

Microfotómetro para la determinación de hemoglobina en sangre

José E. Picans Susacasa, Sonia M. López Silva, Elena M. Otazo Sánchez, Gladys Hernández Solana, Lissette Rivera Naranjo, Guillermo Santana Rodríguez, Juan Fuentes Betancourt, Elena Vigil Santos, Abelardo F. Lugrís García, IMRE - Facultad de Física - Facultad de Biología, Universidad de La Habana

RESUMEN

Han sido desarrollado un microfotómetro denominado "MF-1" y accesorios para la determinación de concentración de hemoglobina en sangre total por el método de la cianometahemoglobina. El MF-1 fue comparado con el LKB-4049 mediante la medición de muestras de pacientes simultáneamente con ambos equipos. El análisis de los datos obtenidos no mostró diferencias significativas entre ellos.

ABSTRACT

A microphotometer, "MF-1", and accessories for the determination of haemoglobin concentration in total blood by the haemoglobin cyanide method have been developed. The MF-1 was compared to the LKB-4049 by running patients samples simultaneously on both instruments. The analysis of data obtained showed no significant differences between them.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la química clínica y de la microelectrónica ha permitido diseñar sistemas sencillos, portátiles y relativamente económicos para la determinación de diversos componentes en el laboratorio clínico. Entre estos componentes, ocupa un lugar importante la concentración de hemoglobina.

Recientemente hemos desarrollado un microfotómetro para la determinación de la concentración de hemoglobina. Este equipo, denominado en su primera versión MF-1, se caracteriza por la rapidez con que efectúa la medición, su fácil manejo y transportación, y su bajo consumo tanto energético como de reactivos. Tales particularidades conllevan a que el mismo pueda utilizarse en condiciones diversas, en el domicilio de un enfermo, en la consulta del médico de la familia, en zonas rurales, o en cualquier otro sitio de atención primaria del sistema nacional de salud.

DESARROLLO

El microfotómetro MF-1 está diseñado para realizar la determinación fotométrica de la concentración de hemoglobina en un intervalo de valores comprendidos entre 50 y 200 g/L, (5.0 y 20.0 g/dL) empleando el método de la cianometahemoglobina según lo recomendado nacional e internacionalmente /1,2,3/.

En una disolución preparada convenientemente se cumple la ley de Bouguer-Lambert-Beer, por tal razón la concentración de hemoglobina [Hb] puede ser calculada como:

$$[Hb] = A \cdot Fp$$

donde A es la absorbancia de la disolución de cianometahemoglobina CNHb y Fp es el factor de calibración del equipo de medición /3/.

La absorbancia de la muestra es el logaritmo del inverso de la transmitancia:

$$A = \log \frac{I_0}{I_s}$$

donde I_0 es la intensidad luminosa transmitida por la disolución de ciano-ferricianuro de potasio (CNFe), I_s es la intensidad luminosa correspondiente a la disolución anterior con sangre.

En nuestro sistema de medición se utilizan ampulas de vidrio de producción nacional que contienen 2,5 mL de disolución de CNFe. Para efectuar la determinación, se añaden 10 μ L de sangre, la cual se toma con ayuda de un microcapilar desechable y se agrega al reactivo de CNFe con un dispositivo diseñado para tal fin.

El equipo MF-1 es un microfotómetro de un solo rayo con filtro. Consta de dos partes fundamentales: una óptica y una electrónica (Figura 1). El funcionamiento del equipo es controlado por un microprocesador. A través de señales sonoras y la información que aparece en el display se le indica al operador cuando debe colocar el ampula con el reactivo, quitarla para añadir la sangre y colocarla nuevamente. Finalmente, en el display del equipo se presenta el valor de la concentración de Hb.

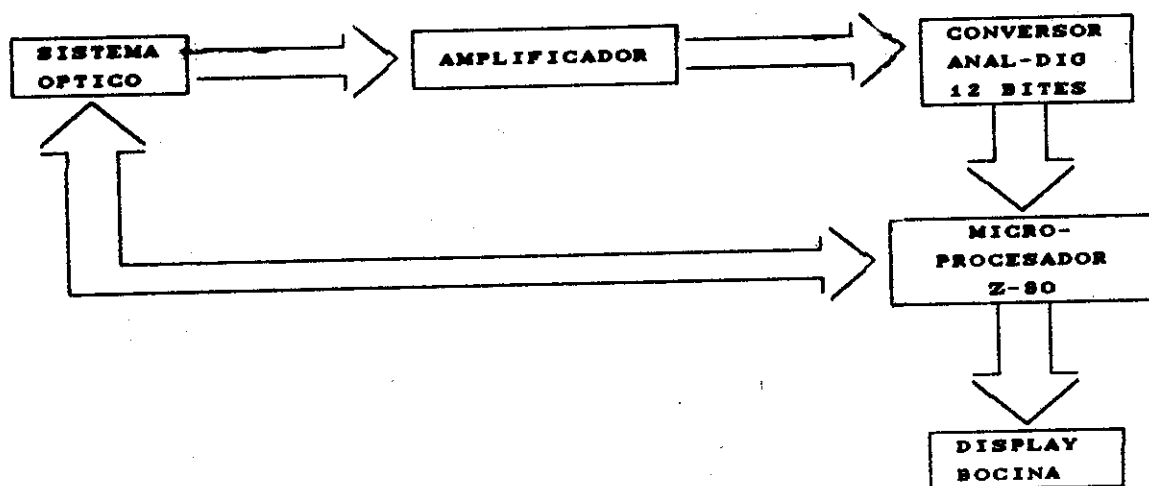


Figura 1. Esquema del funcionamiento del microfotómetro MF-1.

El sistema óptico diseñado (Figura 2) consta de una lámpara de filamento de tungsteno (1), una lente (2) que concentra el haz luminoso sobre el ampula (3), un filtro (4) con máxima transmitancia a 530 nm y ancho de 40 nm, y un fotodiodo de silicio (5). La señal eléctrica prove-

niente del fotodiodo es amplificada por un amplificador transconductor y llevada a código binario por un conversor analógico-digital de 12 bits (Figura 1). Después de sensar los valores de I_0 e I_s , el microprocesador calcula el cociente de ellos y busca en una tabla el valor de [Hb] correspondiente.

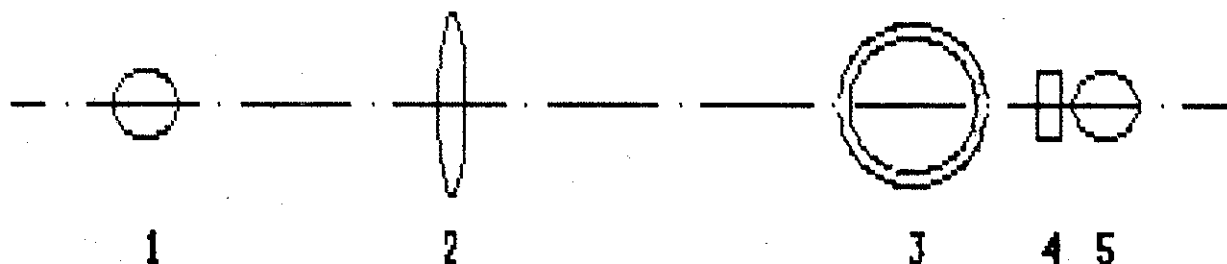


Figura 2. Esquema del sistema óptico del microfotómetro MF-1.

1. lámpara de filamento de tungsteno
2. lente
3. ampolla
4. filtro 530 nm
5. fotodiodo de silicio

La tabla de calibración del equipo se confeccionó de acuerdo con lo recomendado en /2/. Se prepararon seis disoluciones patrones de CNHb de concentración conocida utilizando el reactivo de CNFe, ampollas de patrones de cianometahemoglobina de la firma BDH y del preparado en la Empresa de Productos Farmacéuticos de Cuba. El modo de preparación de cada una se indica en la Tabla 1. Se utilizaron microburetas con una precisión de 0,05 mL. A cada ampolla se le midió cinco veces el inverso de la transmitancia en el MF-1. Con estos resultados se calculó F_p y se confeccionó la tabla de calibración. Una vez programada esta en la memoria, el equipo se comprobó midiendo [Hb] de las ampollas con patrones y comparando estos valores con los de la Tabla 1.

Tabla 1. Preparación de patrones de CNHb para la calibración

Firma del Patrón	Vol. Patrón (mL)	Vol. CNFe (mL)	[CNHb] (g/L)	Cantidad de Ampulas
BDH	2,5	0	144	3
BDH	2,0	0,5	115	3
BDH	1,5	1,0	86	3
BDH	1,0	1,5	57	3
cubano	2,5		173	3
-	0	2,5	0	3

Con el objetivo de verificar el funcionamiento del equipo en condiciones concretas de trabajo, se efectuó una prueba preliminar en el Centro de Referencia (CENREF) del Laboratorio Clínico del Hospital Clínico-Quirúrgico Hermanos Ameijeiras. La prueba consistió en determinar [Hb] en muestras de sangre de pacientes del hospital, con un prototipo del MF-1 y con el espectrofotómetro comercial LKB (modelo 4049).

La determinación en el LKB se efectuó con el instrumental y de acuerdo con la norma establecida nacionalmente: 20 μ L de sangre en 5 mL de disolución de CNFe, medido en cubetas de 1 cm de paso de luz a 540 nm. Con el MF-1 se trabajó según lo descrito anteriormente y para recoger la muestra de sangre se utilizaron micropipetas capilares desechables de la firma Dr. Lange.

Durante tres días de trabajo se analizaron 145 muestras que abarcaron el intervalo de interés clínico. Cada día, al comienzo y al final de la jornada, se comprobó el funcionamiento del MF-1 midiendo la concentración de cianometahemoglobina [CNHb] en ampulas patrones de 144 g/L de la firma BDH. Una muestra de 2.5 mL del contenido del ampula patrón abierta cada día, se utilizó para la determinación del factor de conversión de la absorbancia medida con el LKB a unidades de [Hb].

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la determinación experimental con el MF-1 de la concentración del patrón BDH durante los tres días de trabajo. Aparecen reflejados la concentración del patrón [CNHb], la cantidad de mediciones efectuadas n, el valor medio de concentración obtenido [CNHb]_m, la desviación estándar D.S. y el coeficiente de variación C.V.

Tabla 2. Resultados de la medición del patrón con el MF-1

[CNHb] (g/L)	n	[CNHb] _m (g/L)	D.S. (g/L)	C. V. (%)
144	6	143.5	.8	.6

En la Tabla 3 se comparan los resultados de las mediciones efectuadas con ambos equipos, cada uno de los tres días y los tres días en total: el valor medio [Hb]_m, la desviación estándar de este valor medio D.S. y el intervalo de variación de los valores de [Hb] obtenidos. Se incluyen, además, la diferencia media entre los resultados obtenidos con el LKB y con el MF-1 y la desviación estándar de esta diferencia media D.S.. El tratamiento de los resultados diarios y total por el test t de observaciones pareadas no mostró diferencias significativas entre las mediciones con ambos equipos.

Los parámetros pendiente, intercepto y error o desviación estándar sobre la línea de regresión dsY/X pueden proveer la mejor información sobre los errores entre los dos equipos si no se obvian las limitaciones causadas por la no linealidad, la presencia de datos espurios y un intervalo de valores experimentales pequeño /4/. En la Figura 3 se representan gráficamente los resultados del análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados de los 145 pares de determinaciones de [Hb].

Tabla 3. Comparación de los resultados en el MF-1 y el LKB.

Día	Equipo	n	[Hb]m	D.S.	Rango (g/L)	Dif. med.	D.S.	Test t
I	MF-1	58	137.3	17.3	76-166			
	LKB	58	137.6	18.3	74-167	-.3	5.8	n.s.
II	MF-1	38	119.3	25.5	66-167			
	LKB	38	117.9	24.4	68-161	1.4	4.6	n.s.
III	MF-1	49	117.2	29.2	67-185			
	LKB	49	116.4	27.3	72-173	.8	4.2	n.s.
total	MF-1	145	125.8	25.9	66-185			
	LKB	145	125.3	24.9	68-173	.5	5.0	n.s.

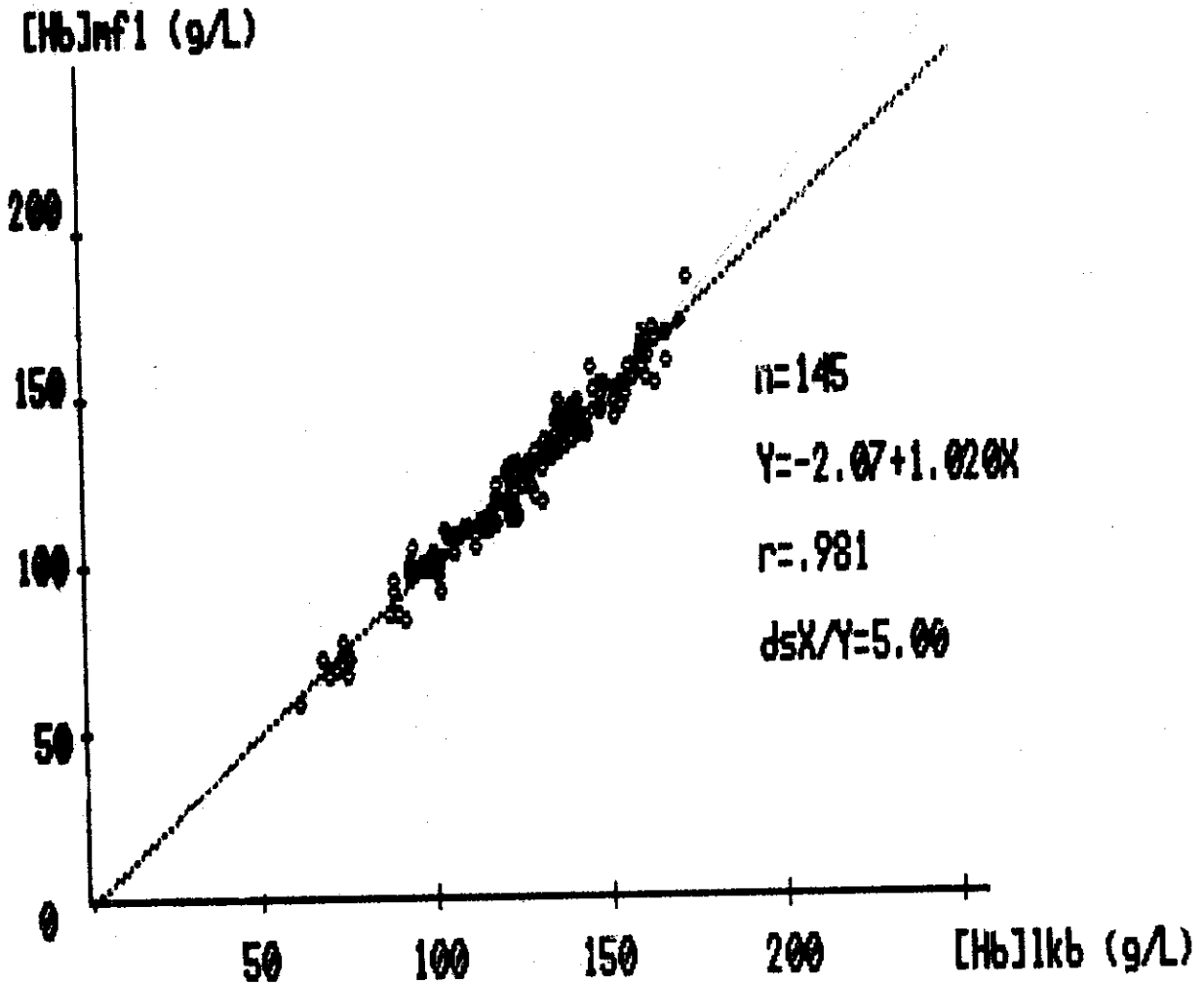


Figura 3. Análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados de las determinaciones de [Hb] con los equipos MF-1 y LKB en tres días de trabajo.

Las diferencias entre los resultados obtenidos con el LKB y con el MF-1 pueden ser cuantificadas por medio de un gráfico. En la Figura 4 se muestra la extensión de estas diferencias a través de un histograma, donde F.R. es la frecuencia relativa en % y $[Hb]_{mf1} - [Hb]_{lkb}$ es la diferencia entre el valor de concentración obtenido con el MF-1 y el obtenido con el LKB.

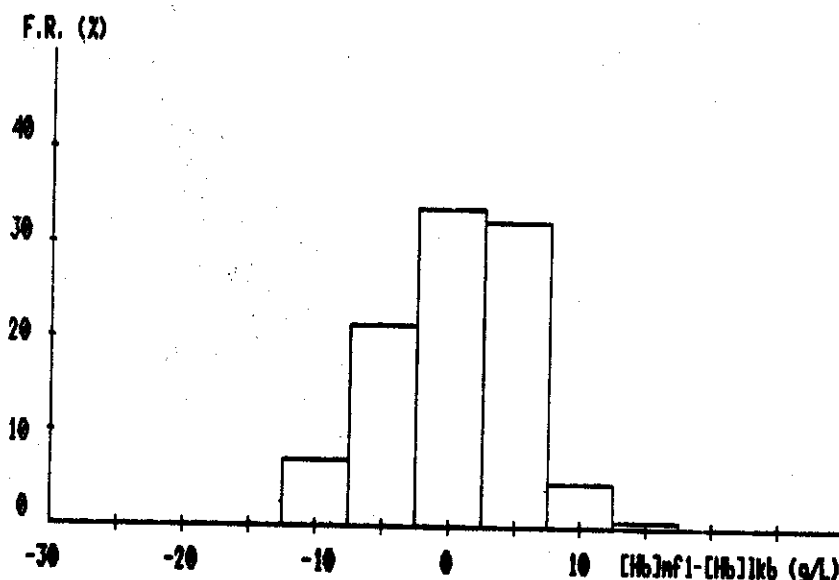


Figura 4. Histograma de las diferencias en tres días de trabajo entre las determinaciones de $[Hb]$ con los equipos MF-1 y LKB.

A pesar de que la cantidad de mediciones efectuadas en patrones BDH no es alta, no deja de tener valor la información que nos suministra la Tabla 2. Obsérvese que los resultados son prácticamente similares con un coeficiente de variación de sólo 0.6 %.

El valor del error o desviación estándar sobre la línea de regresión de la Figura 3 coincide perfectamente con el valor de la desviación estándar de la diferencia media entre los resultados obtenidos con el LKB y con el MF-1 (Tabla 3) y ambos indican un error aleatorio de 5 g/L. La pendiente de la recta de mejor ajuste es 1.020, lo cual brinda un estimado de 2 % de error proporcional. El intercepto en Y sugiere un error constante de la determinación en el MF-1 con respecto al LKB de -2.07 g/L. Sin embargo, este valor no coincide con el de .5 g/L obte-

nido a través de la diferencia media (Tabla 3). Este último valor es relativamente pequeño y la no coincidencia de ambos puede explicarse por el hecho de que el parámetro diferencia media depende igualmente del error proporcional. El coeficiente de correlación es .981. La inspección visual del gráfico de la Figura 3 permite corroborar la linealidad y la ausencia de datos espurios en la distribución de los puntos experimentales.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Del análisis efectuado a los resultados de la prueba en el CENREF mediante el test t de observaciones pareadas y la regresión lineal por mínimos cuadrados, así como de la apreciación de lo mostrado gráficamente se concluye que el microfotómetro MF-1 permite obtener valores de concentración de hemoglobina que no difieren significativamente de los obtenidos con un espectrofotómetro LKB, de acuerdo con lo normado nacionalmente.

El microfotómetro IMRE modelo MF-1 está siendo evaluado por una comisión del MINSAP con vistas a su posterior producción nacional. Dos prototipos se comprobaron durante varios meses en el Laboratorio del Policlínico Plaza de la Revolución y en un consultorio del médico de la Familia en Alamar con resultados satisfactorios.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los compañeros del Hospital Clínico-Quirúrgico Hermanos Ameijeiras Dr. Celso Cruz, técnico Marlen Fraga Casas y Lic. Ana M. Arias Prieto, la colaboración prestada durante la realización de la prueba del microfotómetro MF-1. Agradecemos especialmente al Dr. Francisco Baldor Navarro la ayuda brindada antes y durante la prueba, así como las valiosas recomendaciones y observaciones realizadas al presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

1. *International Committee for Standardization in Haematology* (1978). Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH Standard EP 6/2:1977) and specifications for international haemoglobinocyanide reference preparation (ICSH Standard EP 6/3:1977). *J. Clin. Path.* 31, p. 139.
2. Van Assedelft, O. W. et al. *Recommended method for the determination of the haemoglobin concentration in blood*. LAB 84/10.
3. NC 57-98-1; 86 SNNMCC. *Determinación fotométrica de hemoglobina en sangre*. Método de análisis clínico.
4. Westgard, J. O.; M. R. Hunt (1973). *Use and interpretation of common statistical test in method comparison studies*. *Clin.Chem.* 19, p. 49
5. Westgard, J. O. et al. (1978). *Concepts and practices in the evaluation of laboratory methods. II. Experimental procedures*. *Am. J. Med. Technol.* 44, p. 420.
6. Westgard, J.O. et al. (1978). *Concepts and practices in the evaluation of laboratory methods. III. Statistics*. *Am. J. Med. Technol.* 44, p. 552.
7. James, G. P.; D. E. Bee (1981). *Evaluation of clinical laboratory instruments. Part II: Use and abuse of statistical tools*. *Am. J. Med. Technol.* 47, p. 303.
- 8- Willard, H. W.; L. L. Merritt; J. A. Dean (1964). *Instrumental methods of analysis*. Ed. D. Van Nostrand. Toronto. New York and London.
9. Henry, R. J.; D. C. Cannon; J. W. Winkelman (1980). *Química clínica. Bases y técnicas*. Ed. Jims. Barcelona.