|  |
| --- |
| **GUÍA DE PRÁCTICA DE LABORATORIO** |
| **PERÍODO ACADÉMICO** | 2025-1S |
| **ASIGNATURA** | HEMATOLOGÍA I  | **SEMESTRE: TERCERO** | **PARALELO: A** |
| **NOMBRE DEL DOCENTE** | Mgs. XIMENA ROBALINO FLORES  |
|  **FECHA** | 25 de junio del 2025  |
| **NÚMERO DE PRÁCTICA** | 7 | **HORA:** 9:00- 13:00 | **DURACIÓN:** 4 horas |
| **NOMBRE DE LOS ESTUDIANTES.** | **GRUPO 1** | **GRUPO 2** |
| 1.- ALMEIDA ALMEIDA ALISON DAYANA | 21.- GUEVARA LASCANO MARIA JOSE |
| 2.- AMAGUAYA BECERRA FROILAN DESIDERIO - | 22.- HERNANDEZ MINAYA ARIEL RENE |
| 3.- ANALUISA MEJIA MARIAN ELISA | 23.- LEMA PEÑAFIEL SAMANTA MICAELA |
| 4.- AYOL TAMBO DIANA DEL CARMEN | 24.- LOPEZ GUAMAN JOEL STIVEN |
| 5.- BEDON VITERI ANAHI FAHIRU | 25.- MAZALEMA DIAZ EMILY JAZMIN |
| 6.- BUÑAY CONDO LUZ MARINA | 26.- MEDINA VARGAS GEORGE ALEJANDRO |
| 7.- CALIZ YANEZ ARLETH PAULINA | 27.- OLEAS OLEAS MONICA ISABEL |
| 8.- CAMACHO PEÑAFIEL SHIRLEY VERONICA | 28.- OVANDO RODRIGUEZ RONALD ARIEL |
| 9.- CAMINO FLORES CARLOS GUSTAVO | 29.- PAGUAY MURILLO KAREN MONSERRATH |
| 10.- CANDO ZAMBRANO RICHARD ALEXANDER | 30.- PAREDES CHIMBORAZO DARWIN JOEL - |
| 11.- CARRILLO MOLINA JUAN FERNANDO | 31.- PAREDES VALDIVIEZO YULIANA DALILA |
| 12.- CARRILLO ZURITA KERLY MELISA | 32.- RODRIGUEZ LANDY KELYN SCARLET |
| 13.- CASTILLO YANEZ WENDY NAYELI | 33.- SHAÑAY ANGOS KAREN ABIGAIL |
| 14.- CASTRO MOROCHO ANTHONY | 34.- SILVA MOROCHO KATHERYN LISBETH |
| 15.- CHACHA GUANGA PAOLA | 35.- TORRES PADILLA JOSE NICOLAS |
| 16.- CHAVEZ TANDAZO TANIA SARBELLA | 36.- VILLARES DORADO MISHELL DALESKY |
| 17.- CHUCHUCA CUENCA ERICK JARDEL | 37.- VINZA ROJAS ALENKA JULIETE |
| 18.- ERAZO POMAQUISA KELLY DAYANNA | 38.- YUMAGLLA PUMA JIMMY CRISTIAN  |
| 19.- ESTRELLA MOROCHO KERLY MICAELA | 39.- YUMBO SISA WILSON JOEL  |
| 20.- GAVIDIA PEÑAFIEL JENYFER NAYELLI | 40.- YUPANGUI GUAMINGA GENESIS |
|  **LUGAR DE LA PRÁCTICA** | Laboratorio Clínico de Docencia Lab. E200 |
| **TÍTULO DE LA UNIDAD** | Serie Roja  |
| **TEMA DE LA PRÁCTICA** |  Hemoglobina: Determinación de Hemoglobina en sangre total  |
| **RESULTADO DE APRENDIZAJE.**Integra técnicas de recuento de eritrocitos, determinación de hematocrito o volumen globular, determinación de hemoglobina con todas las normas de control de calidad para identificar las características de los eritrocitos interpretando resultados de los índices eritrocitarios, dispersogramas e histogramas de la serie roja |
| **OBJETIVO GENERAL** | Determinar hemoglobina en sangre por el método de la cianmetahemoglobina |
| **Objetivos específicos** | Realizar correctamente la técnica manual para la determinación de hemoglobina en sangre  |
| **FUNDAMENTO TEÓRICO:** |
| **HEMOGLOBINOMETRÍA**La capacidad de combinación del oxígeno de la sangre es directamente proporcional a la concentración de hemoglobina más que al número de hematíes. Por lo tanto, la hemoglobinometría, una de las determinaciones de laboratorio más frecuentes, es importante como prueba para descartar las enfermedades asociadas con anemia y para seguir la respuesta de estas enfermedades al tratamiento.La concentración normal de hemoglobina expresada en gramos/100 ml de sangre varia ampliamente según el estándar de Hemoglobina utilizado, la edad, sexo del paciente y la altitud del lugar.Muchos son los métodos para determinar la concentración de la Hemoglobina, los más comúnmente utilizados se basan en uno de los cuatro procedimientos siguientes: medida de la capacidad de combinación de la sangre con el oxígeno (método gasométrico); medida del contenido en hierro en la sangre (método químico), medida colorimétrica de la densidad de la sangre total en soluciones de sulfato de cobre de densidad conocida y la determinación posterior de la hemoglobina y medida colorimétrica de un derivado coloreado de la hemoglobina por ejemplo la oxihemoglobina, la hematina acida, la hematina alcalina y la cianmetahemoglobina y comparación de la muestra desconocida con una estándar, mediante un método espectrofotométrico. **MÉTODO DE LA CIANMETAHEMOGLOBINA (ICSH-OMS)**El método de la cianmetahemoglobina (HiCN) es el método de referencia internacionalmente aceptado para la determinación de la hemoglobina. Es un método espectrofotométrico que se basa en la conversión de todas las formas de hemoglobina (excepto la sulfohemoglobina) en un compuesto estable de color, la cianmetahemoglobina, cuya concentración se puede medir con precisión.**1. Principio del Método**El método se basa en dos reacciones químicas principales que ocurren cuando la sangre total se mezcla con el reactivo de Drabkin:1. **Oxidación de la hemoglobina:** El ferricianuro de potasio (K3​Fe(CN)6​), uno de los componentes del reactivo de Drabkin, oxida el hierro ferroso (Fe2+) de la hemoglobina a hierro férrico (Fe3+), convirtiendo así todas las hemoglobinas presentes (oxihemoglobina, desoxihemoglobina, carboxihemoglobina, etc.) en **metahemoglobina (Hi)**.
	* Hb(Fe2+)+K3​Fe(CN)6​→MetaHb(Fe3+)
2. **Formación de la cianmetahemoglobina:** La metahemoglobina reacciona con el cianuro de potasio (KCN), otro componente del reactivo de Drabkin, para formar un complejo estable de color rojo brillante llamado **cianmetahemoglobina (HiCN)**.
	* MetaHb+KCN→CianmetaHb

La intensidad del color de la solución final es directamente proporcional a la concentración total de hemoglobina en la muestra de sangre.**2. El Reactivo de Drabkin**El reactivo de Drabkin es una solución de varios componentes, siendo los principales:* **Ferricianuro de potasio (K3​Fe(CN)6​):** Agente oxidante que convierte la hemoglobina en metahemoglobina.
* **Cianuro de potasio (KCN):** Reacciona con la metahemoglobina para formar la cianmetahemoglobina estable.
* **Dihidrógeno fosfato de potasio (KH2​PO4​) o Bicarbonato de sodio (NaHCO3​):** Se utiliza como tampón para mantener el pH de la solución. El bicarbonato de sodio también acelera la lisis de los eritrocitos.
* **Detergente (opcional):** Se puede añadir para aumentar la lisis de los glóbulos rojos y disminuir la turbidez causada por la precipitación de proteínas.

**Importante:** El cianuro de potasio es un compuesto tóxico, por lo que el reactivo de Drabkin debe manejarse con extrema precaución. Se debe evitar la acidificación, ya que esto puede liberar cianuro de hidrógeno (HCN), un gas altamente tóxico.**3. Procedimiento General**El procedimiento manual para la determinación de la hemoglobina por este método es el siguiente:1. **Preparación de la muestra:** Se obtiene una muestra de sangre total (generalmente venosa con anticoagulante como EDTA o capilar por punción en el dedo).
2. **Dilución:** Se toma un volumen conocido y preciso de sangre (por ejemplo, 20 µL con una micropipeta o pipeta de Sahli) y se diluye en un volumen mucho mayor del reactivo de Drabkin (por ejemplo, 5 mL). Esto crea una dilución de 1:251.
3. **Homogeneización e incubación:** Se mezcla bien la muestra diluida y se deja reposar durante un tiempo específico (generalmente de 3 a 15 minutos) para asegurar la lisis completa de los glóbulos rojos y la conversión de toda la hemoglobina a cianmetahemoglobina.
4. **Medición espectrofotométrica:** La absorbancia de la solución se mide en un espectrofotómetro o fotocolorímetro a una longitud de onda de **540 nm**.
5. **Cálculo:** La concentración de hemoglobina en la muestra se determina comparando la absorbancia de la muestra con la de un estándar de cianmetahemoglobina de concentración conocida. La fórmula básica es:

Hemoglobina(g/dL)=Absorbancia del estaˊndarAbsorbancia de la muestra​×Concentracioˊn del estaˊndarTambién se puede utilizar una curva de calibración construida a partir de varios estándares para obtener resultados más precisos.**4. Ventajas del Método de la Cianmetahemoglobina*** **Método de referencia:** Es el estándar de oro reconocido por el Comité Internacional de Estandarización en Hematología (ICSH).
* **Precisión y exactitud:** Proporciona resultados muy fiables si se realiza correctamente y se cuenta con una buena calibración y control de calidad.
* **Estabilidad del compuesto final:** La cianmetahemoglobina es un compuesto estable, lo que permite que la medición se realice después de un tiempo prudencial sin que el color se degrade.
* **Mide la mayoría de las hemoglobinas:** Con la excepción de la sulfohemoglobina, este método cuantifica todas las formas de hemoglobina presentes en la sangre.

**5. Desventajas y Limitaciones*** **Toxicidad del reactivo:** El cianuro de potasio es tóxico, lo que requiere un manejo cuidadoso y una eliminación adecuada de los residuos.
* **Interferencias:** La turbidez de la muestra debido a la alta concentración de lípidos (lipemia) o la presencia de proteínas plasmáticas elevadas (hiperproteinemia) puede interferir con la absorbancia y llevar a resultados falsamente elevados.
* **No detecta sulfohemoglobina:** Si un paciente tiene una cantidad significativa de sulfohemoglobina, el resultado de hemoglobina total será subestimado.
* **Procedimiento manual:** En laboratorios de alto rendimiento, el método manual es lento y requiere más tiempo y personal en comparación con los analizadores hematológicos automatizados.

**6. Aplicación Actual**Aunque la mayoría de los laboratorios modernos utilizan analizadores hematológicos automatizados para la determinación de la hemoglobina, que emplean variantes del método de la cianmetahemoglobina o métodos sin cianuro, el método manual sigue siendo la técnica de referencia para la calibración de los equipos y para el control de calidad. Es un método fundamental para garantizar la precisión de los resultados en hematología. |
| **MATERIALES Y MÉTODOS** |
| **Equipos** | **Materiales** | **Reactivos** |
| Espectrofotómetro | Equipo para toma de muestras de sangre Tubos de ensayoPapel absorbente Papel parafilmAbsorbedor de goma Pipetas volumétricas de vidrio calibradas de 20 ml o 10 mlPipetas de Sahli | Alcohol antiséptico1.-Solución de DrabkinBicarbonato de sodioCianuro de potasioFerricianuro de potasioAgua destiladaEsta solución debe ser límpida y colocada en frasco de vidrio oscuro resguardada de la luz. No debe conservarse más de un mes. 2.- patrón o Estándar de cianmetahemoglobina. |
| **MUESTRA** | Sangre total obtenida con anticoagulante EDTA |
| **PROCEDIMIENTO / TÉCNICA:** |
| **Determinación de hemoglobina en sangre:**1. - Conectar el espectrofotómetro según las especificaciones de la casa comercial.
2. Homogenizar bien la sangre mediante agitación suave durante un tiempo mínimo de 5 minutos o por inversión del tubo 20 veces.
3. - Pipetear 5ml de solución de Drabkin en un tubo.
4. - Mediante micropipeta añadir 0,02 ml de sangre o 20 ul de sangre Homogenizada en el tubo con solución de Drabkin. Al realizar esta operación, es fundamental eliminar el exceso de sangre que puede quedar en las paredes externas del capilar antes de introducirlo en el reactivo y procurar así mismo que no quede sangre adherida a las paredes internas de la pipeta.
5. -Agitar el tubo mediante inversión (4o5 veces) con el fin de homogenizar bien la mezcla sangre-reactivo y esperar mínimo 5 minutos para que se produzca la hemolisis total y se completa la transformación de toda la hemoglobina en
6. - Leer la absorbancia de la solución a 540mm o 546mm con blanco de reactivo.

Para calcular la concentración de hemoglobina es recomendable disponer de una gráfica o curva de calibración o aplicando la siguiente formula:Hemoglobina g/dl = A (muestra) x Concentración de StandardA (Standard) A: absorbancia o densidad ópticaCuando utilizamos factor:Hemoglobina g/dl = A (muestra) x Factor (36.7)  |
| **RESULTADO (Gráficos, cálculos, etc.)** |
| Valores obtenidos en la práctica, imágenes, gráficos, etchttp://www.sommerbrasil.com.br/loja/images/PIPETA%20DE%20SAHLI.jpgC:\Users\SysteMarket\Pictures\Imagen1.jpg **PIPETA DE SAHLI TUBOS Y MUESTRA** C:\Users\SysteMarket\AppData\Local\Microsoft\Windows\INetCache\Content.Word\DSC_0000097.jpg**BLANCO ESTÁNDAR Y MUESTRA**  **ESPECTROFOTÓMETRO Y LECTURA** C:\Users\SysteMarket\AppData\Local\Microsoft\Windows\INetCache\Content.Word\DSC_0000095.jpg |
| **OBSERVACIONES** |
| COMPLETA EL ESTUDIANTE………………… |
| **CONCLUSIONES** |
| COMPLETA EL ESTUDIANTE………………… |
| **RECOMENDACIONES** |
| COMPLETA EL ESTUDIANTE…………………Incluir el reporte de laboratorio en el formato creado por el estudiante |
| **PREGUNTAS:**1.-Ponga los valores de referencia de Hemoglobina según edad, género y altitud geográfica.2.- Factores de corrección de la hemoglobina por la altitud geográfica. - |
| **BIBLIOGRAFÍA** |
| RUBIO CAMPAL, Faustina. Fundamentos y técnicas de Análisis hematológicos y citológicos. Paraninfo.VIVES CORRONS, Joan Lluís. Manual de Técnicas en Laboratorio de Hematología. Tercera edición. Masson. 2006 |
| Dra, María Eugenia Lucena **DIRECTORA DE CARRERA** | Mgs. Ximena Robalino Flores **DOCENTE** | Franklin Ramos Flor**RESPONSABLE DEL LABORATORIO** |