

Bioquímica Médica II

Práctica: DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA (basado en el sistema BioSystems)

GENERALIDADES

La hemoglobina es una proteína pigmentada de color rojo transportadora de oxígeno que se encuentra solo en los eritrocitos de los vertebrados. Es un tetrámero con dos pares de cadenas polipeptídicas diferentes. Cada una de ellas posee un derivado de la porfirina llamado grupo hemo, que a su vez contiene hierro.

Las dos principales funciones de la hemoglobina son el transporte de oxígeno y amortiguador del pH.

Las concentraciones de hemoglobina están influidas por variaciones fisiológicas como la edad, sexo, deshidratación, postura y altitud, y por procesos patológicos. Se encuentran valores patológicos en anemias y en policitemias.

La determinación de la concentración de hemoglobina se ha convertido en una de las pruebas más importantes en el diagnóstico y tratamiento de la anemia. Las tres causas principales de anemia son: alteración en la síntesis de los eritrocitos en la médula ósea, pérdidas de sangre excesivas y transporte alterado de eritrocitos hacia sangre periférica.

Se observan valores de hemoglobina elevados en policitemia vera, eritrocitosis, deshidratación, recién nacidos, cianosis congénita o adquirida, enfermedad renal y pulmonar crónica, quistes renales y en una serie de tumores productores de eritropoyetina.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO

El ión ferroso de la hemoglobina se oxida a ión férrico por acción del ferricianuro potásico formándose hemiglobina (metahemoglobina). La hemiglobina reacciona con el cianuro para formar cianhemiglobina (cianmetahemoglobina) que se puede medir por espectrofotometría.

COMPOSICIÓN

A. Reactivo Concentrado (50x). Ferricianuro de potasio 30,3 mmol/L, cianuro de potasio 77 mmol/L, dihidrógeno fosfato de potasio 51,4 mmol/L, detergente no iónico 25 g/L.

Nocivo (Xn): R20/21/22: Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel. S7: Manténgase el recipiente bien cerrado. En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua. En caso de accidente o malestar, acuda inmediatamente al médico.

La concentración de cianuro presente en un frasco de reactivo es sensiblemente menor que la dosis mínima letal para un adulto. No obstante, la acidificación ocasiona liberación de ácido cianhídrico por lo que debe evitarse el contacto del reactivo con ácidos.

S. Patrón de Hemoglobina. Hemoglobina humana. La concentración viene indicada en la etiqueta.

La sangre humana utilizada en la preparación del patrón es negativa para el antígeno HBs y para los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV. Sin embargo, el patrón debe tratarse con precaución como potencialmente infeccioso.

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivo de Trabajo: Diluir el contenido del frasco de Reactivo Concentrado hasta 1000 mL con agua destilada. Agitar.

Si se desea preparar otros volúmenes, mezclar en la proporción: 1 mL de Reactivo Concentrado + 49 mL de agua destilada.

Conservar el reactivo diluido en un frasco opaco. Estable 6 meses a 15-30° C. No congelar.

MUESTRAS

Sangre capilar o venosa recogida mediante procedimientos estándar y con heparina o EDTA como anticoagulante.

La hemoglobina en sangre es estable 6 días a 2-8° C.

PROCEDIMIENTO

1. Pipetear en tubos de ensayo: (Nota 1)

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón (S) (opcional)	-	10 µL	-
Muestra	-	-	10 µL
Reactivo de Trabajo	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL

2. Agitar bien y dejar durante 3 minutos a temperatura ambiente.

3. Leer la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 540 nm frente al Blanco. El color es estable durante varias horas.

CÁLCULOS

La concentración de hemoglobina en la muestra se calcula a partir de la fórmula:

Con Patrón:

$$\frac{A_{\text{Muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{Patrón}} = C_{\text{Muestra}}$$

Sin Patrón:

$$A_{\text{Muestra}} \times 37,5 = C_{\text{Muestra}}$$

Nota: La calibración con el factor puede causar sesgos. En estos casos se recomienda calibrar usando el Patrón de Hemoglobina

VALORES DE REFERENCIA

	Hombres	Mujeres
12-14 años	12,0-16,0 g/dL	11,5-15,0 g/dL
15-17 años	11,7-16,6 g/dL	11,7-15,3 g/dL
18-74 años	13,5-17,5 g/dL	12,0-16,0 g/dL

Las personas que viven en lugares de altitud superior a los 1000 m muestran valores significativamente más elevados. En mujeres sanas embarazadas se encuentran generalmente valores más bajos de hemoglobina.

Estos valores se dan únicamente a título orientativo; es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

– Límite de detección: 0,2 g/dL hemoglobina

– Límite de linealidad: 20 g/dL. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra ½ con agua destilada y repetir la medición.

— Interferencias: La bilirrubina no interfiere. La lipemia puede originar resultados falsamente elevados, debidos a la turbidez. Otros medicamentos y sustancias pueden interferir.