Mujeres: 113 a 152 gr/l.

Con referencia a valores para niños, se han informados los siguientes valores:

Hasta una semana: 195 a 200 gr/l.

1 mes: 150 gr/l.

2 meses: 130 gr/l.

Hasta 2 años: 115 gr/l.

5 años: 130 gr/l.

Alcanzando los valores de adulto hacia la pubertad.



CONTROL DE CALIDAD

Para el control de los resultados diarios, se suministra un frasco de Solución de Hemoglobina, cuya concentración se indica en el rótulo del envase. Esta solución puede emplearse con cualquier reactivo que siga el procedimiento del cianuro de hemoglobina, y se procesa en forma idéntica a la muestra. De los datos acumulados se pueden obtener las gráficas que permitan mantener los resultados bajo control.

LIMITACIONES Y CUIDADOS

- Enrasado de la pipeta: Teniendo en cuenta el pequeño volumen de muestra que se emplea en la determinación, cualquier error en el enrase de la pipeta se traducirá en el resultado. No sólo es importante un enrase exacto, sino que se deberá evitar sobrepasar en más de 1 mm la línea del enrase, al cargar la pipeta, puesto que la misma se enjuaga con la solución diluyente. Al sobrepasar en demasía el enrase, la sangre que queda adherida a las paredes se convierte en un importante error.
- Limpieza de la pipeta: Habrá que tener la precaución de limpiar la pared externa de la pipeta para impedir la obtención de resultados falsos elevados.
- Conservación de la solución diluyente: La solución diluyente es sensible a la acción de la luz por lo que se debe conservar en frascos ámbar. Para evitar la formación de HCN, que altera la composición del reactivo, se recomienda usar frascos con boca angosta y mantenerlos bien cerrados, destapando sólo en el momento de uso y rápidamente volver a tapar.

PERFORMANCE

Reproductibilidad: por procesos de replicados de las mismas muestras se obtuvieron los siguientes datos:

Nivel	D.S.	C.V.
103,7 gr/l	± 0,152 gr/l	1,46 %
142,8 gr/l	± 0,165 gr/l	1,15 %

BIBLIOGRAFÍA

- Standarización de hemoglobinometría clínica. Dem. Méd. 119,2067 (1961).
- Determination of hemoglobin and its derivatives. Advanc. Clin. Chem. 8,141 (1965).
- The relation between report values for hemoglobin and the transfusion rate in a general hospital. Am. J. Clin. Pathol. 32,225 (1959).
- A method for the determination of methemoglobin blood. J. Biol. Chem. 41,237 (1920).
- International Comité for Standardización in Hematology. Brit. J. Haemat. 13 (Suppl.) 71 (1967).
- Standardización of hemoglobinometry. Proc. Konin. Ned Wetenschap. Serie C 72,231 (1969).
- Examen crítico de los índices hematimétricos, valores normales de hemoglobina corpuscular media. Sangre 16,319 (1971).

PRESENTACIÓN

Equipo para 800 determinaciones. COD B03125

Producto elaborado por Laboratorios W. Brizuela S.A.
 Falucho 59 (X5002HMA) - Córdoba, Argentina.
info@brizuela-lab.com.ar
 Producto autorizado por ANMAT N° 6031.
 Director Técnico: Bioq. Marcelo Brizuela.