

# Estudio de las interferencias producidas por la hemólisis en la medición de 18 constituyentes séricos en un ADVIA 2400

R. Caballero Sarmiento

## Resumen

Se ha estudiado la interferencia por hemólisis en 18 magnitudes séricas en un analizador incorporado en el mercado como sustituto de otro. El estudio tiene como objetivos determinar y cuantificar el efecto de la hemólisis en 18 constituyentes medidos en el analizador ADVIA 2400, comparar dicho efecto con el que se producía en el analizador DAX 72 y comparar la especificidad frente a la hemólisis en ambos. Se ha seguido la metodología recomendada por la SEQC y los resultados se han analizado siguiendo recomendaciones de su Comisión de Interferencias y Efectos de los Medicamentos. De los 18 constituyentes estudiados, 14 presentan interferencia clínicamente significativa. Globalmente el nuevo analizador, con sus cambios metodológicos e instrumentales, es algo menos específico que el DAX 72 respecto a la interferencia por hemólisis.

**Palabras clave:** Hemólisis. Sensibilidad y especificidad.

## Summary. Interference by hemolysis on the measurement of 18 serum components in an ADVIA 2400

We studied the interference by hemolysis on 18 serum quantities in an automated analyzer recently incorporated (ADVIA 2400) as a substitute of another one (DAX 72). The objectives of the study are: to determine and to quantify the effect of the hemolysis in 18 components measured in the ADVIA 2400; to compare this effect with that in DAX 72, and to compare the specificity of both analyzers in relation to hemolysis. Interferences were assessed following SEQC-recommended methodology and results have been analyzed according to recommendations given by the Commission of Interferences and Drug Effects. Of 18 components studied, 14 show clinically significant interference. Overall, the new analyzer, with its methodological and instrumental changes, is less specific than DAX 72 with respect to interference by hemolysis.

**Key words:** Hemolysis. Sensitivity and Specificity.

## INTRODUCCIÓN

Retirado ya del mercado el analizador DAX 72, la compañía Bayer Health Care ofrece un nuevo analizador, el ADVIA 2400, el cual puede hacer las mismas mediciones que el DAX 72, y ofrece la posibilidad de realizar determinaciones inmunoturbidimétricas. Hemos querido comparar la interferencia causada por la hemólisis en el DAX 72, previamente estudiada por Castaño J L. en 1992 (1) y también por nosotros (datos no publicados), con la que podría existir en el ADVIA 2400 en 18 mediciones de magnitudes bioquímicas. Es interesante que metodologías teóricamente idénticas o muy semejantes den, como resultado de la presencia de hemólisis, resultados con signos distintos (colesterol), dependiendo pues del analizador. No citaremos las posibles fuentes de hemólisis fuera del organismo, pues están exhaustivamente estudiadas (2,3,4), pero pese a su conocimiento, sigue siendo un problema diario en nuestro laboratorio, en porcentajes que se aproximan, a veces, al 3% (datos no publicados) de las muestras de suero recogidas.

El objetivo del presente trabajo es conocer y cuantificar la posible interferencia producida por la hemólisis fuera del organis-

mo en las magnitudes que medimos rutinariamente en un analizador ADVIA 2400 de Bayer Health Care.

Comparar los resultados con los obtenidos de la bibliografía y ver si el nuevo analizador aporta, con sus cambios en algunas metodologías, mejoras en cuanto a la interferencia por hemólisis.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### a) Metodología experimental

Se ha seguido el protocolo de la Comisión de Interferencias y Efectos de los Medicamentos de la SEQC (5), corrigiendo las concentraciones de hemoglobina de partida. Se ha partido de la sangre de un voluntario, sin patologías conocidas, que forma parte del personal del Laboratorio.

Se preparó un hemolizado como indica Caballero R et al, 2004 (6), en forma, por tanto, diferente a como indica la *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* 1986 (7).

La concentración de hemoglobina de la solución de partida fue de 10,1g/dL.

A partir de esta mezcla se prepararon soluciones decrecientes de hemoglobina con agua destilada de las que se calculó la concentración de hemoglobina, para obtener finalmente cinco soluciones de suero con el interferente y una basal con agua destilada.

Se pudo medir la hemoglobina en las tres primeras soluciones dando las siguientes concentraciones de hemoglobina: 1° 0,5 g/dL, 2° 0,2 g/dL, 3° 0,1 g/dL y de las soluciones 4ª y 5ª se tubo que usar la concentración de hemoglobina teórica (0.05g/dL y 0.025g/dL), ya que estos valores están por debajo del límite de detección del analizador hematológico.

Las alícuotas resultantes se colocaron en el muestreador siguiendo una tabla de números aleatorios (8) y, al inicio y al fin de las mediciones, se procesaron los controles internos rutinarios, los cuales dieron todos en los márgenes previstos. Se procesaron datos en el programa Valim 3a, preparado por la Comisión de Interferencias y Efectos de los Medicamentos de la SEQC.

Ponemos en la tabla I los métodos en los que se basan las mediciones de los distintos constituyentes.

**Tabla I.** Relación de métodos para la medida de los constituyentes

Constituyente analizado	Fabricante	Métodos	Reacción
Glucosa	Bayer	Hexocinasa	Punto final
Urea	Bayer	Ureasa con GLDH	Cinética inversa
Colesterol	Bayer	Enzimático+Trinder	Punto final
cHDL	Wako	Inmunoinhibición	Punto final
Urato	Bayer	Uricasa/peroxidasa	Punto final
Creatinina	Bayer	Jaffe, cinético	Cinética
Triglicérido	Bayer	GPO, Trinder sin blanco	Punto final
Bilirrubina	Bayer	Diazo/cafeína	Punto final
Bilirrubina esterificada	Bayer	Diazo	Punto final
Alanina aminotransferasa (ALT)	Bayer	IFCC modificado	Cinética
Aspartato aminotransferasa (AST)	Bayer	IFCC modificado	Cinética
Fosfatasa alcalina (FAL-AMP)	Bayer	IFCC modificado	Cinética
Gammaglutamiltransferasa	Bayer	IFCC modificado	Cinética
Hierro (II+III)	Bayer	Ferrocina	Punto final
Albumina	Bayer	Unión a BCG	Punto final
Proteína	Bayer	Biuret	Punto final
Calcio (II)	Bayer	CPC	Punto final
Fosfato (no esterificado)	Bayer	Fosfomolibdato/UV	Punto final

## b) Instrumentación

- Analizador ADVIA 2400 (Bayer)
- Analizador de hematología ADVIA 120 (Bayer)
- Centrifuga (Jouan. Modelo GR, 4, 11, refrigerada)

Al prepararse el hemolizado de la misma manera que en trabajos anteriores (6), la hemoglobina analizada mantendría su máximo de absorción en la banda de Soret (414 nm) y haría un pico menor a los 575 nm. Se trataría, pues, de oxihemoglobina en su mayor parte. En los tubos 4° y 5° ya no se distinguía ningún color rojo, y consideramos que el tubo cuarto era el límite para la percepción visual de la hemólisis.

## RESULTADOS

El estudio estadístico ha indicado como interferencias clínicamente significativas las correspondientes a los siguientes constituyentes:

Colesterol, bilirrubina y bilirrubina esterificada, albúmina, triglicérido, AST, proteína, fosfatasa alcalina, fosfato no esterificado

La situación con el hierro (II+III) es la de una variable dependiente que primero aumenta su valor y luego, a medida que aumenta la variable independiente, disminuye. Es decir es

una situación de no linealidad y para linealizarla hemos hecho una transformación cuadrática, según Doménech JM. 2000 (9), dando como resultado que: por cada mg/dL de hemoglobina en el suero la concentración de hierro (II+III) varía en - 0,425 micromol/L en media, cifra que se corresponde con la raíz cuadrada de la pendiente *b* obtenida tras la linealización.

La situación del creatinino es al revés que la del hierro (II+III) y debe ser linealizada por una transformación logarítmica, tras la cual no aparece relación entre el aumento de hemoglobina y creatinino, es decir, no existiría interferencia para el creatinino (*b* = 1).

Utilizando los criterios de valoración de la significación analítica y clínica (10) hemos calculado en forma que parece más racional, ya que no depende tanto de los valores de referencia de las magnitudes medidas, los valores de los Límites para Interferencias Clínicamente Significativas (LICS), obtenidos a partir de las medias de los constituyentes (nos ha resultado imposible obtener una mezcla de sueros cuyas concentraciones estén todas próximas a los valores de decisión). Los datos se dan en función de la mitad del Coeficiente de Variación Biológica Intraindividual (tabla II).

En un estudio previo (datos no publicados) se estudió la interferencia por hemólisis en el DAX 72. Mostramos en la tabla III las discordancias que existen, bajo el efecto de la hemólisis, entre los dos analizadores. Pese a ellas, únicamente el chi cuadrado que corresponde a 0,05 g/dL de hemoglobina presenta una diferencia estadísticamente significativa (*P* = 0,034 a dos colas).

## DISCUSIÓN

El programa Valim 3a, como puede apreciarse, ha detectado menos interferencias (50%) clínicamente significativas que la metódica del cálculo de los LICS (78%). Los porcentajes de aumento o descenso de concentración de las magnitudes estudiadas han sido, no obstante, calculados con el programa mencionado.

Nuestros resultados para la albúmina coinciden con los de Castaño (1), pero no con los publicados por Siest (11).

La interferencia descrita para la fosfatasa alcalina no coincide con los resultados de Siest (11) pero sí con los de Young (12) y Castaño (13), también coinciden con Castaño y Young en GGT, Urato y ALT.

Castaño (1) encuentra interferencia para el calcio (II) y nosotros no, al igual que Siest, Sonntag y Frank (14,15) que tampoco encuentran esta interferencia.

En cuanto al colesterol, los triglicéridos y el urato, que usan la reacción de Trinder como reacción indicadora, hemos obtenido lo mismo que Castaño (13) pero discrepamos de Siest (11) para el colesterol, que nos da una interferencia positiva, lo cual parece más lógico dadas las propiedades pseudoperoxidásicas de la hemoglobina.

En cuanto a la comparación, en su comportamiento ante la hemólisis, entre el DAX 72 y el nuevo ADVIA 2400 (tabla III),

**Tabla II.** Hemólisis en ADVIA 2400

Hemoglobina			-	+	++	+++	++++
	Medias*	LICS*	0,05 g/dL	0,1 g/dL	0,2 g/dL	0,5 g/dL	0,5 g/dL
Glucosa	5,82	0,145	=	=	=	=	=
BUN	11,767	0,729	=	=	=	=	=
Colesterol	5,36	0,33	=	=	(+) 2,4%	(+) 5,7%	
cHDL	1,40	0,05	=	=	=	=	=
Ác. Úrico	295	12,68	=	=	=	(-) 5,7%	
Triglicérido	1,27	0,0658	=	=	(+) 2,2%	(+) 9,95%	
Creatinina	89,99	1,979	(-) 2,95%	(-) 7%	(-) 8,8%	(-) 2,95%	
ALT	0,435	0,0265	=	=	=	(+) 9,26%	
AST	0,45	0,0271	(+) 7,7%	(+) 20%	(+) 34,8%	(+) 79,4%	
FAL-AMP	1,203	0,0385	(-) 6,2%	(-) 4,85%	(-) 17,1%	(-) 37,2%	
GGT	0,403	0,0278	=	=	(-) 2,76%	(-) 9,3%	
Hierro	16,705	1,10	=	(+) 19,5%	=	(-) 9,2%	
Albúmina	43,58	1,002	=	(+) 1,7%	(+) 3,75%	(+) 8,4%	
Proteína	6,88	0,96	=	(+) 1,2%	(+) 2,9%	(+) 6,4%	
Fósforo	1,249	0,0537	=	=	(+) 4,3%	(+) 9,5%	
Calcio	2,397	0,0335	=	=	=	=	
Bilirrubina	9,776	0,625	(-) 15,7%	(-)	(-)	(-) 315%	
Bilirrubina esterificada	0,317	0,0292	(-) 200%	(-)	(-)	(-) 2207%	

\* Unidades SI; = no interferencia; (+) interferencia positiva; (-) interferencia negativa

**Tabla III.** Discordancias entre analizadores

ADVIA 2400	DAX 72
Colesterol (+)	Colesterol (-)
Bilirrubina esterificada (-)	Bilirrubina esterificada (+)
ALT (+)	ALT NO
GGT (-)	GGT NO
Fe (II+III) (-)	Fe (II+III) NO
Albúmina (+)	Albúmina NO
Calcio (II) NO	Calcio (II) (-)
Glucosa NO	Glucosa (-)
cHDL NO	cHDL (-)

estadísticamente hay un ligero empeoramiento en la especificidad frente a hemólisis, dada su mayor sensibilidad a ella, tanto en aspecto cuantitativo, como en la presencia de alguna interferencia a concentraciones mínimas de hemoglobina. Es de destacar la aparición de una interferencia negativa en el hierro (II+III), que en la práctica es muy marcada, así como la gran interferencia negativa sobre la bilirrubina y la bilirrubina esterificada, que llega a dar, también en la práctica, resultados con valores negativos.

Las discordancias entre el efecto de la hemólisis en el anterior analizador DAX72 y en el nuevo ADVIA2400, podrían deberse en el caso de la bilirrubina esterificada a cambios en el reactivo, y podría achacarse el mismo fenómeno al cambio de metodología en la GGT (método de la IFCC en ADVIA2400 y de Szast en DAX 72), en ALT, que pasa a ser el método de la IFCC en el ADVIA 2400, el hierro (II+III) pasa de ferene en DAX 72 a ferrocine en ADVIA 2400. Los fenómenos de discordancia entre colesterol, calcio (II), glucosa, albúmina y c-HDL, quedan sin explicación en el nivel de metodologías, pues, en teoría son las mismas que en el DAX 72, ¿podría tratarse de una diferencia instrumental? Avanzamos esa posibilidad, aunque la desconocemos

Como conclusión podemos indicar que parece fuera de toda duda el rechazar, para su estudio bioquímico en el ADVIA 2400, todo suero que presente concentraciones de hemoglobina iguales o superiores a 0,5 g/dL. Esto es completamente coherente con lo publicado anteriormente por Caballero R et al 2004 (6).

## BIBLIOGRAFÍA

- Castaño J L. Evaluación del analizador DAX 72. *Quim Clin* 1992; 11:34-42
- Carrazo P, Servidio G, Plebani M. Hemolized Specimens: A Reason for Rejection or a Clinical Challenge. *Clin Chem* 2000; 46: 306-7
- Thomas L. Hemólisis como influencia y factor de interferencia. *JIFCC* 2004;113:1-6
- Richterich R, Colombo JP. *Bioquímica Clínica*. Barcelona: Salvat; 1983. p. 81-3
- Sociedad Española de Química Clínica. Comisión efectos de los medicamentos en Química Clínica 1993. p. 19-36
- Caballero R, Alsina MJ, Sánchez JL. Concentraciones de Hemoglobina que no pueden usarse en los estudios de interferencia por hemólisis: Confirmación experimental. *Quim Clin* 2004; 23:335.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Interference testing in clinical chemistry; Proposed Guideline. NCCLS publication EP7-P. Villanova. NCCLS; 1986.
- Doménech JM. *Tablas de Estadística*. Barcelona: Herder; 1991
- Doménech JM. Diagnósticos de un modelo de regresión múltiple. *Análisis Multivariante. Unidad didáctica 7*. Barcelona: Signo; 2000.
- Castaño JL. Criterios para la valoración de la significación analítica y clínica de las interferencias en bioquímica clínica. *Quim Clin* 1995; 4:107-9
- Siest G. *Análisis Clínicos y medicamentos*. Barcelona: Doyma; 1987.
- Donald S Young. *Effects of Preanalytical Variables on Clinical Laboratory Test*. A.A.C.C. Press; 1997.
- Castaño JL. Interferencias causadas por la bilirrubina, hemoglobina y hemólisis en la determinación de 15 constituyentes séricos. *Quim Clin* 1989; 8:47-55.
- Sonntag O. Haemolysis as an Interference Factor in Clinical Chemistry. *J. Clin Chem Clin Biochem* 1986; 1986; 24: 127-39.
- Frank JJ, Bermes EW, Bickel MJ, Watkins BF. Effect of In Vitro Hemolysis on Chemical Values for Serum. *Clin Chem* 1978; 24: 1966-70.

**Correspondencia**  
 Rafael Caballero Sarmiento  
 c/ Bailén 37, 4º 1º  
 08010 Barcelona  
 19481rcs@comb.es