HEMOGLOBINOMETRIA
NORMALIZACION DE LA METODOLOGIA
PREPARACION NACIONAL DEL ESTANDAR DE CALIBRACION
Y DEL HEMOLIZADO CONTROL

German F. Sáenz, Mario Chaves, Eliécer Valenciano
Alberto G. Montero y Javier Jiménez

Key Word Index: Hemoglobinometry

RESUMEN

Se indican las características esenciales del método de la HiCN para la medición cuantitativa de Hb. Se hace ver la importancia del diluente de Van Kampen y Zijestra (VKZ), para tales efectos y la aplicabilidad de las soluciones patrón para la calibración de los fotómetros. En detalle se especifica la preparación nacional del patrón concentrado de HiCN (CIANO-CIHATA) y del hemolizado control (HEMO-CIHATA). Finalmente se propone un práctico programa de control de calidad y se indica un corolario sobre los errores sistemáticos en los que se puede incurrir en la hemoglobinometría. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1984; 5(1): 83 - 96].

INTRODUCCION

La determinación de la concentración de hemoglobina (Hb) es fundamental en el diagnóstico de anemia y policitemia, y es uno de los análisis que se practica con más frecuencia en el laboratorio clínico. Sin embargo, esta determinación, tan sencilla en su procedimiento, está sujeta a una serie de variables, las cuales de no tomarse en cuenta, afectan en forma considerable los resultados obtenidos. Esto es aún cierto para el universalmente aceptado método de la cianometahemoglobina (HiCN), el cual se adoptó como método de referencia por el Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH) en el año 1964, procediéndose tanto a su estandarización como a la elaboración de un patrón HiCN de referencia (7). Finalmente, el XI Congreso Internacional de Hematología en 1966 (10) aprobó el método de la HiCN, y el patrón HiCN de referencia fue considerado como "Patrón de Referencia Internacional" por la OMS en 1968 (20).
En este artículo se intenta señalar todos los aspectos relacionados con una correcta hemoglobinometría en base al método de la HiCN, su normalización, el uso de reactivos preparados en el país y un pequeño programa de control de calidad. Ya en 1979, habíamos publicado un estudio parcial sobre el particular (16).

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

GENERALIDADES SOBRE CONSIDERACIONES ANALITICAS

Principio del Método de la HiCN:
El método de la HiCN tiene como fundamento la conversión de toda la Hb en HiCN, cuya absorbancia es leída en un fotocolorímetro (filtro verde-amarillo) o en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Dicha transformación se lleva a cabo en dos etapas (18): en la primera el ferricianuro potásico (k_3 Fe (CN)6) pasa el Fe^{+2} a Fe^{+3} (Hi) y, en la segunda, el cianuro potásico (KCN) convierte a la Hi (metaHb) en HiCN (cianometaHb). Todos los derivados de la Hb (Hb, HbO_2 , HbCO, Hi) son convertidos en HiCN, salvo la HbS (sulfo Hb).

MATERIALES

Sangre: puede usarse indistintamente sangre total o capilar. No existe requisito alguno para el tipo de anticoagulante, aunque el recomendado es el EDTA.

Pipetas volumétricas calibradas de cristal (de 5 ml, preferiblemente no terminal) con precisión de ± 0.5 por ciento.

Micropipetas tipo Sahli de 0.020 ml (20 ul). Estas pipetas requieren de un cuidado especial de mantenimiento. Se recomienda sumergirlas periódicamente en solución acuosa de detergente y semanalmente en una solución de HCL 0.1 N(1).

La pipeta de Sahli para Hb está calibrada para contener 0,020 ml (20 ul). Es por tanto una pipeta TC. El uso de este tipo de pipeta requiere que la muestra biológica se lleve encima de la marca, evitándose sobrepasar la misma a fin de no contaminar la luz de la pipeta que no participa en la volumetría de los 20 ul. Es importante que el ajuste exacto de los 20 ul se realice con una toalla absorbente y que ésta también se use para limpiar bien el exterior de la pipeta. En todo caso, es deseable que la pipeta no se introduzca más allá de 2 mm en la muestra de sangre. Posteriormente su contenido es depositado en el fondo del tubo que contiene el diluente, lavándose varias veces la luz de la pipeta con el mismo, tratándose de evitar que el diluente sobrepase el aforo en esos repetidos lavados, pues de otra forma se añadiría un factor de contaminación de la muestra respecto del volumen nominal.

Calibración de la pipeta
La calibración inexacta de esta micropipeta constituye una importante fuente de error en la hemoglobinometría. Un procedimiento gravimétrico, que emplea mercurio como la sustancia contenida por la pipeta, puede ser usado para confirmar una calibración adecuada. El método es el siguiente (2):
Engrasar el émbolo de una jeringa de 2 ml, a fin de proveer un sello hermético. Insertar el eje o espiga de la jeringa en un tapón de hule al cual se le ha practicado un hueco adecuado para el propósito. Insertar el extremo superior de una pipeta Sahli en el otro lado (diámetro menor) del tapón de hule.
Adoptar el sistema (jeringa-tapón-pipeta) a una prensa universal o de cualquier otra forma, a fin de que quede exactamente vertical. Colocar un poco de mercurio seco en un beaker pequeño. Aspírese lentamente el Hg estando la punta de la pipeta Sahli ligeramente por debajo de la superficie del Hg.

Aforar hasta que el menisco del Hg se halle exactamente sobre la marca de la calibración de los 20 ul. Retirar con la mano lentamente el beaker de la pipeta. Tómese otro pequeño beaker y expélase totalmente el contenido de la pipeta con un movimiento cuidadoso del émbolo. Obtenga en una balanza analítica el peso del Hg y divídalo por la densidad del mismo a la temperatura del experimento. Esta simple operación permitirá obtener el volumen exacto de la micropipeta ($V = {}^{P/D}$). La densidad del Hg a 25± 5°C es de 13,5340 ± 0,0123 (± 0,091%). Por lo tanto, para temperaturas entre 20 y 30°C, es suficientemente exacto usar la densidad de 25°C. La pipeta de Sahli también puede calibrarse por varios procedimientos titrimétricos o espectrofotométricos. Citaremos uno de éstos (2), el cual perfectamente puede utilizarse en vez del gravimétrico citado.
Se utiliza una solución de ferricianuro de potasio al 4 por ciento. Un volumen de esta solución con la pipeta de Sahli (20 ul), se añade a 200 volúmenes de agua (4,00 ml) a fin de lograr una microdilución de 1/201. Una macrodilución 1/201 se prepara añadiendo 1,00 ml de la solución de ferricianuro en un frasco volumétrico de 200 ml, previamente aforado con agua destilada. La absorbancia de cada dilución se mide entonces en un espectrofotómetro a 420 nm, preferiblemente en cubeta cuadrada de 1,000 cm de paso de luz, contra agua como blanco. Usese el promedio de tres determinaciones:

$$\frac{\text{Promedio A (micro)}}{\text{Promedio A (macro)}} \times \text{capacidad (ul)} = \text{capacidad (ul) real nominal}$$

La incertidumbre permisible para una micropipeta tipo Sahli es del 1 por ciento o menos (20 ± 0.2 ul).

Cubetas: Se debe utilizar cubetas limpias, no deterioradas y calibradas. Si se utilizan celdas cuadradas de 1,000cm de paso de luz, la tolerancia debe ser de 0,50 por ciento, o sea de 0.995 a 1,005cm. Luego de utilizadas deben lavarse con detergente y abundante agua destilada. Una vez a la semana es aconsejable sumergirlas por 24 - 48 horas en mezcla sulfocrómica diluida.

Reactivo diluente: (Drabkin, modificado por Van Kampen y Zijlstra (VKZ) (18)

$K_3 Fe (CN)_6$ (RA)	200 mg
KCN (RA)	50 mg
$KH_2 PO_4$ (RA)	140 mg
Sterox SE (Harleco)	0.5 ml
$H_2 O$ destilada (hasta)	1000 ml

Las características físicas de este diluente son las siguientes: color amarillo pálido, una transparencia absoluta, un pH de 7.2 (7.0 - 7.4), un espectro de absorción lumínica característico de la HiCN, y una absorbancia a 540 nm de 0,00 medida contra H_20 destilada. Esta solución es estable por lo menos seis meses a temperatura ambiente, siempre y cuando se conserve en botellas de polietileno (16), aunque es preferible el uso de botellas de borosilicato marrón, ya que así se previene la pérdida de grupos CN De otra forma, se generaría más Hi que HiCN, por lo que los valores de Hb que se obtuvieron serían inferiores

a los reales (19). Es importante recalcar que este diluente de VKZ no debe congelarse ni mantenerse a una temperatura inferior a los 4°C, ya que si ello sucediera, el K_3 Fe $(CN)_6$ se transformaría en K_4 Fe $(CN)_6$, con una consiguiente oxidación parcial de la Hb a Hi. Pueden emplearse otros detergentes no iónicos: Nonidet P40 (Shell International) 1 ml/1, saponic (Alcoa-Inc) 1 ml/l, tritón X-100 (Rohn and Haas) 1 ml/l, Nonic 218 (Pennsalt Chemicals) 1 ml/l Qualac Nic 218 (Unibasic) 1 ml/l. No es recomendable el uso de la solución original de Drabkin, debido a su pH excesivamente elevado (8.5) y a un tiempo de reacción total relativamente prolongado (10 - 20 minutos) (1,10). La solución reactiva de VKZ además de un pH óptimo para la reacción (7.0 - 7.4), incluye a un detergente no iónico. Con ello, se consigue disminuir el tiempo necesario para la conversión a HiCN y se facilita la hemólisis y la estromatólisis, evitándose asimismo la aparición de precipitados proteicos y por lo tanto, turbidez (18).

Esta última propiedad, se ve influenciada también por el efecto tampón del KH_2PO_4 (19). Esta serie de factores favorables hacen que el uso del reactivo de VKZ permita obtenerlos valores de Hb en 2-3 minutos (11, 16, 18). El KCN en la cantidad empleada por litro de diluente no entraña ningún peligro; sería necesario la ingestación de cuatro litros de dicho reactivo para que se apreciaran los efectos tóxicos de esa sal (19). El diluente de VKZ puede prepararse a partir de un diluente concentrado diez veces, el cual se conserva bien por varios meses a temperatura ambiente en frascos ámbar. Si de enturbia, debe desechársele. Al momento de usar, diluir 1:10 con agua destilada. La calidad del reactivo de VKZ será producto del grado de pureza de los reactivos utilizados, la exactitud de la pesada de los mismos, la calidad del agua, el pl-! final de la solución y de los procedimientos de conservación que aseguran su estabilidad. Estos aspectos se deben comprobar de la siguiente manera:

a) Su absorbancia a 540 nm debe ser de cero contra agua.

b) Su capacidad de conversión de la Hb a HiCN debe ser óptima, con una razón entre 1.58 y 1.63, al dividirse la A^{540} sobre la A^{540}.

c) La A a 750 nm debe ser menor de 0,002.

Patrón o estándar de HICN de Referencia Internacional

Corresponde a una solución de HiCN producida bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud (OMS), por el Dutch National Institute of Public Health (RIV*), de acuerdo con las instrucciones y especificaciones del ICSH, y que es remitida a todos los laboratorios que la soliciten (8).
Esta solución contiene entre 500 y 850 mg/dl de HiCN y la concentración exacta de cada lote viene siempre indicada en el envase ampular sellado al vacío. El estándar de HiCN posee un espectro de absorción característico, con un pico máximo de 540 nm y una inflexión de 504 nm (18).
Su valor correspondiente en gramos (g) de Hb/l (g/l) puede calcularse multiplicando la concentración de HiCN en mg/l indicado en la ampolla por el factor de dilución (F), y dividiendo por 1000: si la ampolla indica que la concentración de

* Rijks Institut Voor de Volksgezondheid, Portbus 1, Zilthoven, the Netherlands.

HiCN es de 602 mg/l, significa que corresponde a una concentración de Hb de $\frac{602 \times 251}{1000} = 151{,}10$ g/l (15,11 g/dl) si la sangre se diluye 251 veces, o a una concentración de 602 x 201 = 121 g/l (= 12,10 g/dl) si se diluye 201 veces.

El patrón HiCN de Referencia, cuya estabilidad es por lo menos de 2 años (17), puede ser empleado para las siguientes finalidades:

a) Hacer una curva de calibración

b) Calcular la concentración de Hb de una muestra de sangre total

c) Comprobar y verificar la fidelidad de los instrumentos de lectura

ch) Certificar la calidad de los patrones de HiCN producidos comercialmente o por instituciones de salud o de enseñanza.

Instrumentación

La medida de la A de las soluciones de HiCN puede realizarse mediante aparatos fotoeléctricos que permiten una lectura a 540 nm, pudiendo tratarse de hemoglobinómetros de lectura directa, fotocolorímetros (filtro verde-amarillo) o de espectrofotómetros.

Curva de Calibración

La gráfica patrón debe hacerse siempre que se utilice un fotómetro no calibrado previamente, y tiene como finalidad determinar la correlación entre los valores de A y los correspondientes de concentración de Hb, es decir, identifica linearidad. La curva se realiza preparando cinco soluciones estándares de HiCN de concentración decreciente a partir del patrón de referencia, el cual se diluye con el diluente de VKZ, de acuerdo con lo señalado en el Cuadro 1.

CUADRO 1

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES PATRON EN HiCN PARA ELABORAR LA CURVA DE CALIBRACION

Volúmenes reactivos	Gramos/dl de Hb				
	15,1	7,6	5,0	2,5	blanco
ml estándar (HiCN)*	3.0	1.5	1.0	0.5	–
ml diluente (VKZ)	–	1.5	2.0	2.5	3.0

* Ej,: Concentración de 60,2 mg/dl $\left(\frac{60{,}2 \times 251}{1000}\right) = 15{,}10$ g/dl (para la dilución usual de 1/251).

La concentración de Hb de cada estándar secundario se calcula de acuerdo al grado de dilución que ha sufrido el patrón primario concentrado. Se procede a obtener las A de cada dilución contra blanco (del diluente) o agua destilada, a

540nm, partiendo las lecturas de la cuarta cubeta, que es la de menor concentración. Finalmente la relación entre los valores de A y los correspondientes valores de Hb se representa gráficamente colocando en ordenadas los valores de A y en abscisas los de la Hb. Los diferentes puntos obtenidos deben quedar alineados entre sí y con el origen de las coordenadas. La linearidad es óptima hasta 24 g/dl (2). Debe destacarse que tanto la solución concentrada de referencia con sus diluciones en VKZ son sumamente estables (4,6,12,18,19), que deben leerse a temperatura ambiente y guardarse en frasquitos estériles de color ámbar. Por lo tanto, luego de demostrada la linearidad del método, basta luego con reiterar en la práctica diaria uno o dos valores de los patrones secundarios (por ejemplo, correspondientes a 10 y 15 g/dl de HiCN) a fin de gozar la seguridad de una buena lectura de las incógnitas, sin necesidad por lo tanto, de establecer periódicamente toda la curva de calibración. El consejo de efectuar esta última con cierta regularidad no tiene más que un fin comercial (16).

Determinación de la Concentración de Hb

Es obvio que la sangre venosa debe homogenizarse adecuadamente antes de tomarse las alícuotas de 20 ul que se añadirán a los 5 ml del diluente. Si tal operación se hace en forma manual, la homogenización se logrará por inversión repetida del tubo 30 veces como mínimo. Si se utiliza un mezclador mecánico (rodillos o disco giratorio), la mezcla se hará por unos cinco minutos. Debe tenerse perfectamente calibrado el sistema de pipeteo del VKZ así como el de las pipetas Sahli. Nunca se insistirá lo suficiente acerca de la pulcritud que exige la toma de la alícuota de sangre, la limpieza exterior de la pipeta Sahli antes de entregar la alícuota y el correcto lavado de la luz del capilar a fin de lograr, por aspiraciones y expulsiones repetidas, una correcta y exacta mezcla del diluente con el valor nominal de los 20 ul de sangre.

Finalmente, mezclar el tubo por inversión y luego del minuto tres proceder a su lectura. La hipertrigliceridemia *per se* no causa valores aberrantes en la medición de la Hb, pues los triglicéridos contenidos en las lipoproteínas de muy baja densidad no son responsables de los valores espurios de la hemoglobinometría. Por el contrario, es la concentración de quilomicrones la que provoca valores de Hb falsamente incrementados, siendo linear y proporcional el valor de los triglicéridos contenidos en los quilomicrones respecto de los valores falsos que se obtienen de la Hb (5).

Valenciano *et al.* (16) ya habían demostrado que niveles de 3,500 mg/dl de triglicéridos producen una interferencia positiva de la Hb de 3,0 g/dl. En lo referente al efecto de la bilirrubina, los mismos autores encontraron que 20 mg/dl de bilirrubina sérica producen una interferencia positiva de 0,4 a 0,8 g/dl de Hb

a) Cuantificación con base en la curva de calibración

El valor de Hb se obtiene directamente de la gráfica de calibración o a través de un factor de conversión (F.C.) derivado de ella. Esta última operación facilita el trabajo analítico. El factor se obtiene así: si la A del patrón secundario correspondiente a 10g/dl fue de 0.180 entonces el factor será $\frac{10}{0.180} = 55{,}55$, por lo que las A de las incógnitas, se multiplicarán directamente por ese factor para obtenerla Hb en g/dl (o por 555,5 para g/l, o éste por 0,0621 para reportársele en mmol/l. La conversión de Hb en g/dl a Hb en mmol/l requiere del factor 0,6205. La demostración de que la concentración de Hb es igual a la A x F.C. se logra aplicando la ecuación de la línea recta:

$$y = m x + b$$

y = D.O.$^{540\ nm}$ **x = Concentración en g/dl de Hb**

b = punto de origen de la recta **m = pendiente**

Tomando en consideración que el método HiCN cumple con la ley de Beer, podemos aplicar algunos conceptos analíticos para demostrar que el valor de la Hb de una muestra se puede obtener bajo criterios espectrofotométricos:

D.O.$^{540\ nm}$ muestra x F.C. = Concentración de Hb en g/dl

de donde F.C. se obtiene por:

$$\frac{\text{Concentración del patrón de Hb en g/dl}}{\text{D. O.}^{540\ nm}\ \text{del patrón}}$$

Ahora bien, b tiene un valor igual a cero debido a que la recta se inició en el origen de las coordinadas. m, tanto para el patrón como para la muestra, es igual ya que se utiliza la misma curva con determinada pendiente. Por lo tanto las ecuaciones de cada uno serían:

$$y_M = m x_M + b \qquad (a) \qquad\qquad y = m x_p + b \qquad (b)$$

de donde:

y_M = D.O.$^{540\ nm}$ muestra $\qquad$ y_p = D.O.$^{540\ nm}$ patrón

x_M = Concentración Hb en g/dl de la muestra $\qquad$ x_p = Concentración Hb en g/dl del patrón

m = pendiente

b = intersección

Entonces si $m_M = m_p$ y, si despejamos m en a y b tenemos:

$$m_M = \frac{y_M}{x_M} \qquad (c) \qquad\qquad m_p = \frac{y_p}{x_p} \qquad (d)$$

Relacionando c y d tenemos que: $m_M = m_p$, por lo que $\frac{y_M}{x_M} = \frac{y_p}{x_p}$

Despejando x_M obtenemos: $x_M = \frac{y_M x_p}{y_p}$ (e)

Sustituyendo en (e):

$$\frac{D.O.^{540\ nm}\ muestra}{D.O.^{540\ nm}\ patrón} \times \left(\begin{array}{c}\text{Concentración Hb en}\\ \text{g/dl del patrón}\end{array}\right) = \begin{array}{c}\text{Concentración Hb en}\\ \text{g/dl de la muestra}\end{array} \qquad (f)$$

Como x_p y y_p son constantes, podemos obtener el valor $\frac{x_p}{y_p}$ como factor siendo resumido (F) así: $\frac{x_p}{y_p}$ = factor de conversión; entonces:

$$\text{Concentración de Hb en g/dl} = D.O.^{540\ nm}\ \text{muestra} \times \text{Factor Conversión} \qquad (g)$$

La fórmula obtenida (g) se aplicará siempre y cuando no se posea un espectrofotómetro con cubeta cuadrada en donde el factor de conversión será 36,77. Cuando no es así, y se desea aplicar la misma (g), deberá poseerse un hemolizado control certificado (HEMO-CIHATA). Además, dicho factor varía de aparato a aparato, por lo que se deberá de obtener un factor para cada uno de ellos, así como para cuando se cambien reactivos o se modifique el funcionamiento de los fotómetros.

b) Cuantificación con base en la extinción milimolar de la HiCN

La concentración de Hb como HiCN se obtiene directamente y con exactitud a partir de su coeficiente de absorción milimolar, por medio de la ecuación (9):

$$Hb\ (g/dl) = \frac{A^{540}_{HiCN} \times 16.114.5 \times F}{11,0 \times 1 \times 10 \times 1000}$$

donde:

A^{540}_{HiCN} = Absorbancia de la solución de Hb a 540 nm.

16.114,5 = Masa molecular relativa de la Hb (derivada de $\frac{64458)}{4}$

F = Factor de dilución utilizado (por ejemplo, 1:251 20 ul de sangre en 5 ml de VKZ)

11,0 = (E^{540}_{HiCN}) coeficiente de extinción milimolar (derivado de $\frac{44,0)}{4}$

1 = Paso de luz en cm (cubeta cuadrada; exactitud de tres puntos decimales).

10 = Factor de conversión de 1 litro a 100 ml (dl).

1000 = Factor de conversión de mg a g.

Sustituyendo estos valores, se obtiene que:

$$Hb\ (g/dl) = A^{540}_{HiCN} \times 36{,}77$$

$$Hb\ (umol/l) = g/l \times 0{,}0621$$

Es claro que cuando se utiliza este procedimiento espectrofotométrico de medición de la Hb, la calidad de lectura del aparato debe comprobarse regularmente con base en la solución Patrón Internacional de HiCN o la del país. Dado que en nuestro país se hallan funcionando varios aparatos electrónicos tipo Coulter, parece prudente indicar algunos hechos relacionados con la medición de la Hb como HiCN en tales instrumentos. En comparación con el método manual, la hemoglobinometría semi-automatizada da generalmente mayor precisión. En los mismos términos de precisión se ha visto la existencia de un 2.5 por ciento de error en el método manual (13). Existe una diferencia sistemática entre ambos procedimientos, y los análisis de regresión muestran que la hemoglobinometría por Coulter generalmente da valores más bajos (13). Es importante señalar que el espectro de absorción de la HiCN que se obtiene con los reactivos de los Coulter difiere del que se logre con el de referencia, a tal grado, que no se alcanza un 100 por ciento de conversión a HiCN, porque probablemente exista una mezcla de derivados de la Hb de composición desconocida. De hecho la razón A^{540}/A^{540} es menor de la que se observa con una solución pura de HiCN, siendo esta disminución proporcional a la edad del reactivo lisante. Esta consideración, unida a los errores proporcionales y sistemáticos entre ambos métodos, obligan a aceptar que ellos dos estrictamente no se correlacionan (13), a pesar de la correspondencia clínica que ambos ofrecen.

DISEÑO EXPERIMENTAL
EN LA ELABORACION DE SOLUCIONES DE Hb Y DE HiCN

I Preparación del hemolizado control (HEMO-ClHATA)

En el CIHATA desde hace dos años venimos elaborando lotes de solución de Hb (8.5- 11.0 ± 0.2 g/dl) para ser usados como controles globales de la hemoglobinometría. Nuestro procedimiento de preparación es el siguiente:

a) Obtener estérilmente sangre normal, fresca y que sea HBsAg negativo
b) Dejar sedimentar por dos horas. Eliminar todo el plasma sobrenadante, plaquetas y leucocitos.
c) Lavar las células 3 veces con solución salina estéril al 0.85 por ciento y luego dos veces más con salina estéril al 1.2 por ciento.
ch) A cada volumen de células empacadas añadir un volumen de solución hipotónica estéril de EDTA-KCN (EDTA 0.25 g; KCN 0,652 g; agua destilada hasta 100 ml).
d) Obtener hemolizado por inversión de los tubos o con la ayuda de un mezclador mecánico (aprox. 10 minutos). El proceso da más rendimiento si la mezcla se guarda en la refrigeradora toda la noche. Añadir medio volumen de tetracloruro de carbono por cada volumen de la solución. Mezclar bien por agitación vigorosa. Centrifugar o filtrar estérilmente la solución hemolizada. Obtener el sobrenadante en un balón estéril.

e) Comprobar por triplicado el valor de la Hb en g/dl (A^{540}_{HiCN} x 36,77) y ajustarlo al valor deseado con la solución hipotónica EDTA-KCN (8.5 - 11.0 g/dl). Filtrar por Sietz o Millipore, envasando estérilmente alícuotas de 2 ml en viales marrones estériles. El control así preparado es estable al menos por 6 meses a 4°C.

f) La solución se puede liofilizar con sacarosa (100 g/l). La reconstitución de su contenido le da una estabilidad no menor de 3 meses a 4°C.

Uso rutinario del control:

A efecto de no introducir periódicamente la pipeta Sahli en el vial que contiene la solución, se aconseja que todos los días se trasvase 0.1 ml a un tubo pequeño y que de éste se tomen los 20 ul. En hemolizados a base de oxihemoglobina que no han sufrido el proceso de esterilización, se ha reportado (comunicación personal, Dra. A. A. Porras), ya que a los 5 días de preparados, el crecimiento de Escherichia coli, Klebsiella sp, Staphylococcus aureus y Pseudomonas sp. Estudios experimentales de Holts (7) demostraron que varios microorganismos, especialmente gram negativos (Alcaligenes faecalis, Paracolobactrum aerogenoides, Pseudomonas aeruginosa, y otros), crecen en el diluente de Drabkin. Nuestro hemolizado (HEMO-CIHATA) tiene la ventaja de ser relativamente estable gracias al efecto protector del KCN que impide la formación de Hi inestable y en cierto grado el crecimiento bacteriano. Por otra parte, el EDTA por su efecto quelante protege a la solución de Hb del efecto deletereo de iones inorgánicos. La adición de azida de sodio (0.1 g/dl) da mayor protección al control, sin que se modifique el espectro lumínico de la HiCN.

II Preparación de la solución estándar de Cianometahemoglobina (HiCN) (CIANO-CIHATA)

A partir del valor exacto de la Hb del hemolizado control se hará la preparación del patrón concentrado de HiCN con el diluente de VKZ. Por ejemplo, si el hemolizado es de 10 g/dl de Hb, para obtener el valor de 80 mg/dl de HiCN, tomar 0.80 ml de aquel y llevar a 100 ml con VKZ en balón aforado, comprobar el valor por triplicado con base en el factor para HiCN de 36,77. Posteriormente, se filtrará la solución por Seitz o Millipore, envasándose en viales estériles y marrones, en alícuotas de 10ml. El límite analítico de tolerancia de este patrón concentrado es de 1 mg/dl, y equivale a 20 g/dl de HiCN si la sangre de incógnitos se diluye de la forma usual, es decir,1:251. Debe mantenerse en viales estériles de color ámbar, bajo refrigeración. La lectura debe efectuarse a la temperatura ambiente.

Como se ha indicado este patrón es muy estable como también lo son los patrones secundarios. La pureza y calidad analítica de las soluciones estándares las hemos evaluado por los siguientes cuatro procedimientos:

a) Graficando el espectro de absorción de la HiCN entre 450 y 750 nm (9)

b) Comprobando su concentración contra el Estándar Internacional de Referencia (19).

c) Determinado el cociente $\frac{A^{540}_{HiCN}}{A^{504}_{HiCN}}$ (apertura de banda de 0.13 nm), el cual

debe encontrarse entre 1,58 y 1,63 (9), a fin de establecer con seguridad de que ha habido una conversión óptima de la Hb a HiCN.

ch) Midiendo en el ámbito infrarrojo (750 nm, con una apertura de banda de 0.5 nm) su A, la cual debe ser menor de 0,002 por cm de paso de luz (9). La absorbancia a 750 nm indica turbidez, toda vez que los derivados de la Hb no absorben luz a esa longitud de onda.
Una divergencia significativa de ese rango indicará errores en la hemoglobinometría, debido ya sea a otros derivados del heme (si la conversión de la HiCN es incompleta) o a compuestos no heme (1).

Estos cuatro parámetros son válidos también para la evaluación de los hemolizados control y para cualquier reacción como HiCN (por ejemplo las incógnitas de rutina). Al menos para la solución control, son pasos obligantes antes de certificar su bondad. Además de lo señalado para el estándar en cuanto a sus múltiples finalidades en la hemoglobinometría, es necesario recalcar que el control permite evaluar diariamente el procedimiento como en todo y es en eL que se apoya el control diario de calidad.

Esterilidad del estándar y del control
La esterilidad de las soluciones se ha encontrado a los 5, 10 y 15 días de elaboradas, haciendo uso de los procedimientos usuales en bacteriología. Hemos podido comprobar que el uso de preservantes es permisible en tanto no modifiquen las propiedades ópticas de la HiCN o su estabilidad. La azida de sodio (0.1g/dl) es el que mejor cumple con ese requerimiento (HiN_3).
La estabilidad se controla reexaminando cada tres meses los criterios arriba mencionados (a-c), sobre muestras de un lote de producción determinado que se ha mantenido a 4°C. Los usuarios de estos patrones deben ser informados de cualquier caída del coloro de la A que exceda el 2 por ciento, si dicho accidente ocurre antes de la fecha de expiración. Ha sido muy aceptable la estabilidad de la solución acuosa de CIANO-CIHATA, en diferentes lotes que se han producido, ya que a los 6 meses de producida, envialzada y mantenida a 4°C, la A no disminuyó más allá del 1 por ciento.

Control de Calidad de la hemoglobinometría
Este control se realiza mediante el uso del hemolizado control (HEMO-CIHATA) de concentración conocida, el cual se introduce en el sistema a semejanza de una muestra. Dicho control será medido diariamente y su valor será anotado en un gráfico de control de calidad con el propósito de dar seguimiento al procedimiento, al personal y a los aparatos.
La variación del valor medio del control fuera de las 2 D.E., tomando en cuenta los conceptos básicos sobre el control de calidad bien conocidos, implica una revisión de todos los pasos involucrados en la determinación de HiCN. De igual forma, este hemolizado puede utilizarse para controlar el reactivo de VKZ preparado en el laboratorio aplicando los criterios analíticos mencionados en relación al espectro y a la relación A^{540} / A^{504}.

Corolario
En la hemoglobinometría que se efectúa en nuestros laboratorios concurren una serie de errores sistemáticos que invalidan en cierta med4a los resultados obtenidos. Dentro de ellos debemos destacar los siguientes (16):

a) De muestras; al manipularse inadecuadamente, ya que no se homogenizan como es debido.

b) De dilución, pues en forma irrestricta se utiliza toda suerte de pipetas de Sahli, no calibradas o falsamente calibradas, así como de diluidores semiautomáticos incorrectamente ajustados, o pipeteo no estandarizado cuando se hace en forma manual.
c) Calidad del reactivo hemolizante, pues algunos dan lectura apreciable del blanco y el margen de pH es tan variable como desde 7 a 8,9. Asimismo, en ocasiones dicho reactivo se utiliza frío, lo cual provoca que la absorbencia difiera de la obtenida en las condiciones estándar de temperatura ambiente. Por otra parte, se ha podido constatar el uso de toda suerte de diluentes en los laboratorios, desde los producidos en los mismos hasta de dos o más casas comerciales, con lecturas de la reacción final de color sumamente variables, sin que se haya establecido apropiadamente el tiempo de desarrollo óptimo de HiCN. Como la mayoría de los laboratorios utilizan todavía el diluente de Drabkin, parece importante señalar que la estabilidad de ese reactivo es de un mes en refrigeración.
d) De fotometría, debidas al estado electrónico del instrumento, a la frecuencia con que se calibra, a lecturas erróneas y/o errores de calibración y a las interpolaciones que se hagan.
e) Calificación del personal de laboratorio, el cual es un aspecto obvio por lo que no es necesario ahondar en el asunto.

Finalmente, si se toma en cuenta los diferentes factores que pueden ocasionar problemas para obtener una buena medición de la Hb, solo bastaría señalar lo siguiente: con la ayuda de las soluciones estándares o de referencia de HiCN para calibrar el fotómetro (CIANO-CIHATA) y el uso de soluciones concentradas de Hb para controlar el método como un todo (HEMO-CIHATA), será posible para cualquier laboratorio estar seguro de que obtiene resultados válidos en hemoglobinometría. En cuanto al uso del estándar de referencia debe aceptarse que el patrón certificado se encuentra dentro de ±2 por ciento del valor nominal (3), y que la mayor conformidad o acuerdo posible de la hemoglobinometría entre los laboratorios que se han acogido a un programa de estandarización como el que se preconiza sería de ±0,4 a 0,6 g/dl de Hb (1,14,15,18). Para llevar a cabo un control de calidad intralaboratorio, no basta el uso de la solución control, en vista de que ésta no ofrece la posibilidad de diferenciar entre errores de un valor obtenido y los de dilución, y los provocados en los pasos del método que llevan a la conversión de la HiCN. El estándar de referencia para estos fines de control de calidad permanece necesario para excluir errores en la fase de medición.

ABSTRACT

This paper presents a review on the main characteristics of the cyanomethemoglobin method for measurement of blood hemoglobin concentration. The importance of the use of Van Kampen and Zijlstra reagent is emphasized, as is the applicability of standar solutions for calibration of photometers. The preparation and standarization of the Costa Rican concentrated stardard (CIANO-CIHATA) and control hemolizate (HEMO-CIHATA) are specified in great detail. A practical quality control program is proposed and a review of the sistematic errors in hemoglobinometry are presented.

BIBLIOGRAFIA

1. Beal, P.J.; Cook, L.P., Lovric, V.A.: Drabkin's solution: A common source of error in haemoglobinometry. *Path*.1964; 6:251-254.

2. Bermes, E.W. Forman, D.T. Basic Laboratory principles and procedures, IN: Tietz, N.W. (Edit.) *Fundamentals of Clinical Chemistry* 2nd. Ed., W.B. Saunders Co., Pha. 1976; 1-59.

3. Cannan, R.K. Proposal for adoption of an international method and standard solution for hemoglobinometry, specification for preparations of the standard solution, and notification of availability of a reference standard solution. *Am. J. Clin. Path.* 1965; 44:207-211.

4. Eilers, R.J. Notification of final adoption of an international method and standard solution for hemoglobinometry specifications for preparation of standard solution. *Am. J. Clin. Pathol.* 1967; 47: 212-214.

5. Gagné, C., Auger, P.L., Moorjani, S., Brun, D. Lupien, P.J. Effect of Hyperchylomicronemia on the Measurement of Hemoglobin. *Am. J. Clin. Pathol.* 1977; 88:584-586.

6. Gambino, S.R.: Cyanmethemoglobin standards (Letters to the editor). *Am. J. Clin. Path.* 1965; 44:221-222.

7. Holtz, A.H.: Some experience with a cyanhaemoglobin solution . *Bibl. Haematol.* (Basel) 1965; 21:75-79.

8. International Committee for Standardization in Hematology: Announcement of Availability of International Hemoglobincyanide Reference Standard . *Br. J. Haematol.* 1972; 23:123-126.

9. lnternational Committee for Standardization in Haematology. Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH Standard EP 6/2: 1977) and specifications for international haemoglobincyanide reference preparation (ICSH Standard EP 6/3: 1977). *J. Clin. Pathol.* 1978; 31:139-143.

10. International Committe for Standardization in Hematology: Recommendations for haemoglobinometry in human blood . *Br. J. Haemat.* 1967; 13 (suppl 71): 71-75.

11. Munkley, R.M. Stuart, J. Rapid cyanmethaemoglobin estimation (Letters to the editor). *J. Clin. Path.* 1970; 23:190-191.

12. Rice, E.W.: Comments on "Status for clinical hemoglobinometry in the United States'' (Letters to the editor). *Am. J. Clin. Path.* 1965; 44:213-214.

13. Salvati, A.M., Samoggia, P., Taggi, F. Tentori, L. Hemoglobinometry: a comparison between the hemiglobincyanide method and the Coulter S. Counter. *Clin. Chim. Acta* 1977; 77:13-20.

14. Skendzel, L.P., Copeland, B.E.: Hemoglobin measurements in hospital laboratories. A report of 1962, 1963, and 1964 surveys conducted by standar Committee College of American Pathologist. *Am. J. Clin. Path.* 1965; 44:345-349.

15. Sunderman, F.W.: Letters to the editor. *Am. J. Clin. Path.* 1965; 44:212-215.

16. Valenciano, E., Schosinsky, K. Sáenz, G.F. Estudio Crítico y experimental de la Hemoglobinometria. *Sangre* 1979; 24:1133-1141.

17. Van Assendelft, Q.W., Buursma, A., Holtz, A.H., Van Kampen, E.J. Zijistra, W.G. Quality control in Haemoglobinometry with special reference to the stability of haemiglobincyanide reference solutions. *Clin. Chim. Acta* 1976; 70:161-169.

18. Van Kampen E.J., Zijlstra, W.G. Standardization of hemoglobinometry. II. The homoglobincyanide method. *Clin. Chim. Acta* 1961; 6:538-544.

19. Vives Corrons, J.L., Jou, J.M. Aguilar, J.L. Método recomendado por el I.C.S.H. para la determinación de la concentración de hemoglobina en sangre. *Sangre* 1981; 26:1172-1178.

20. World-Health Organization, International biological standars and International biological reference preparations, 1968. *WHO Tech Rep Ser* 1968; 384:85-88.