

CARBOXYHEMOGLOBIN

Determinazione spettrofotometrica
della Carbossiemoglobina su sangue intero
metodo di Rodkey, modificato da Beutler e West

5 x 5 ml

REF CM06-25

Uso previsto

Kit per la determinazione quantitativa *in vitro* della Carbossiemoglobina nel sangue intero.

Principio

Il campione viene trattato con un riducente, con conseguente conversione di tutta l'emoglobina presente in carbossiemoglobina ed emoglobina ridotta. Si eliminano così le possibili interferenze della ossiemoglobina e della metaemoglobina. La % COHb viene misurata per via spettrofotometrica applicando la formula, semplificata da Rodkey, che si ottiene risolvendo il sistema di due equazioni rappresentanti le estinzioni molari dell'Hb e COHb applicate alla legge di Lambert-Beer. Condizione necessaria per una corretta determinazione è che lo spettrofotometro presenti una stretta banda passante e sia accuratamente tarato.

Campione

Sangue intero anticoagulato con eparina o EDTA.
STABILITÀ: almeno 5 giorni a temperatura ambiente o 2-8°C.

Reagenti

Contenuto del kit

REF CM06-25

REAGENT 1

Tampone pH 6.85

CM06-25R1: 2 x 35 ml

*REAGENT 2/A (predosato)

Reagente riducente

CM06-25R2: 5 flaconi

REAGENT 2/B

Tampone pH 6.85

CM 06-25R3: 5 x 5ml

(*) I reagenti contrassegnati con l'asterisco contengono sostanze pericolose. Leggere le schede di sicurezza.

STABILITÀ: i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata in etichetta se conservati a 20-25°C e protetti dalla luce.

Preparazione del Reagente 2

Al momento dell'uso trasferire con una pipetta Pasteur il contenuto di un flacone di Reagent 2/B in un flacone di Reagent 2/A. Agitare delicatamente per inversione, evitando per quanto possibile di inglobare aria.

ATTENZIONE: il Reagente 2 teme l'umidità.

STABILITÀ: utilizzare il Reagente 2 entro 60 minuti dalla preparazione.

Procedimento manuale

Metodo: spettrofotometrico
Lunghezza d'onda: 420 nm, 432 nm
Cuvetta: 1 cm di cammino ottico
Temperatura: ambiente (20-25°C)
Tempo di reazione: 10 minuti
Lettura: contro Reagente 2

Preparazione dell'emolizzato

Pipettare in provetta:

Reagent 1	3.0 ml
Campione	25 µl

Mescolare 2 o 3 volte per inversione. Lasciare riposare per 5 minuti per consentire la completa lisi cellulare.

Determinazione della % COHb

Pipettare in una piccola provetta in vetro:

Reagente 2	1.15 ml
Campione emolizzato	100 µl

Mescolare delicatamente per inversione e lasciare incubare per almeno 10 minuti a temperatura ambiente. Non attendere per oltre 60 minuti. Trasferire il contenuto della provetta in una cuvetta di vetro e leggere le assorbanze a 420 e 432 nm, azzerando contro Reagente 2.

Calcolo

Calcolare il rapporto A_r tra le assorbanze lette a 420 e 432 nm:

$$A_r = A_{420} / A_{432}$$

Inserire il valore ottenuto nella seguente formula:

$$\% \text{COHb} = [1 - (A_r \times F_1)] \times 100\% / [A_r \times (F_2 - F_1) - F_3 + 1]$$

dove:

$$F_1 = \text{rapporto estinzioni molari Hb}_{432} / \text{Hb}_{420}$$

$$F_2 = \text{rapporto estinzioni molari COHb}_{432} / \text{Hb}_{420}$$

$$F_3 = \text{rapporto estinzioni molari COHb}_{420} / \text{Hb}_{420}$$

Se lo spettrofotometro è tarato si possono ritenere corretti, per le emoglobine umane, i seguenti valori di estinzione molare pubblicati da Rodkey, a cui corrispondono i rapporti F_1 , F_2 e F_3 sotto riportati:

Lunghezza d'onda	AHb	ACOHb	$F_1 = 1,3330$
420 nm	0,988	1,970	$F_2 = 0,4787$
432 nm	1,317	0,473	$F_3 = 1,9939$

Controllo della Calibrazione

Poiché non sono disponibili in commercio standard di controllo, per verificare l'efficienza del metodo è sufficiente testare in parallelo sangue di fumatori e di non fumatori e constatarne la discriminazione.

È bene comunque verificare di tanto in tanto la taratura dello spettrofotometro utilizzando il seguente procedimento:

In due palloncini di vetro di classe A, contrassegnati rispettivamente con COHb e Hb, pipettare:

	COHb	Hb
Sangue emolizzato di non fumatori	2 ml	2 ml
Saturazione con CO	SI	---
Saturazione con aria	---	SI
Reagente 2 fino al volume di	25 ml	25 ml

Leggere immediatamente a 420 e 432 nm contro Reagente 2 e calcolare F_1 , F_2 e F_3 come sopra descritto.

L'emolizzato si prepara come descritto in metodica, in quantità sufficiente (es. 50 µl + 6 ml di Reagente 1).

Valori di Riferimento








Indicazione del grado di intossicazione da monossido di carbonio:

% COHb	
< 4 %	non fumatori
3 - 10 %	fumatori
< 10 %	intossicazione lieve
30 - 40 %	intossicazione grave
> 50 %	coma, morte

Bibliografia

- E. Beutler et C. West, "Clin. Chem.", 30 (6), 871-874 (1984).
- G. Heinemann, K. Löschenkohl et H. Schievelbein, "J. Clin. Chem. Clin. Biochem.", 17 (10), 647-651 (1979).

LEGENDA SIMBOLI

	dispositivo medico diagnostico in vitro
	numero di lotto
	numero di catalogo
	limite di temperatura
	usare entro la data
	attenzione
	consultare le istruzioni d'uso

IVD

CE

Ed. 01 - 07.2022

PRODUTTORE



FAR

Via Fermi, 12 - 37026 Pescantina - VERONA - ITALY

tel +39 045 6700870

sito web <http://www.fardiag.com>

e-mail: order@fardiag.com

e-mail: fardiag@fardiag.com