

SOLUCIONES PATRON Y CONTROL PARA LA MEDICION DE LA HEMOGLOBINA COMO OXIHEMOGLOBINA

Eugenia Ma. Quintana*, Mario Chaves* y German F. Sáenz*.

RESUMEN

Se señala, por primera vez, la preparación de patrones y controles para la determinación de Hb como HbO₂, denominándoseles OXI-CIHATA y OXI-TROL, respectivamente. Se evaluó su estabilidad semana a semana y por un período de 6 meses. Se estudió dos hemolizados control, uno con timerosal al 0.01 por ciento y otro con etanediol al 33 por ciento v/v y 4 soluciones patrón: timerosal-EDTA. 4 Na, timerosal-NH₄OH, etanediol-EDTA. 4 Na, y etanediol-NH₄OH. Después de evaluar la precisión, exactitud y estabilidad, se recomienda emplear como solución control y patrón un hemolizado de HbO₂ cuyo preservante sea timerosal al 0.01 por ciento empleándose como solución diluyente la sal tetrasódica de EDTA al 0.3 por ciento, tanto para la preparación de esas soluciones como para la Hemoglobinometría. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1987; 8(3):149-158].

INTRODUCCION

En 1961 Van kampen y Zijlstra (14) proponen un procedimiento para la estandarización de la hemoglobina (Hb), basado en su determinación como cianometa hemoglobina (HiCN), pero no fue sino hasta con la proposición de Cannan (2) en 1965, para el uso de una solución de referencia para HiCN, que se cuenta con un método exacto y preciso. Finalmente, en 1967 el Comité Internacional de Estandarización de Hematología (-ICSH-) (6) recomienda el método de la HiCN y el uso de aquella solución concentrada de HiCN como patrón, ratificándose dicho acuerdo en varias publicaciones (7,8). A pesar de ser un método recomendado por el ICSH, se le han esgrimido algunas críticas, entre las que se mencionan un relativo alto costo, una toxicidad potencial del reactivo utilizado, y el que mida hemoglobina total y no exclusivamente la oxihemoglobina (HbO₂). Sin demérito de la bondad

reconocida internacionalmente al método de la HiCN, se puede considerar que la determinación de la Hb como HbO₂ sería un procedimiento alternativo de la HiCN y, tal vez electivo, al menos con el fin de obtenerse resultados compatibles con la Hb fisiológicamente activa (9). En nuestro medio, la experiencia ha sido muy beneficiosa (11,13). Por lo tanto, el presente artículo en nada contradice lo universalmente aceptado y lo investigado en torno a la HiCN, sino que intenta ofrecer la factibilidad de contar con una alternativa para la Hemoglobinometría a base de HbO₂ alcalina, con las ventajas que ofrece su bajo costo y la inocuidad de los reactivos y, señalar, por primera vez, la preparación de patrones (OXI-CIHATA) y controles (OXITROL) para su normalización y determinación.

MATERIALES Y METODOS

En experimentaciones previas a la presente, se ensayó diversos preservantes y diluentes para estudiar la estabilidad de varias soluciones de HbO₂. Se probaron soluciones a diferentes concentraciones de KCN, timerosal, EDTA, cloruro de benzalconio y etanediol (10), tanto en forma individual como en diferentes combinaciones, con y sin sacarosa (1). Finalmente, por los resultados obtenidos, se descartó las soluciones a base de KCN, de benzalconio y el empleo de sacarosa. Para la nueva experimentación se detalla lo efectuado: se preparó un hemolizado concentrado de HbO₂ según Singer (12) a partir de sangre total normal fresca de la siguiente manera:

1. Centrifugar la sangre y eliminar el plasma.
2. Lavar los glóbulos rojos empacados 3 veces con solución salina al 0.85%.
3. Agregar a cada volumen de glóbulos rojos medio volumen de agua destilada.
4. Agitar los tubos y agregar medio volumen de tetracloruro de carbono, mezclando por agitación vigorosa.
5. Centrifugar y obtener el sobrenadante, el cual contendrá una concentración de Hb de unos 18 g/dl.

A partir de esta solución concentrada de HbO₂

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

se prepararon dos hemolizados con una concentración aproximada de ± 12 g/dl, agregando en uno timerosal al 0.01 por ciento y en otro etanediol al 33 por ciento v/v, convirtiéndose éstos en los hemolizados control para el estudio. Asimismo, y partiendo siempre de la solución concentrada de HbO₂, se prepararon 4 soluciones patrón de aproximadamente ± 80.0 mg/dl de Hb de la siguiente manera:

Hemolizado concentrado más timerosal al 0.01 por ciento y EDTA. 4 Na al 0.3 por ciento (pH 10.7).

Hemolizado concentrado más timerosal al 0.01 por ciento y NH₄OH al 0.04 por ciento v/v (pH 10.6)

Hemolizado concentrado más etanediol al 33 por ciento v/v y EDTA. 4 Na al 0.3 por ciento (pH 10.7)

Hemolizado concentrado más etanediol al 33 por ciento v/v y NH₄OH al 0.04 por ciento v/v (pH 10.6)

La concentración de la Hb como HbO₂, tanto de las soluciones patrón como de los hemolizados control, se estandarizó frente al método de la HiCN, el cual se normalizó previamente de acuerdo con el estándar internacional del ICSH (Rijks Instituut Voor de Volksgezondheid, Portbus, Zilthoven, The Netherlands). Se obtuvieron los espectros de absorción de cada una de las soluciones así preparadas (ver figura 1) y también se elaboraron las curvas de calibración para cada solución patrón con su respectivo diluyente (ver figura 2). Por un período de 6 meses y a intervalos semanales, se procedió a realizar lecturas de Hb de las diferentes soluciones, obteniéndose el valor correspondiente de la HiCN y de la HbO₂ de la respectiva curva de calibración. Esta experiencia se llevó a cabo manteniendo alícuotas de las diferentes soluciones tanto a 4°C (refrigeración), como entre 21 -24°C (temperatura ambiente).

Para evaluar exactitud se utilizó el modelo de correlación y la prueba de "t de Student", así como el análisis de variancia (ANDEVA). Para la evaluación de la precisión se utilizaron los coeficientes de variación.

Sinopsis del método preconizado para HbO₂

A 50 ml de la solución diluyente (Edta. 4 Na 0.3%; pH 10.7-10.9) se agrega, con pipeta calibrada tipo Sahli, 20 μ l de sangre previamente oxigenada por inversión repetida, se mezcla bien por agitación y se deja reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Se mide la absorción de la HbO₂ alcalina frente a un blanco del diluyente a

540nm, obteniéndose el valor de HbO₂ de la curva de calibración normalizada de acuerdo con el patrón de OXI-CIHATA. Por otra parte la técnica puede estandarizarse frente a la de la HiCN, usándose para tal fin el estándar internacional del ICSH o el del CIHATA (CIANO-CIHATA) (11). Cuando existe una gran lipemia se puede obtener con el método de la HbO₂ un error positivo del orden de los 3 g/dl de Hb (3). Los estudios de estabilidad del color final de la reacción indican que las muestras son estables durante un mínimo de 16 horas a temperatura ambiente.

RESULTADOS

Después de evaluar la estabilidad de los hemolizados control y de las soluciones patrón, semana a semana y por un período de 6 meses, destacamos, en primera instancia, que es necesario estabilizar las soluciones patrón por un período no menor de 2 semanas cuando se utiliza como solución diluyente el hidróxido de amonio. Distinto ocurre cuando se emplea como solución diluyente el EDTA. 4 Na, en cuyo caso se obtiene estabilidad en las lecturas desde el primer momento de su preparación. En la Figura 1 se observan los espectros de absorción de cada uno de los hemolizados estudiados con sus respectivos diluyentes, de donde se infiere claramente que es HbO₂ lo que se encuentra presente en aquellas.

En la Figura 2 se observan las respectivas curvas de calibración correspondientes a cada una de las soluciones patrón estudiadas, notándose que todas ellas cumplen a cabalidad con la Ley de Beer, presentando linealidad y partiendo por el origen de las abscisas, existiendo, como única divergencia entre las distintas curvas, pequeñas diferencias en el valor de la pendiente de cada curva.

Los resultados obtenidos en torno a las experiencias de estabilidad de diferentes soluciones tanto a 4°C como a temperatura ambiente, permite señalar que la temperatura ideal de almacenamiento, tanto para los hemolizados control como para los patrones, es la de 4°C y por no menos de 6 meses, en tanto que los hemolizados a temperatura ambiente son estables menos de dos semanas, y los patrones ni siquiera una semana. Para lograr determinar si existía diferencia estadísticamente significativa entre los hemolizados y los patrones mantenidos a 4°C y evaluar asimismo la estabilidad, observamos de las tablas de ANDEVA (Cuadros 1 y 2) que efectivamente existen diferencias, a la fecha de

FIGURA 1
ESPECTROS DE ABSORCION DE HbO₂

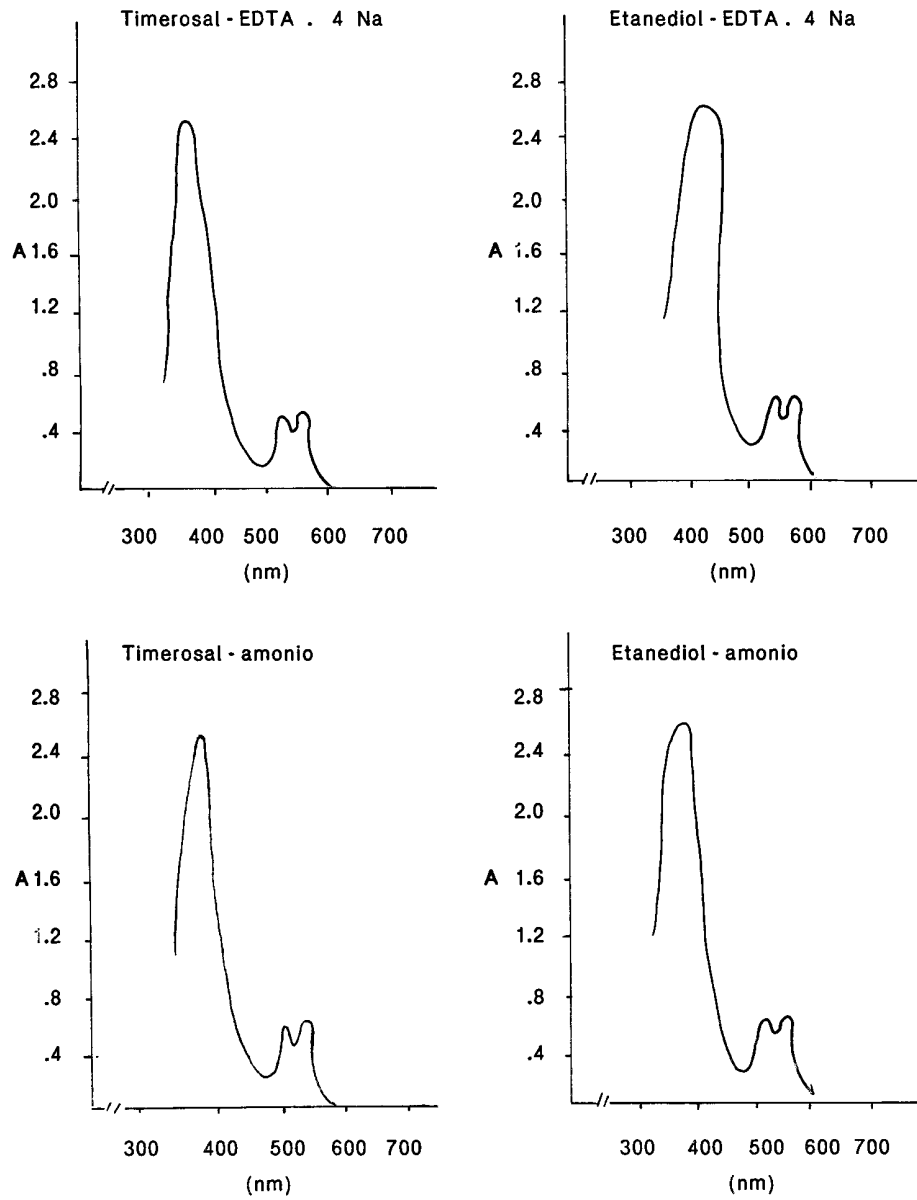
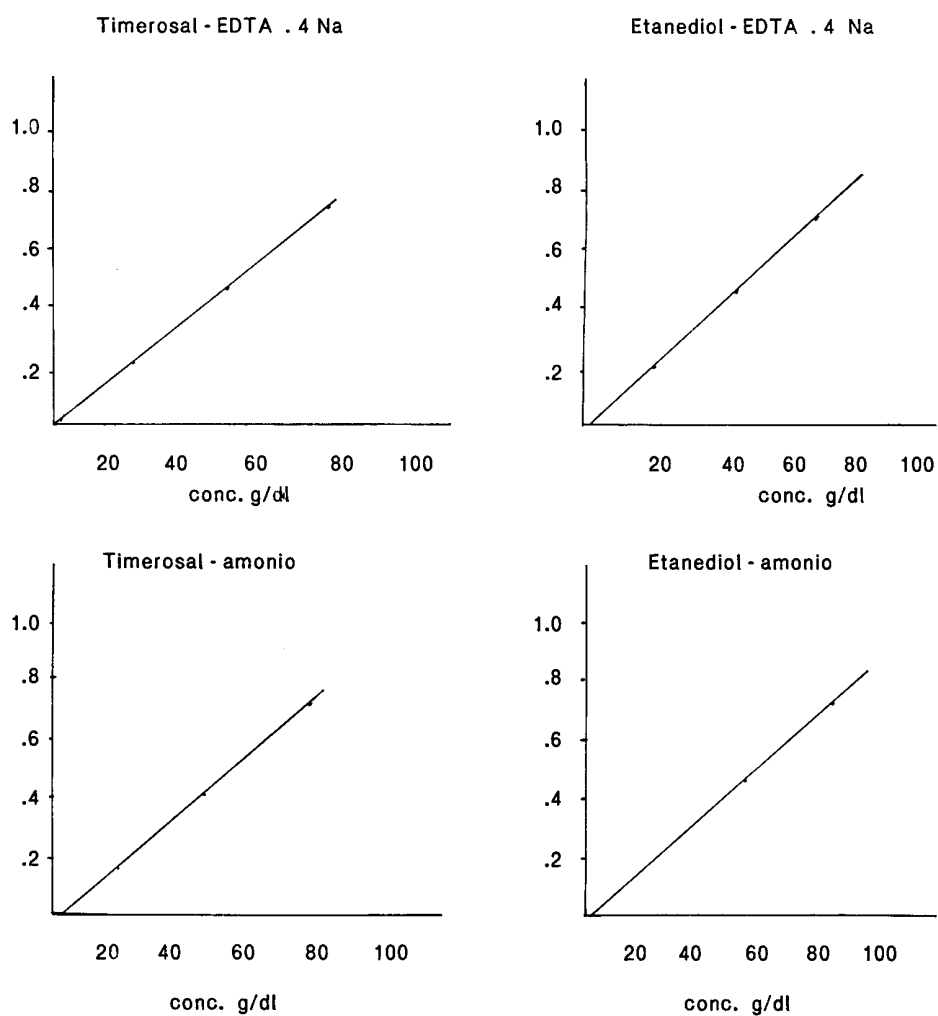


FIGURA 2

CURVAS DE CALIBRACION PARA HbO₂



la última lectura, tanto en los hemolizados como en los patrones, dado que el tiempo de estabilidad de cada uno de ellos fue el siguiente:

Hemolizado de timerosal-amonio y etanediolamonio= 21 semanas

Hemolizado de etanediol-EDTA=22 semanas

Hemolizado de timerosal-EDTA—más de 23 semanas.

Patrón de timerosal-amonio y etanediol -amonio =16 semanas.

Patrón de etanediol-amonio= 3 semanas

Patrón de timerosal-EDTA=23 semanas

En cuanto a la precisión de cada solución control y patrón, los Cuadros 3,4 y 5 muestran lo obtenido en este respecto. Los hemolizados que presentaron mejor precisión en un sólo día fueron los de etanediol-EDTA y el de timerosal-EDTA. En cuanto a la precisión semana a semana se observa que se obtuvo el mejor coeficiente de variación con el hemolizado de etanediol-hidró-

xido de amonio. Las soluciones patrón presentaron coeficientes de variación muy disímiles entre sí, presentándose la mejor precisión con el patrón de timerosal-EDTA, y la peor en el patrón de etanediol-hidróxido de amonio. Para lograr determinar la exactitud de los hemolizados y patrones se hizo uso del análisis de correlación y de la prueba de "t de Student", obteniéndose una buena exactitud excepto con el hemolizado de etanediol-hidróxido de amonio (Cuadro 6). Con respecto a la exactitud de los patrones (Cuadro 7), se ve igualmente que con la excepción del patrón de etanediol-amonio, todos presentaron buena exactitud, siendo las diferencias encontradas debidas al azar. Con el fin de comparar el método de HbO_2 que se propone con el de referencia (HiCN), se destaca en el Cuadro 8 los valores obtenidos de Hb con esos métodos, para niveles bajos, normales y altos.

CUADRO 1

TABLA DE ANDEVA DE LOS HEMOLIZADOS DE HbO_2

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón de las variancias
Entre grupos	49,8	3	16,6	
Dentro grupos	13,64	67	0,20	83,0
Total	63,4	70		
p<0.05				

CUADRO 2**TABLA DE ANDEVA DE LOS
PATRONES DE HbO₂**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón de las variancias
Entre grupos	2.211,9	3	737,3	
Dentro grupos	571,18	68	8,4	87,8
Total	2.783,1	71		

p<0.05

153

CUADRO 3**PRECISION DE LOS HEMOLIZADOS DE HbO₂ EN UN SOLO DIA**

Hemolizado	n	$\bar{X}$ (g/dl)	S.D.	C.V. (%)
Timerosal-EDTA	20	11,4	0,19	1,7
Etanediol-EDTA	20	11,4	0,14	1,2
Timerosal-amonio	20	13,3	0,35	2,6
Etanediol-amonio	20	11,3	0,27	2,4

154

CUADRO 4**PRECISION DE LOS HEMOLIZADOS DE HbO₂ SEMANA A SEMANA**

Hemolizado	n	$\bar{X}$ (g/dl)	S.D.	C.V. (%)
Timerosal-EDTA	21	12,3	0,52	2,5
Etanediol-EDTA	20	12,1	0,28	2,3
Timerosal-amonio	15	14,3	0,40	2,7
Etanediol-amonio	16	12,2	0,31	1,9

CUADRO 5**PRECISION DE LOS PATRONES DE HbO₂ EN UN SOLO DIA**

Patrón	n	$\bar{X}$ (g/dl)	S.D.	C.V. (%)
Timerosal-EDTA	19	84,9	0,7	0,8
Etanediol-EDTA	19	83,1	1,0	1,2
Timerosal-amonio	17	91,3	1,4	1,6
Etanediol-amonio	17	75,3	5,6	7,5

CUADRO 6**EXACTITUD DE LOS HEMOLIZADOS DE HbO₂ MEDIANTE ANALISIS DE CORRELACION**

Hemolizado	n	X (g/dl)	δ	p^*
Timerosal-EDTA	17	12,4	0,52	> 0,05
Etanediol-EDTA	16	12,1	0,58	> 0,05
Timerosal-amonio	15	13,3	0,99	> 0,05
Etanediol-amonio	14	12,2	0,39	< 0,05

P^* = Prueba de "t de Student"

CUADRO 7**EXACTITUD DE LOS PATRONES DE HbO₂ MEDIANTE ANALISIS DE CORRELACION**

Patrón	n	$\bar{X}$ (g/dl)	δ	p^*
Timerosal-EDTA	10	14,2	0,94	> 0,05
Etanediol-amonio	10	14,0	0,94	> 0,05
Timerosal-amonio	10	16,8	0,94	> 0,05
Etanediol-amonio	10	14,4	2,6	< 0,05

P^* = Prueba de "t de Student"

CUADRO 8

COMPARACION DE VALORES DE Hb OBTENIDOS POR HbO₂ Y HiCN

Niveles de Hb	n	HbO ₂ (g/dl)			HiCN (g/dl)		
		$\bar{X}$	S.D	C.V (%)	$\bar{X}$	S.D.	C.V. (%)
Bajos	23	7,90	0,10	1,30	7,70	0,14	1,80
Normales	23	15,20	0,30	2,30	14,80	0,28	1,90
Altos	23	20,60	0,34	1,60	20,30	0,27	1,30

DISCUSION

En 1954 Ellerbrook y Davis (4) reportan que las trazas de cobre presentes en el agua destilada causan empaldecimiento de la densidad óptica cuando se determina fotométricamente la oxihemoglobina utilizando soluciones de hidróxido de amonio o de carbonato de sodio. Posteriormente en 1955 Collier (3) demuestra el efecto deletéreo de los iones cúpricos en las soluciones de HbO₂, motivo por el cual introdujo la sal tetrasódica de EDTA para bloquear este efecto indeseable. Corregido este problema, no se indica en la literatura; sin embargo, la existencia de soluciones patrón y control para éstos métodos a base de HbO₂. Bueno es destacar que aún antes de que se aceptara universalmente el método de la HiCN, ya autores como Henry (5) preconizaban el procedimiento de Collier (3) para HbO₂, destacándose su bondad analítica a través de los parámetros de especificidad, sensibilidad, exactitud y precisión, adoleciendo eso sí, de nuevo la cita del Dr. Henry, de la ausencia de soluciones normalizadoras de HbO₂, teniéndose que estandarizar indirectamente el método con base en el método de la HiCN, es decir con el uso de patrones secundarios valorizándose de acuerdo a su contenido en HiCN.

Después de evaluar la precisión, la exactitud y la estabilidad de los diferentes hemolizados control estudiados como también de las diferentes soluciones patrón, se puede concluir que son el hemolizado y el patrón de timerosal en EDTA lo más apropiados para el propósito. Por tanto se recomienda emplear, para la determinación

de Hb como HbO₂ alcalina, como solución control y patrón respectivamente, un hemolizado de HbO₂ cuyo preservante sea timerosal al 0.01 por ciento, empleándose como solución diluyente la sal tetrasódica de EDTA al 0.3 por ciento. Con esta modesta contribución pretendemos preconizar un método alternativo para la hemoglobinometría sentando las bases -por primera vez- de una buena normalización del método para la cuantificación de la Hb como HbO₂, gracias al uso de soluciones patrón (OXI-CIHATA) y control (OXI-TROL) para los efectos.

ABSTRACT

For the first time, standard and control material for the determination of Hb as HbO₂ was prepared. Its stability was evaluated every week, during six months. Two control hemolyzates were studied: one with thymersal 0.01 percent and the other with ethanediol 33 percent v/v, as well as four different standard solutions: thymersal-EDTA .4 Na, thymersal-NH₄OH, ethanediol-EDTA .4 Na and ethanediol-NH₄OH. After evaluating precision, accuracy and stability, we recommend the use of an HbO₂ hemolyzate with thymersal 0.01 percent as control and standard solutions, using as dilutant EDTA tetrasodium 0.3 percent for the preparation of these solutions and for hemoglobinometry.

BIBLIOGRAFIA

1. Bonderman, D., Prosksch, G. & Haskins, S.A Lyophilized Hemoglobin Control Prepared from Stroma-Free Hemolyates. *Clin. Chem.* 1985; 26: 305-308.
2. Cannan, R. 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.
3. Collier, H.B. Use of sequestering agent in determination of oxihemoglobin. *Am. J. Clin. Path.* 1955; 25:221-222
4. Ellerbrook, L. & Davis, J. Effect of traces of copper on hemoglobin determination. *Am. J. Clin. Path* 1954; 24: 607-611.
5. Henry, R.J. *Química Clínica. Principios y Técnicas.* Tomo II. 1era. Ed., Editorial Jims, Barcelona 1969, 901-903
6. International Committee for Standardization in Hematology: Recommendations for haemoglobinometry in human blood. *Br. J. Haemat.* 1967; 13: 71-75.
7. International Committee for Standardization in Hematology: Announcement of Availability of International Hemoglobincyanide Reference Standard. *Br. J. Haematol.* 1972; 23: 123-126.
8. International Committee for Standardization in Haematology: Recommendations for Reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH Standard EP 6/2: 1977). *J. Clin. Pathol.* 1978; 31:139-143.
9. MacFate, R. Measurement of Hemoglobin in Blood. In: *Hemoglobin. Its precursors and Metabolites* s.ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 1964; 31-35.
10. Rideout, J. Y Louderback, A. Carboxihaemoglobin: a possible reference material for haemoglobin assay. *J. Clin. Path.* 1982; 35:292-295.
11. Sáenz, G.F., Chaves, M., Valenciano, E., Montero, A.G. y Jiménez, J. Hemoglobinometría. Normalización de la metodología. Preparación nacional del estándar de calibración y del hemolizado control. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1984; 5:83-96.
12. Singer, K., Chernoff, A. y Singer, L. Studies on abnormal hemoglobins. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. *Blood* 1951; 6:413-428.
13. Valenciano, E., Schosinsky, K. y Sáenz, G.F. Estudio crítico y experimental de la Hemoglobinometría. *Sangre* 1979; 24: 1133-1141.
14. Van Kampen, E. y Sijlstra, W. Standardization of hemoglobinometry. II. The hemoglobincyanide method. *Clin. Chim. Acta* 1961; 6:538-544.