

Quantitative determination of hemoglobin IVD

Store at 2-8°C

PRINCIPLE OF THE METHOD

Hemoglobin is oxidized by potassium ferricyanide into methaemoglobin, which is converted into cyanomethaemoglobin, by potassium cyanide.

The intensity of the color formed is proportional to the hemoglobin concentration in the sample^{1,2}.

CLINICAL SIGNIFICANCE

The hemoglobin is a protein that contains iron and that the red color to the blood. The hemoglobin is in red globules and it is the one in charge of oxygen transport by the blood from the lungs to weaves.

When the level of hemoglobin appears underneath the normal levels is describing an anemia that can be of different origins: primary anemia, cancer, pregnancy, renal diseases, and hemorrhages.

If the hemoglobin levels appear high it can be due to: cardiopathies, dehydration and stays in places of much altitude^{1,5,6}.

Clinical diagnosis should not be made on a single test result; it should integrate clinical and other laboratory data.

REAGENTS

HEMOGLOBIN 50x	Potassium ferricyanide	0.60 mmol/L
	Potassium cyanide	77 mmol/L
	Dihydrogen potassium phosphate	2 mmol/L

Optional

HEMOGLOBIN CAL	Hemoglobin Standard 15 g/dL Animal origin	Ref.1001232
----------------	--	-------------

PRECAUTIONS

Potassium cyanide: Harmful (Xn): R26/27/28: Very toxic by inhalation, in contact with skin and if swallowed. R32: Contact with acids liberates very toxic gas.

Environmentally dangerous (N): R52/53: Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

S7: Keep container tightly closed. S28: After contact with skin, wash immediately with plenty of water. S29: Do not empty into drains. S45: In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately. S60: This material and its container must be disposed of as hazardous waste. S61: Avoid release to the environment. Refer to special instructions/safety data sheets.

Cyanide (poison): The amount of cyanide in the Reagent Concentrate (50x) is appreciably less than the minimum lethal dose for an adult. Gaseous hydrogen cyanide will be released on contact with acids.

PREPARATION

Working reagent (WR):

- For 5 mL 4.9 mL of distilled water + 2 drops of Reagent
 - For 250 mL 245 mL of distilled water + 1 vial (5 mL) of Reagent
- Mix well.

Stability: 2 months at 2-8°C, protected from the sunlight.

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.

Do not use reagents over the expiration date.

Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.
- Blank absorbance (A) at 540 nm \geq 0.01.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 540 nm.
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment.

SAMPLES

Venous or capillary blood¹.

Use anticoagulants like EDTA, heparin or oxalate.

Stability of the sample: 1 week at 2-8°C.

PROCEDURE

- Assay conditions:
Wavelength: 540 nm
Cuvette: 1 cm. light path
Temperature 15-25°C

- Adjust the instrument to zero with distilled water.

- Pipette:

A) MACRO METHOD:

	Blank	Standard	Sample
WR (mL)	5.0	5.0	5.0
Calibrator (μL)	--	20	--
Sample (μL)	--	--	20

B) MICRO METHOD:

	Blank	Standard	Sample
WR (mL)	2.5	2.5	2.5
Calibrator (μL)	--	10	--
Sample (μL)	--	--	10

- Mix and incubate for 3 min. at room temperature (15-25°C).
- Read the absorbance (A) of the samples and calibrator, against the Blank.

CALCULATIONS

- With factor²:

$$(A) \text{ Sample} \times 36.77 = \text{g/dL hemoglobin in the sample}$$

- With calibrator:

$$\frac{(A) \text{ Sample}}{(A) \text{ Standard}} \times 15 (\text{Standard conc.}) = \text{g/dL hemoglobin in the sample}$$

QUALITY CONTROL

Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES¹

Men 14 - 18 g/dL \cong 8.7 - 11.2 mmol/L

Women 12 - 16 g/dL \cong 7.5 - 9.9 mmol/L

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Measuring range: From detection limit of 0.1 g/dL to linearity limit of 20 g/dL.

If the results obtained were greater than linearity limit, dilute the sample 1/2 with NaCl 9 g/L and multiply the result by 2.

Precision:

	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
Mean (g/dL)	8.00	15.2	7.81	15.1
SD	0.29	0.33	0.19	0.26
CV (%)	3.59	2.19	2.51	1.74

Sensitivity: 1 g/dL = 0,027 A.

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents did not show systematic differences when compared with other commercial reagents.

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES

A list of drugs and other interfering substances with hemoglobin determination has been reported by Young et. al^{3,4}.

NOTES

SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

BIBLIOGRAPHY

- Franco R S. Hemoglobin. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1294-1296 and 418.
- Van Kampen EJ et al. Standardization of hemoglobinometry Clin. Chim 1961;6: 438-544.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACC 2001.
- Burtis A. et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACC 1995.

PACKAGING

HEMOGLOBIN Ref: 1001230

Cont.

4 x 5 mL

Hemoglobina

Drabkin. Colorimétrico

Determinación cuantitativa de hemoglobina IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

La hemoglobina es oxidada por la acción del ferricianuro a metahemoglobina y mediante el cianuro se convierte en cianmetahemoglobina.

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de hemoglobina presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLINICO

La hemoglobina es una proteína que contiene hierro, otorga el color rojo a la sangre. Se encuentra en los glóbulos rojos y es la encargada del transporte de oxígeno por la sangre desde los pulmones a los tejidos. Cuando el nivel de hemoglobina aparece por debajo de los niveles normales indica anemia que puede obedecer a diferentes causas: anemia primaria, cáncer, embarazo, enfermedades renales o hemorragias.

Si el nivel de hemoglobina es alto puede deberse a cardiopatías, deshidratación o estancia en lugares de gran altitud^{1,5,6}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

HEMOGLOBIN 50x	Ferricianuro de potasio	0,60 mmol/L
	Cianuro de potasio	77 mmol/L
	Dihidrogeno fosfato de potasio	2 mmol/L

Opcional

HEMOGLOBIN CAL	Patrón de Hemoglobina 15 g/dL Origen animal	Ref.1001232
----------------	--	-------------

PRECAUCIONES

Cianuro de potasio: Nocivo (Xn): R26/27/28: Muy tóxico por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel. R32: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

Peligroso para el medio ambiente (N): R52/53: Nocivo para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.

S7: Manténgase el recipiente bien cerrado. S28: En contacto con la piel, lavar inmediatamente y abundantemente con agua. S45: En caso de accidente o malestar, acudir inmediatamente al médico. S60: Elimínese el producto y su recipiente como residuos peligrosos. S61: Evítense su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas/ las fichas de datos de seguridad.

Cianuro (venenoso): La concentración de cianuro en el Reactivo concentrado (50x) es sensiblemente menor que la dosis mínima letal para el adulto. Su acidificación puede provocar liberación de ácido cianhídrico.

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT):

- Para 5 mL 4,9 mL agua destilada + 2 gotas de Reactivo

- Para 250 mL 245 mL agua destilada + 1 frasco (5 mL) de Reactivo Mezclar bien.

Estabilidad: 2 meses en nevera a 2-8°C, protegido de la luz.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso.

No usar reactivos **fuera de la fecha indicada**.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- **Presencia de partículas y turbidez.**

- **Absorbancia (A) del Blanco a 540 nm $\geq 0,01$.**

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 540 nm.

- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.

- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Sangre capilar o venosa¹.

Usar anticoagulantes como EDTA, heparina u oxalato.

Estabilidad de la muestra: 1 semana a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 540 nm
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear:

A) METODO MACRO

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	5,0	5,0	5,0
Calibrador (μ L)	--	20	--
Muestra (μ L)	--	--	20

B) METODO MICRO

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	2,5	2,5	2,5
Calibrador (μ L)	--	10	--
Muestra (μ L)	--	--	10

- Mezclar e incubar 3 minutos a temperatura ambiente (15-25°C).
- Leer la absorbancia (A) del calibrador y la muestra, frente al Blanco de reactivo.

CALCULOS

- **Con factor²:**

$$(A) \text{ Muestra} \times 36,77 = \text{g/dL de hemoglobina en la muestra}$$

- **Con Patrón:**

$$\frac{(A) \text{ Muestra}}{(A) \text{ Patrón}} \times 15 (\text{Conc. Patrón}) = \text{g/dL de hemoglobina en la muestra}$$

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

Hombres 14 - 18 g/dL \cong 8,7 - 11,2 mmol/L

Mujeres 12 - 16 g/dL \cong 7,5 - 9,9 mmol/L

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el *limite de detección* de 0,1 g/dL hasta el *limite de linealidad* de 20 g/dL.

Si la concentración de la muestra es superior al limite de linealidad, diluir 1/2 con CINA 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
Media (g/dL)	8,00	15,2	7,81	15,1
SD	0,29	0,33	0,19	0,26
CV (%)	3,59	2,19	2,51	1,74

Sensibilidad analítica: 1 g/dL = 0,027 A.

Exactitud: Los reactivos de SPINREACT no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la hemoglobina^{3,4}.

NOTAS

SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

- Franco R S. Hemoglobin. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1294-1296 and 418.
- Van Kampen EJ et al. Standardization of hemoglobinometry Clin. Chim 1961;6: 438-544.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACC 2001.
- Burtis A. et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACC 1995.

PRESENTACION

HEMOGLOBIN Ref: 1001230

Cont.

4 x 5 mL