



freies Hämoglobin (fHb)

Bestimmung von freiem Hämoglobin (fHb) 3-Wellenlängen-Methode (415/380/450 nm) nach Harboe

Zweckbestimmung

Das Produkt "freies Hämoglobin (fHb) - Harboe" wird zur spektralphotometrischen Bestimmung des freien Hämoglobins im Plasma, Serum oder im Überstand von Erythrozytenkonzentraten mit der 3-Wellenlängen-Methode nach Harboe [1] verwendet. Die Methode kann auf allen Spektralfotometern und klin.-chem. Analysatoren mit einstellbaren Wellenlängen 415/380/450 nm durchgeführt werden.

Prinzip

Freies Hämoglobin tritt im Blut-Plasma z. B. durch hämolytische Anämien, v. a. durch hämolytische Transfusionsreaktionen auf. Für die Beurteilung der Qualität von Erythrozytenkonzentraten (EK) stellt das freie Hämoglobin ein Parameter dar, welcher Grundlage zur Berechnung der Hämolyserate des Erythrozytenkonzentrates ist. Da das Hämoglobin nativ - ohne chemische Umsetzung - gemessen wird, werden die in der Probe enthaltenen Hämoglobinderivate durch die 3-Wellenlängen-Methode nach Harboe nicht erfasst. Die Relevanz ist im Einzelfall der Bestimmung zu prüfen. Nach ausreichender Mischung mit dem Reagenz kann die Probe sofort fotometrisch gemessen werden [2].

Reagenzien

Das Reagenz auf freies Hämoglobin (fHb) nach Harboe ist gebrauchsfertig. Bei der auf dem Etikett angegebenen Lagertemperatur ist das Reagenz bis zum aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Die Flasche ist stets gut geschlossen und nach dem Öffnen kontaminationsfrei halten. Dazu sollten benötigte Entnahmen nur durch Ausgießen erfolgen. Reagenz nicht benutzen wenn die Lösung nicht klar und frei von Partikeln ist.

Gefahren und Sicherheit

Beachten Sie die notwendigen Vorsichtsmaßnahmen im Gebrauch von Laborreagenzien und Körperflüssigkeiten. Der Umgang sollte durch sachkundiges Personal erfolgen. Nationale und interne Labor-Richtlinien für Arbeitssicherheit und Infektionsschutz sind zu befolgen. Tragen Sie geeignete Schutzkleidung und Einmalhandschuhe während der Arbeit. Es ist auf wirksamen Infektionsschutz entsprechend der Laborrichtlinien zu achten.



Für weitere und allgemeine Sicherheitshinweise beachten Sie bitte auch die Angaben auf dem Etikett und das entsprechende Sicherheitsdatenblatt (SDB/SDS).
Download über QR-Code oder Link: www.sds-id.com/100138-7

Inhalt/Hauptbestandteile

004003-...	freies Hämoglobin (fHb) 3-Wellenlängen-Methode nach Harboe oder Fairbanks
	Cont. Scatteringfreie, stabilisierte TRIS/HCl-Pufferlösung mit einer physiologischen Osmolalität von 288 mosm/kg H ₂ O.
004003-0020/5	5x 20 ml freies Hämoglobin (fHb)
004003-0250	1x 250 ml freies Hämoglobin (fHb)

Zusätzlich werden benötigt/empfohlen:

005190-...	Fotometrische Messeinrichtung, Pipetten. Lipidex (zum Klären stark lipämischer Proben) *
------------	---

* von Bioanalytic verfügbar

Probenmaterial

Heparin-Plasma, Serum (bedingt), Überstand von Erythrozytenkonzentraten (EKs).
Hämolyse in der Präanalytik (Blutentnahme und nachfolgende Bearbeitung) führt zu falsch erhöhten Ergebnissen.
Die Proben müssen absolut frei von Zellen oder anderen Partikeln/Flusen sein (siehe auch unter: Leistungsmerkmale > Interferenzen).

Präanalytik:

Für die Präanalytik ist zügige Abfolge der Arbeitsschritte und sorgfältiges sauberes Arbeiten dringend erforderlich. Daher gelten die nachstehenden präanalytischen Bedingungen generell für die Bestimmung des freien Hämoglobins.

Absolut obsolet:

Jeglicher Probentransport von Vollblut-Proben! Blutproben können auch nicht gekühlt transportiert oder aufbewahrt werden. Das Plasma oder Serum muss unverzüglich und sorgfältig von den Zellen getrennt werden (pipettieren, nicht dekantieren!).

Heparin-Plasma:

Heparin-Abnehmeröhrchen nicht zu stark mischen. 2x kippen genügt in der Regel. Danach SOFORT (!!) in einer frei schwingenden Zentrifuge schonend zentrifugieren (reduzierte Beschleunigung und langsames Auslaufen der Zentrifuge). Der Überstand sofort abpipettieren. Dabei mindestens 5 mm Abstand mit der Pipettenspitze zu den Blutzellen halten. Keine Zellen aufwirbeln! Wenn bei wiederholt scharfer Zentrifugation des abpipettierten Überstandes sich noch Zellen absetzen, wurde unzureichend sauber gearbeitet. Dann den zweiten Überstand nochmals abpipettieren. Der zellfreie Überstand (Plasma) wird zur Analyse eingesetzt. Haltbarkeit im Überstand mehrere Stunden (unter Steril-Bedingungen).

Serum [3]:

Serum als Probenmaterial wird nicht oder nur für Ausnahmefälle empfohlen, da wesentlich anfälliger auf präanalytische Hämolyse! Blutprobe nach der Entnahme SOFORT zentrifugieren und Überstand SOFORT separieren (siehe Heparin-Plasma). Danach abwarten bis die Gerinnung abgeschlossen ist. Der Überstand wird dann scharf zentrifugiert. Das dann zellfreie Serum wird abpipettiert. Erst daraus wird das Serum fHb bestimmt [3].

EKs:

Für den Vorgang der Zentrifugation folgen Sie den Anweisungen für Plasma.

Referenzbereiche

Die nachstehenden Referenzwerte beziehen sich auf die Literaturangaben. Eigene Referenzwerte wurden nicht ermittelt. Verschiedentlich werden auch bis über 5x höhere Referenzwerte gelesen. Möglicherweise sind sehr hohe Referenzwerte auch Folge ungenügender Berücksichtigung der Präanalytik.

Heparin-Plasma:

< 2 mg/dl (< 20 mg/l) freies Hämoglobin [2].

Serum:

< 5 mg/dl (< 50 mg/l) freies Hämoglobin [2].

Erythrozytenkonzentrat-Überstand:

Die Hämolyserate darf am Ende der Laufzeit des Erythrozytenkonzentrates maximal 0,8% der Erythrozytenmasse betragen [2]. Abhängig vom jeweiligen Hämatokrit entspricht dies einer freien Hämoglobinkonzentration von etwa 400 mg/dl [6].

Durchführung

Wellenlängen:.....415 / 380 / 450 nm
 Schichtdicke:..... 10 mm
 Temperatur:.....20...37 °C
 Messart:.....gegen Reagenz

Verdünnung 1 : 11

Andere Verdünnungen können unter Berücksichtigung des Linearitätsbereiches nach Validierung verwendet werden.

Bei Werten oberhalb 200 mg/dl ist eine entsprechend höhere Verdünnung mit Reagenz zu wählen.

Bei Werten unterhalb 5 mg/dl empfiehlt Harboe eine Verdünnung von 1 : 6.

In Küvette/Reagenzglas pipettieren:			
	Makro:	Halbmikro:	Mikro*:
PR Probe **	1 ml	500 µl	200 µl
R Reagenz	10,0 ml	5,00 ml	2,00 ml

* Ein Ansatz mit geringeren Volumina ist nicht zu empfehlen.

** Aufgrund der 3-Wellenlängen-Messung wird mindestens 3-fach-Bestimmung der Proben in getrennten Ansätzen empfohlen (siehe ⇒ Interferenzen ⇒ Partikel).

Pipettenspitze durch mehrmaliges Aufziehen mit Reaktionsgemisch gut ausspülen. Gut durchmischen. Nach Aufsteigen etwaiger Luftblasen ²⁾ kann sofort gemessen werden.

Auswertung/Berechnung

Für die einfache Berechnung steht ein Excel-Sheet zum freien Download zu Verfügung.

Für Verdünnung 1 : 11:

$$\frac{((168 \times A_{415}) - (84 \times A_{380}) - (84 \times A_{450}))}{((168 \times A_{415}) - (84 \times A_{380}) - (84 \times A_{450}))} \times 10 = \text{mg/dl fHb}$$

Für Verdünnung 1 : 6:

$$\frac{((168 \times A_{415}) - (84 \times A_{380}) - (84 \times A_{450})) \times 0,545}{((168 \times A_{415}) - (84 \times A_{380}) - (84 \times A_{450})) \times 5,45} = \text{mg/dl fHb}$$

Umrechnung:

$$\text{mg/dl fHb} \times 0,155 = \mu\text{mol/l fHb}$$

$$\text{mg/dl fHb} \times 0,621 = \mu\text{mol/l fHb}_{(\text{Fe})}$$

Nomenklatur

R = Reagenz
 PR = Probe
 E₀₀₀ = Extinktion bei Wellenlänge

fHb = Tetramere Form des freien Hämoglobins
 fHb_(Fe) = Monomere Form des freien Hämoglobins

Qualitätskontrolle

Die nationalen Richtlinien zur Qualitätssicherung sind zu befolgen.

Geeignete Kontrollen sollten bei jeder Anwendung mitgeführt werden, um ein fehlerhaftes Ergebnis auszuschließen. Zur Kontrolle von Präzision und Richtigkeit wird die Verwendung eines geeigneten Kontrollmaterials empfohlen ³⁾.

Leistungsmerkmale

Nachweisgrenzen

Für eine Verdünnung von 1 : 11 gilt nach Harboe eine untere Grenze von 5 mg/dl fHb und eine Obergrenze von 200 mg/dl fHb.

Bei einer Verdünnung 1 : 6 entspricht dies mathematisch einer unteren Grenze von 2,73 mg/dl bzw. einer oberen Grenze von 109 mg/dl.

Präzision Verdünnung 1 : 11

In der Serie n = 20	Mittelwert [mg/dl]	SD [mg/dl]	VK [%]
Probe 5.0 mg/dl	4.48	0.17	3.76
Probe 7.5 mg/dl	6.34	0.18	2.83
Probe 10 mg/dl	8.92	0.29	3.21
Probe 30 mg/dl	27.63	0.42	1.52
Probe 50 mg/dl	47.97	0.61	1.26
Probe 75 mg/dl	71.48	0.76	1.07
Probe 100 mg/dl	98.58	1.24	1.26
Probe 150 mg/dl	143.1	2.14	1.50
Probe 200 mg/dl	194.2	2.13	1.10

Korrelation Verdünnung 1 : 11

Es wurde ein Vergleich dieses Reagenzes (x) mit einer Standard-Verdünnungsreihe (y) gravimetrisch/volumetrisch rückführbar durchgeführt. Die Stammlösung dieser Verdünnungsreihe wurde gegen die Referenz Hämiglobincyanid-Methode nach DIN 58931 gemessen. Die Analysen wurden mit einer Verdünnung 1 : 11 durchgeführt.

11 Standardwerte von 0 ... 200 mg/dl wurden gemessen. Pro Standardwert wurden 20 Bestimmungen durchgeführt.

Es wurden mit insgesamt n = 220 Proben folgende Ergebnisse erhalten: y = 1,0286 × +0,8074; r = 0,99974.

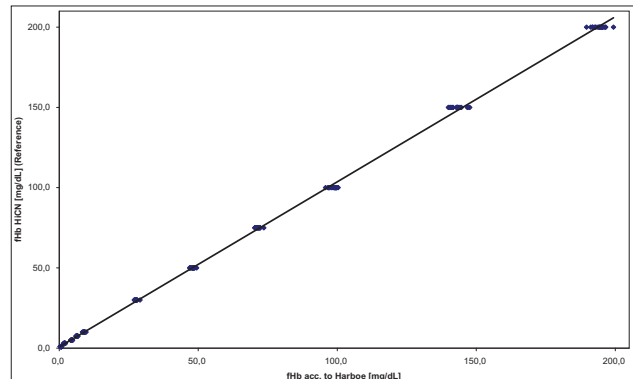


Abb. 1: Verdünnung 1 : 11; alle Ergebnisse

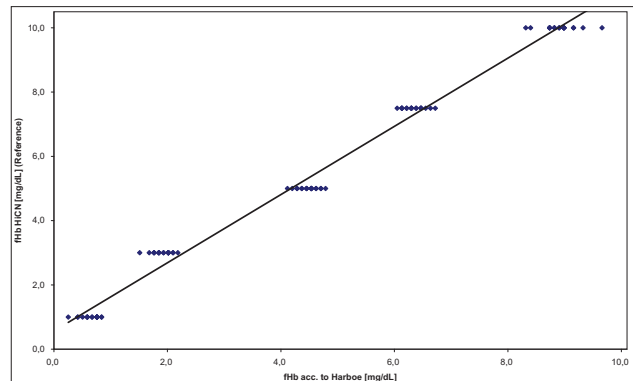


Abb. 2: Verdünnung 1 : 11; Werte unter 10 mg/dl

Interferenzen

Wir haben keine Angaben über weitere als die hier aufgeführten Interferenzen.

Lipämie

Lipämische Proben können zu erhöhten Ergebnissen führen. Stark lipämische Proben müssen geklärt werden (Ideal da ohne Verdünnungseinfluss: Lipidex von Bioanalytic GmbH).

Bilirubin

Ikterische Proben können die fHb-Bestimmung stören. Es liegen uns jedoch keine gesicherten quantitativen Ergebnisse oder Grenzwerte vor. Eine Störung durch Bilirubin > 2 mg/dl wird in der Literatur ^[4] angegeben.

Partikel

Das hochwertige Bioanalytic fHb-Reagenz ist scatteringfrei und wird unter partikel-/staubfreien Bedingungen hergestellt.

Interferenzen können durch Partikel (Staub, Flusen) oder Zellen hervorgerufen werden. Die 3 - Wellenlängen- Methode verhindert zwar in bestimmten Grenzen Fehlmessungen durch leichte Trübungen, aber entgegen mancher Interpretation schützt sie NICHT vor Fehlmessungen durch Partikel, Flusen und Zellen. Im Gegenteil vergrößert sich das Risiko von Fehlmessungen in einer durch Partikel/Flusen kontaminierten Küvette mit jeder zusätzlichen Wellenlänge bzw. Messung.

Um Interferenzen durch Partikel zu erkennen ist es zu empfehlen, von einer Probe mehrfache Messungen durchzuführen und auf Übereinstimmung zu prüfen. Trübungen erzeugen im Gegensatz zu Partikeln meistens keine Differenzen der gleichen Probe.

Partikel aus Luftverschmutzung

Das Reagenz ist vor Kontamination mit Staub, Flusen etc. zu schützen und stets gut verschlossen zu halten. In idealer Weise entnehmen sie Reagenz durch Ausgießen in ein staub-/partikelfreies Gefäß (z. B. Gefäße für Hämatologie-Zählgeräte) oder spülen dieses mit Reagenz mehrmals vor. Bei Reagenz-Resten in der Flasche von weniger als 20 % der angegebenen Füllmenge sollte dieses für eine neue Serie nicht mehr verwendet werden (neue Flasche verwenden, Rest werfen).

Niemals Reste einer Flasche in eine andere überführen!

Partikel aus Probe

Um Partikel aus der Probe zu verhindern nicht offen stehen lassen, sondern nach dem Zentrifugieren sofort abtrennen und verschließen.

Hinweise

Nur für professionelle Anwendung.

Die vorliegende Produktinformation ist ausschließlich für das hier aufgeführte Produkt gültig. Insbesondere kann diese nicht für ähnliche Produkte anderer Hersteller hergenommen werden.

Klassifizierungen

EU: EDMA: 13 01 09 90 00; IVD (in-vitro Diagnostikum).

Unterstützung / Infoservice

Methodische und technische Unterstützung erhalten Sie per E-Mail unter support@bioanalytic.de.

Überprüfen Sie die Aktualität dieser Produktinformation regelmäßig auf unseren Internetseiten.

Rückmeldungen

Hinweise der Anwender können an support@bioanalytic.de berichtet werden. Vorschläge werden für weitere Entwicklungen berücksichtigt.

Wenn während oder infolge des Gebrauchs ein schwerwiegender Vorfall aufgetreten ist, melden Sie diesen bitte dem Hersteller und / oder seinem Bevollmächtigten und Ihrer nationalen Behörde.

Entsorgung

Bitte beachten Sie die gesetzlichen Vorschriften Ihres Landes.

Gebrauchte und verfallene Lösungen sind entsprechend der lokalen Vorschriften zu entsorgen. Innerhalb der EU gelten die Vorschriften auf der Grundlage Richtlinie 67/548/EWG des Rates der Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung gefährlicher Stoffe, in der jeweils gültigen Fassung.

Dekontaminierte Verpackungen können dem Hausmüll oder Recycling zugeführt werden, soweit nicht anders geregelt.

Ungebrauchte Reste

Diese sind i. d. R. Sonderabfälle die der Wiederverwertung oder Entsorgung zugeführt werden müssen. Nach Rücksprache nehmen wir solche Reststoffe im Originalgebinde zurück.

Literatur & Fußnoten

Verwendete grafische Symbole und Kennzeichnungen sind entsprechend der Norm bzw. auf unseren Internetseiten verfügbar.

- [1] M. Harboe: A Method for Determination of Hemoglobin in Plasma by Near-Ultraviolet Spectrophotometry. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation Jan 1959, Vol. 11, No. 1: 66–70.
 - [2] Thomas, L.; Labor und Diagnose, 4. Aufl. Med. Verlagsgesellschaft Marburg (1992: 811, 597).
 - [3] Rick, W.; Klinische Chemie und Mikroskopie, 6. Aufl. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg (1972: 115).
 - [4] Bednar, Renate; Bayer, P. M.: Freies Hämoglobin im Plasma - Vergleich zweier Spektralphotometrischer Methoden - Bilirubin als Störfaktor; ZB MED Lab.med. 18: 198 (1994).
- *1) Bitte beachten Sie die aktuellen Vorschriften.
- *2) Je nach Stärke und Art der Mischung können Luftblasen entstehen. Die Zeit zum Aufsteigen muss abgewartet werden. Diese lässt sich durch Stillstand der aktuellen Anzeige im Fotometer ermitteln (nur bei konstanter Messung - beachten Sie die Gebrauchsanweisung Ihres Fotometers).
- *3) Gebrauchsfertige, methodenunabhängige fHb-Kontrollen können durch Bioanalytic GmbH hergestellt werden. Diese wurden bereits 2005 auf Anregung des Paul-Ehrlich-Instituts (PEI) von uns entwickelt. Die typische Abweichung liegt bei nur $\pm 10\%$ und ist **methodenunabhängig** - also identisch für Hämoglobincyanid-Methode, 3-Wellenlängen-Methode sowie alle anderen Methoden!
Produktion und Mindestmengen auf Anfrage (keine Kleinmengen-Produktion für Verwender).