

FINALIDADE

Sistema colorimétrico para a determinação de hemoglobina no sangue total.

Somente para uso diagnóstico in vitro.

PRINCÍPIO

A hemoglobina é oxidada por Ferricianeto de Potássio, dando origem a hemiglobina. Combinada com o Cianeto de Potássio, leva à formação de um composto estável, o Cianeto de Hemiglobina. A cor resultante é de intensidade proporcional ao teor de hemoglobina no sangue.

PARTICULARIDADES DO SISTEMA

A determinação da hemoglobina através de sua conversão a Cianeto de Hemiglobina com o reagente de Drabkin, modificado segundo Van Kampen e Zijlstra, permite que, a um pH controlado $7,2 \pm 0,2$, todos hemocromógenos reajam de maneira homogênea, independentemente dos diversos tipos presentes de hemoglobina, em um mínimo de tempo. A adição de um detergente não iônico facilita a lise total das hemácias e evita a turvação do reagente final nas amostras sanguíneas com dislipidemias ou disproteinemias.

METODOLOGIA

Cianeto de Metahemoglobina.

REAGENTE

Reagente de cor concentrado. O reagente de cor concentrado apresenta a seguinte formulação: Fosfato de Potássio monobásico 0,1M, Ferricianeto de Potássio 0,06M, Cianeto de Potássio 0,077M e Triton X-100 0,082M.

Cada frasco contém 50mg de Cianeto de Potássio.

APRESENTAÇÃO

Reagente de cor concentrado 2 x 10mL

NÚMERO DE TESTES

400 - 800 testes

EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Espectrofotômetro ou fotocolorímetro capaz de medir a absorvância em 540nm ou filtro verde.
- **Hb padrão - Doles**
- Tubos de ensaio.
- Pipetas graduadas.
- Pipeta semiautomática 20µL.
- Frasco âmbar com capacidade volumétrica para 1000mL.
- Cronômetro.
- Ponteiras descartáveis.
- Água deionizada ou destilada.
- Balão volumétrico de 1000mL.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE DOS REAGENTES

Reagente de cor concentrado: armazenar à temperatura ambiente (20-30°C). Estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco, se obedecidas as condições de armazenamento.

Reagente de cor de uso: armazenar à temperatura ambiente (20-30°C). Estável por 12 meses, se mantido ao abrigo da luz. Não deve ser congelado.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES COM O USO DOS REAGENTES

Todos os reagentes são somente para **uso diagnóstico in vitro**. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se contato com pele e mucosas. **Cada 5mL do reagente de cor contém 0,25mg de Cianeto (tóxico)**. Não pipetar com a boca. Em caso de contaminação acidental, lavar abundantemente a parte afetada em água corrente.

O reagente de cor concentrado e o de uso não devem ser desprezados em pias que contenham resíduos de ácidos. O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se aos critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório, de acordo com as normas locais, estaduais ou federais.

Observar ainda a simbologia constante nos rótulos do produto:



Venenoso



Irritante

AMOSTRA

Sangue total colhido com Anticoagulante Universal Doles, na proporção de uma gota de anticoagulante para cada 5mL de sangue. Colher o sangue com o mínimo de estase. Se o exame não for realizado no mesmo dia, conservar a amostra entre 2 e 8°C.

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas como potencialmente infectantes.

PROCEDIMENTO TÉCNICO

Preparo do reagente de cor de uso:

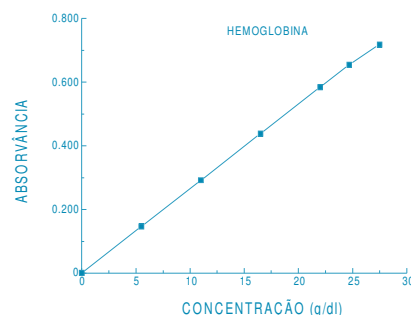
Transferir todo o conteúdo de um frasco de reagente de cor concentrado para um balão volumétrico de 1000mL. Acertar o volume à marca, com água destilada ou deionizada, homogeneizar e transferir para um frasco âmbar, devidamente identificado. **Não armazenar em frasco plástico. O material plástico adsorve o cianeto, levando à obtenção de resultados artificialmente baixos nos exames.** O frasco empregado para armazenar o reagente de cor não deve estar contaminado por resíduos ácidos, bases ou solventes orgânicos.

Mantida ao abrigo da luz, a solução permanece estável, no mínimo, por 12 meses. **A solução não deve ser congelada.**

TÉCNICA

1. Rotular um tubo de ensaio com **T (sangue em estudo)** e adicionar **5mL do reagente de cor (uso)**.
2. Pipetar no tubo **T** 20µL de sangue total, lavando internamente a pipeta com a solução do **reagente de cor**.
3. Homogeneizar e deixar repousar durante 3 minutos, à temperatura de 20-30°C. Ler as absorvâncias em espectrofotômetro ou fotocolorímetro em **540nm** ou **filtro verde**, zerando o aparelho com um **branco** representado por água destilada ou deionizada.

CURVA DE CALIBRAÇÃO



Padrão	Absorvância	Conc. (g/dL)
1	0.000	0
2	0.146	5,5
3	0.292	11,0
4	0.438	16,5
5	0.584	22,0
6	0.655	24,7
7	0.718	27,5



Obs.: Não utilizar esta curva para determinar o resultado de seu ensaio.

- A curva de calibração é a representação gráfica da relação entre os valores das absorvâncias com os valores das concentrações de um conjunto de soluções padrão. São necessários três passos para confeccioná-la: (1) preparo das soluções padrão; (2) medição dos valores de absorvância das soluções padrão, de acordo com o especificado no procedimento técnico da presente instrução de uso, e (3) montagem de um gráfico, em papel especial, linear, onde são relacionados os valores de absorvância com os de concentração, conforme demonstrado na figura acima.

As dosagens para montagem da curva foram feitas em um espectrofotômetro "Ultrospec III", Pharmacia Biotec, comprimento de onda de 540nm e cubetas com passagem de luz de 10mm.

- A curva de calibração demonstra a linearidade da reação até uma determinada concentração, na qual pode ser determinado um fator de calibração (F) de acordo com a Lei de Beer.
- **A reação é linear até a concentração de 25g/dL (ver curva acima). Obtendo-se valores mais elevados, diluir a amostra com solução fisiológica e proceder-se à nova dosagem. Multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição.**
- **O Hb padrão Doles possui uma concentração no intervalo de linearidade da metodologia adotada. O laboratório deve realizar a leitura do Hb padrão e calcular seu fator de calibração (F) de acordo com o exemplo estabelecido nos cálculos.**
- **O fator deverá ser refeito periodicamente e a cada lote do produto.**
- Os padrões utilizados na curva de calibração foram ajustados contra Hb padrão Doles e Hemoglobina Standard, cat.525-18 Sigma Chemical Company.

CÁLCULOS

$$\text{Hb (g/dL)} = \text{absorvância T} \times \text{Fator (F)}$$

Como a reação corada segue estritamente a lei de Beer, basta que se determine um fator (F) para cálculo dos resultados.

Obs.: O fator para cálculo da hemoglobina total é determinado com Hb padrão Doles.

Exemplo:
Leituras
F = 39
Teste = 0,300

$$\text{Hb (g/dL)} = 0,300 \times 39 = 11,7$$

EXPRESSÃO DOS RESULTADOS EM UNIDADES S.I.

$$\text{Hb (mmol/L)} = \text{Hb (g/dL)} \times 0,621$$

LIMITAÇÕES DO SISTEMA

- Para se obter ótimo desempenho do sistema, é necessário que o procedimento técnico seja rigorosamente seguido, conforme instruções de uso. Qualquer alteração no procedimento técnico poderá levar a resultados errôneos.
- A relação hematócrito e hemoglobina se torna correlacionável mediante o uso de uma gota de anti-coagulante universal para cada 5mL de sangue. O excesso de anti-coagulante levará a resultados de hematócrito falsamente diminuídos. A concentração da taxa de

hemoglobina e a contagem celular não são afetadas.

- A amostra deve ser corretamente homogeneizada após a coleta a fim de se evitar a formação de coágulos que levariam a resultados artificialmente baixos.
- O sangue total, quando coletado com oxalato, requer um tempo maior para que a leitura da reação seja feita no espectrofotômetro.
- A formação de Cianeto de Hemoglobina é mais lenta na presença de sais do ácido oxálico.
- EDTA e heparina são os anticoagulantes de escolha para dosagem da hemoglobina.
- Moradores em regiões de grande altitude possuem valores altos de hemoglobina.
- Atividades musculares e estase venosa prolongada poderão levar a resultados de hematócrito falsamente elevados.
- Algumas drogas como: gentamicina e metildopa (Aldomet), podem causar valores elevados de hemoglobina.
- Algumas drogas como: citostáticos, aspirina, indometacina, rifampicina e sulfonamidas, podem diminuir os níveis de hemoglobina.

CONTROLE DA QUALIDADE DO SISTEMA

1. A limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos.
2. A água utilizada na limpeza do material, preparo dos reagentes e dosagem, deve ser de boa qualidade.
3. Colunas deionizadoras saturadas liberam íons diversos, aminas e agentes oxidantes, que deterioram os reagentes.
4. As pipetagens devem ser precisas.

VALORES DE REFERÊNCIA

É recomendado que cada laboratório estabeleça sua própria faixa de valores de referência na população atendida.

Condições sócio-econômicas, variações geográficas e climáticas exercem influência sobre os vários índices hematológicos. Tamigaki, Maspes e Jamra citam como índices normais, obtidos na cidade de São Paulo, os seguintes valores: sexo masculino, de 12,7 a 18,0g Hb/dL; sexo feminino, de 10,7 a 15,4g Hb/dL. Tais valores se superpõem aos descritos por Henry (E.U.A.), os quais se situam na faixa de 13 a 18g Hb/dL, para o sexo masculino, e de 11 a 16g Hb/dL, para o sexo feminino.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A concentração de hemoglobina oscila com a idade, sexo, altitude e a hora do dia em que se faz a determinação. Nos recém-nascidos a taxa de hemoglobina é alta. Do terceiro mês ao primeiro ano de vida, o nível de hemoglobina, em geral, está abaixo da média observada em crianças com idade superior a 1 ano, devido ao baixo nível de ferro no leite materno. As mulheres apresentam taxa de hemoglobina inferiores às dos homens. Valores baixos de hemoglobina ocorrem durante a gravidez devido ao aumento do volume sanguíneo.

Em condições patológicas, a concentração de hemoglobina pode estar aumentada ou diminuída. Valores elevados ocorrem em casos de policitemia vera, desidratação, cardiopatias congênitas, hemoconcentração, cor-pulmonale crônico entre outros. Valores diminuídos de hemoglobina ocorrem nas anemia, hemorragias, hemólises, hemoglobinopatias, deficiências nutricionais, lúpus eritematoso sistêmico e câncer.



CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Foram realizados 40 testes em amostras cujos teores de hemoglobina se situavam no intervalo de 7,4 - 17,3g/dL. Esses ensaios foram realizados em paralelo com uma metodologia de referência. A comparação do kit de Hemoglobina Doles (Y) com a metodologia mencionada (X), deu origem à seguinte equação de regressão linear: $Y = 1,016X - 0,22$, sendo o coeficiente de correlação 0,99.

Testes mostraram uma recuperação de 100 +/- 2%.

Repetitividade: foram realizadas 20 dosagens sucessivas, com uma amostra, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra
Concentração (g/dL)	12,06
Desvio padrão	0,18
Coefficiente de variação (%)	1,49

Reprodutibilidade: foram realizadas 20 dosagens durante 20 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra
Concentração (g/dL)	13,37
Desvio padrão	0,24
Coefficiente de variação (%)	1,79

Especificidade: O método de cianometemoglobina é o de escolha, por sua exatidão, especificidade e sensibilidade, permitindo dosar todas as formas de hemoglobina, normais e anormais, exceto a sulfemoglobina. Este método foi recomendado pelo Subcommittee on Hemoglobinometry of The International Committee for Standardization in Hematology.

Sensibilidade: a absorvância de 0,014 corresponde a uma concentração de 0,5g/dL de Hemoglobina, quando medida em espectrofotômetro, em 540nm e 10mm de passagem de luz.

A sensibilidade do sistema está estritamente relacionada com a sensibilidade do aparelho utilizado no laboratório.

Diluição da matriz: estudos sucessivos de diluição da matriz mostraram que não há interferência na sensibilidade diagnóstica da presente metodologia.

Substâncias interferentes:

- Durante a realização do teste, amostras lipêmicas e de portadores de leucemia mieloide crônica podem apresentar uma densidade óptica mais elevada, secundária à não dissolução total dos lipídeos ou à permanência em suspensão de detritos dos leucócitos.
- Valores elevados de Bilirrubina (acima de 36mg/dL) podem interferir na leitura do espectrofotômetro.
- Algumas drogas como: antibióticos, drogas antineoplásicas, aspirina, indometacina, rifampicina e sulfonamidas podem diminuir os níveis de hemoglobina.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Van Kampen, E.J.e Zijlstra W. C.: Clin. Chim. Acta 6, 538, 1961.
- Henry ,R.J.: Clinical chemistry, principles and techniques 2ª edição (1974) Harper & Row Chap. 23.
- Tamigaki, M.; Maspes V e Jamra M.: Parâmetros hematológicos normais. Adultos e adolescentes: Ver. Bras. de Pesquisas Med. Biol. 2 (5-6): 384-402, 1969.
- Assendelft O .W.V.: Spectrophotometry of haemoglobin derivatives, 1970.
- Pagana K.D.: Mosby's Diagnostic and laboratory test reference, 402-403, 1992.
- Steininger C.A.L.; Martin E.A.S. e Kaepke J.A.: Clinical hematology, 188-189, 1992.
- Failace R.: Hemograma manual de interpretação, 3ª edição, 23-28, 1995.
- Tibúrcio, H.M.: Controle interno da qualidade analítica, 1ªed. março/1995.
- Jacobs D.S.; Kasten B.L.; Demott W.R.; e Wolfson W.L.:Laboratory test handbook; 4ª edição; 322-323; 1996.
- Henry J.B.: Clinical diagnosis and management by laboratory methods, 549-554, 1996.
- Doles: dados de arquivo.

TERMOS E CONDIÇÕES DE GARANTIA DA QUALIDADE DO PRODUTO

As garantias do fabricante ao consumidor seguem estritamente as relacionadas na Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1.990 - **Código de Defesa do Consumidor**. Todos os reagentes que compõem este sistema para diagnóstico são garantidos na sua performance, reprodutibilidade e qualidade até a data de vencimento dos mesmos, se obedecidas as condições abaixo:

- 1.O usuário do sistema seguir, rigorosamente, o procedimento técnico
- 2.As condições de armazenamento deverão estar de acordo com o estabelecido nas instruções de uso.
- 3.Os materiais necessários e não fornecidos deverão estar em boas condições técnicas.

Todos os produtos que apresentarem problemas técnicos comprovados serão substituídos, sem ônus para o consumidor.

Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda.

CNPJ: 01.085.513/0001-05

Rodovia BR 153, Km 1273, Lt.07, Chácara Retiro

Caixa Postal 1051

CEP: 74001-970 Goiânia - GO - Brasil

e-mail: doles@doles.com.br

M.S.: nº 10231810057

Revisão: 12 (06/2009)

NBR ISO 9001

Sistema da Qualidade certificado desde 1999

