

Recomendaciones para el estudio de las interferencias dependientes de la concentración del constituyente

Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular

Comité Científico

Comisión Interferencias y Efectos de los Medicamentos en Bioquímica Clínica¹

Documento K, Fase 3, Versión 12

Documento preparado por J.L. Castaño Vidriales, S. Ventura Pedret

Índice

- 0 Introducción
- 1 Objeto
- 2 Conceptos previos
- 3 Antecedentes y revisión
- 4 Fundamentos teóricos
- 5 Diseño experimental
- 6 Ejemplo práctico
- 7 Bibliografía

0 INTRODUCCIÓN

En los documentos precedentes publicados por esta comisión se han propuesto distintos protocolos para el estudio de interferencias: *in vitro* por fármacos (1), *in vitro* endógenas (2), e *in vivo* (3). En general, en ellos se asume que las desviaciones del valor verdadero debidas al interferente son independientes de la concentración del constituyente en estudio, pero esto no siempre es así. Únicamente en uno de los documentos citados (2) se trata brevemente el desarrollo de las interferencias que dependen de la concentración del constituyente en estudio.

La determinación de las interferencias dependientes de la concentración del constituyente en estudio, es importante en aquellas magnitudes para las que se usa más de un valor discriminante, por ejemplo las concentraciones de la glucosa, iones sodio y potasio, hemoglobina, etc. Es entonces cuando es necesario cuantificar la interferencia a varias concentraciones del constituyente en estudio (2).

El origen de este tipo de interferencias se debe a que el interferente puede reaccionar directamente con el constituyente o afectar a su determinación, provocando, en ambos casos, una interferencia dependiente de la concentración del constituyente, y en las que la intensidad de la interferencia cambia cuando la concentración del constituyente varía.

1 OBJETO

El objeto de este documento es proporcionar un método para detectar y cuantificar una interferencia dependiente de la concentración del constituyente estudiado con un método analítico determinado.

Se propone una técnica de regresión múltiple para la cuantificación de la interferencia (4), cuyo modelo experimental se basa en una matriz ortogonal con muestras que contienen concentraciones progresivamente crecientes tanto del constituyente en estudio como del interferente. En la regresión múltiple que se obtiene se pueden calcular el tipo de interferencia, la dirección de la interferencia y la contribución de cada una de estas variables a la interferencia.

2 CONCEPTOS PREVIOS

Cuando se determina la existencia de una interferencia es necesario establecer la relación que puede haber entre la cuantía de la misma y la concentración del interferente. Para ello, es necesario establecer la función que mejor defina esta relación.

En este contexto se consideran dos situaciones:

- 1) *Interferencia independiente de la concentración del constituyente*. Donde se considera variables: la cuantía de la interferencia y la concentración del interferente, y cuyo estudio se ha descrito ampliamente en otro documento (2).
- 2) *Interferencia dependiente de la concentración del constituyente*. En estos casos se consideran como variables: la cuantía de la interferencia, la concentración del interferente, la concentración del constituyente y todo tipo de posibles interacciones entre el interferente y el constituyente, como son reacciones cruzadas, autorreactividades, etc. (2).

3 ANTECEDENTES Y REVISIÓN

Se han publicado muchos protocolos para el estudio de las interferencias y la mayoría de ellos se basan en el procedimiento clásico que consiste en la adición del interferente potencial a una mezcla de sueros y la medida u observación de sus efectos; otros protocolos se basan en la selección de muestras con el interferente (muestras ictericas, lipémicas, o hemolizadas) que se analizan por el método de estudio y por un método de referencia que se conozca que esté libre de interferencias (5). Así, el

¹Composición de la Comisión: F. Antoja Ribó, M.T. Casamajó Dalmau, J.L. Castaño Vidriales, M^a.P. Chueca Rodríguez (presidenta), M. Doménech Clar, M.D. Fernández Delclós, R. Galimany Solé, N. Gascón Roche, J.M. Gelabert Orench, R. Güell Miró, I. Rojo Vizcaíno, S. Ventura Pedret, E. Douezi Lecha

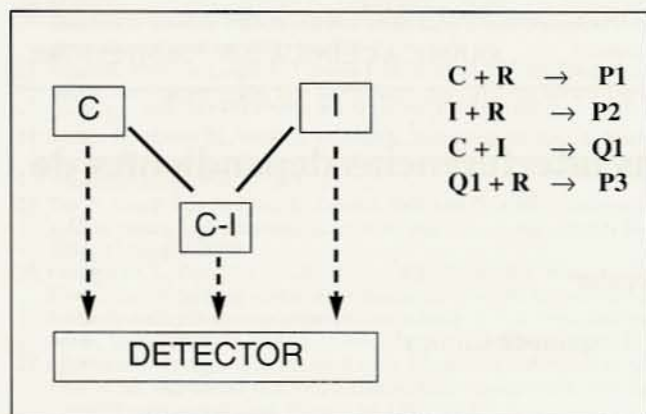


Figura 1. Modelo de interacciones gráficas, cada especie química es un nódulo y las interacciones entre ellas son posibles reacciones. C, Constituyente; I, interferente; Q1, producto de interacción C-I; R, Reactivo; P producto de reacción (1 constituyente, 2 interferente, 3 producto de interacción).

protocolo para el estudio de las interferencias endógenas (2) de la SEQC se basa también en estos dos aspectos.

Los trabajos de Kroll (4,6) desarrollan una ecuación en la que se considera que la interferencia está en función de la concentración del constituyente, la concentración del interferente y la concentración del producto derivado de la reacción entre el constituyente y el interferente. En estos trabajos, se sugiere que los estudios de múltiples variables pueden ayudar a elucidar el mecanismo para determinar estos tipos de interferencia.

4 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

La teoría o modelo de interacciones gráficas (7), es una herramienta para resolver problemas combinatorios que ayudan a elucidar las diversas posibilidades para la combinación de las diversas especies químicas de interés en una determinada reacción. En esta técnica se representan las diversas especies químicas como nódulos y las posibles reacciones o interacciones entre ellas como líneas de conexión (figura 1). En una representación gráfica se ven las posibles combinaciones que se pueden hacer de estas especies químicas y su determinación analítica. La interacción entre el constituyente y el interferente da lugar a un compuesto que a su vez reacciona con otra sustancia y esta también es detectada y así sucesivamente. Las diferentes posibilidades que dan estos mecanismos de reacción están dadas por las permutaciones que dan los elementos que entran en juego (6).

Otra herramienta a emplear es la expansión de Taylor (8) que es un polinomio que sirve para representar linealmente cualquier función de orden n . Una vez que se traducen los efectos de los interferentes en una transformación matemática se pueden determinar qué coeficientes son estadísticamente significativos y cuales no; lo que conduce a poder diferenciar qué coeficiente estaría implicado en la formación de las interacciones y por tanto de las posibles interferencias. Supongamos que vamos a calcular la función $\phi(C, I)$, que relaciona al constituyente (C) y al interferente (I), esta función se obtendría a través de la siguiente ecuación matemática:

$$\phi(C, I) = \beta_0 + \beta_1 C + \beta_2 I + \beta_3 C \cdot I + \beta_{11} C^2 + \beta_{22} I^2$$

Donde cada uno de estos coeficientes se obtiene a través de derivadas parciales de la función $\phi(C, I)$ respecto a cada componente, constituyente (C) o interferente (I); es decir:

$$\beta_1 = \partial \phi / \partial C; \beta_2 = \partial \phi / \partial I; \beta_3 = \partial^2 \phi / \partial C \partial I; \beta_{11} = \partial^2 \phi / \partial C^2; \beta_{22} = \partial^2 \phi / \partial I^2$$

Los coeficientes de esta ecuación polinomial se pueden calcular mediante análisis de regresión múltiple, de modo que cada uno de los coeficientes se pueden interpretar como las pendientes de un elemento particular: constituyente (C), interferente (I) o bien de una determinada interacción: constituyente-interferente ($C-I$), interferente consigo mismo (I^2) y constituyente consigo mismo (C^2). Dado que las dos últimas interacciones en general son de poco significado y se dan raramente se puede efectuar una aproximación no teniéndolas en cuenta, es decir, suponiendo que: β_{11} y β_{22} son iguales a cero.

5 DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Descripción

Para la cuantificación de este tipo de interferencias se puede hacer la aproximación matemática (4,9) expuesta en el apartado anterior, y suponiendo que:

C = concentración del constituyente en estudio

I = concentración del interferente

$C \cdot I$ = producto aritmético de los dos o término de interacción constituyente/interferente, la función que relaciona a ambos es:

$$C = a + b C_0 + c I + d I C_0$$

Donde: C_0 = concentración inicial o teórica del constituyente en estudio,

C = concentración experimental o medida.

Y los coeficientes representan:

a = intersección de la regresión múltiple (ha de ser próximo a cero);

b = recuperación del constituyente (ha de ser próximo a uno),

c = término dependiente de la concentración del interferente y

d = término dependiente de la interacción $C-I$ (2,4).

Por consiguiente, el diseño experimental ha de ser una matriz ortogonal con concentraciones progresivamente crecientes del constituyente en estudio y del interferente.

5.2 Recomendaciones para la preparación de los especímenes

Utilizando sueros de personas que no estén tomando medicación se preparan mezclas base de especímenes (seis como mínimo) con concentraciones distintas y crecientes del constituyente en estudio.

Utilizando el interferente preparar, una solución primaria de interferente. (3)

Diluir la solución primaria de interferente con cada una de las mezclas base de especímenes (dilución 1:20), para obtener las muestra de referencia problema.

Preparar muestras testigo, diluyendo en la misma proporción (dilución 1:20) el disolvente del interferente con cada una de las mezclas base de especímenes.

Combinando las muestras de referencia problema (seis como mínimo) y las muestras testigo (otras seis) en distintas proporciones se preparan al menos cinco muestras problema que contendrán concentraciones crecientes de interferente para cada una de las mezclas base de especímenes.

5.3 Interferencia

Se obtienen treinta soluciones con concentraciones crecientes del constituyente y del interferente, las cuales se valorarán por quintuplicado (evitando las posibles contaminaciones del instrumento).

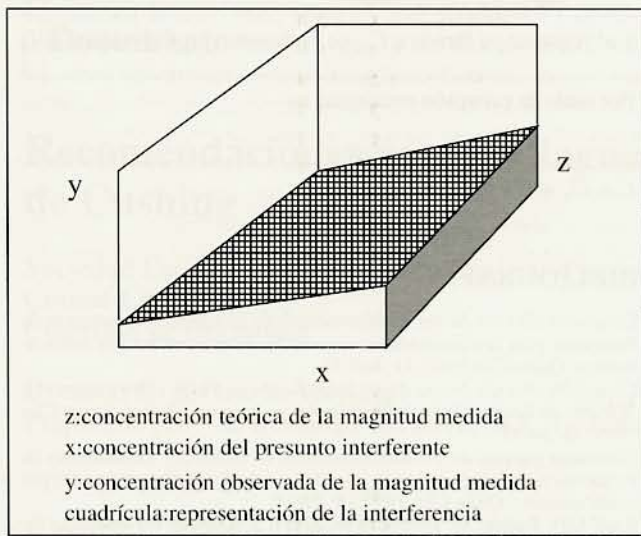


Figura 2. Representación gráfica de interferencias dependientes de la concentración del constituyente.

Se calcula la media para cada solución, C_i , y se ajusta al plano de regresión para calcular los coeficientes a , b , c , y d . Los coeficientes de esta ecuación polinomial se pueden calcular mediante análisis de regresión múltiple. Si el coeficiente d es distinto de cero, existe interferencia dependiente de la interacción constituyente - interferente, y si es cero no existe interferencia dependiente de la concentración del constituyente.

5.4 Representación gráfica, planos de regresión

La representación gráfica de interferencias dependientes de la concentración del constituyente, han de ser planos o superficies. En cuyos tres ejes (Z , X , Y), se reflejen la interferencia ($C - b C_o$), la concentración del constituyente en estudio C_o , y la concentración del interferente, I , respectivamente. (figura 2) (8).

5.5 Regresiones no planares

Si la representación gráfica del plano de regresión, obtenido con los coeficientes a , b , c y d , y de los resultados obtenidos experimentalmente, no se ajustan perfectamente, puede ser debido a que los datos experimentales formen una superficie no planar, a la cual se pueden ajustar los datos a través de ecuaciones logarítmicas, exponenciales, multiplicativas... etc o incluso pueden ser debidas a términos cuadráticos, como los indicados en la ecuación:

$$C = a + b C_o + c I + d I C_o + e I^2 + f C_o^2$$

que se suponían nulos en la ecuación indicada en 5.1, y cuya solución matemática es más compleja.

En conclusión, con los datos experimentales se debe buscar la curva de mejor ajuste en el espacio o hiperespacio, dependiendo del número de variables, bien con datos transformados o sin transformar.

6 EJEMPLO PRÁCTICO

Los siguientes datos se han desarrollado como un ejemplo de cómo se pueden llegar a calcular los coeficientes de las ecuaciones antes citadas.

Supongamos que después de preparar las soluciones antes indicadas y analizarlas cinco veces cada una de ellas, calculamos

las medias respectivas y obtenemos los resultados indicados en la tabla I.

Tabla I. Ejemplo práctico de interferencias constituyente dependiente

I	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5
0	100,0	120,0	140,0	160,0	200,0
5	107,5	128,5	149,5	170,5	212,5
10	115,0	137,0	159,0	181,0	225,0
15	122,5	145,5	168,5	191,5	237,5
20	130,0	154,0	178,0	202,0	250,0
30	145,0	171,0	197,0	223,0	275,0

Donde I indica las concentraciones crecientes de interferente, la C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 las concentraciones de las muestras problema.

El mejor procedimiento para resolver este problema es utilizar un programa informático del tipo Statgraphics, que directamente calcula y ajusta los datos a una ecuación cuadrática como la indicada en este documento, utilizando como variable dependiente C_i , y como variables independientes las tres siguientes: C_o , I , $C_o I$ (el producto de ambos).

Obteniéndose los siguientes resultados indicados en la tabla II:

Tabla II. Resultados del análisis de regresión múltiple del ejemplo de interferencia constituyente dependiente

	Coefficiente	error estándar	T	Significación
C_o	1,000090	0,000714	1400,6	0,000
I	0,499456	0,0066	75,4	0,000
$C_o I$	0,01002	0,0000	232	0,000

con un coeficiente de correlación de 0,999996 y de $F=3010206$, lo cual indica que estas tres variables contribuyen a la regresión, ya que es elevada para todos excepto para la ordenada, lo que indica que los datos cumplen la siguiente ecuación:

$$C_i = 0 + 1,00009 C_o + 0,499456 I + 0,01002 I C_o$$

eliminando cifras no significativas y redondeando la ecuación queda como:

$$C_i = C_o + 0,50 I + 0,01 C_o I$$

Utilizando este mismo programa estadístico podemos obtener una gráfica donde los ejes respectivamente son: eje X = C_o ; eje Y = I , eje Z = C_i y obtendríamos un plano de regresión.

Solución por aproximación. En el caso de carecer de estos programas, se puede efectuar un cálculo o estimación del siguiente modo:

Partiendo de la ecuación: $C = a + b C_o + c I + d I C_o$ y suponiendo constante cada $C_o i$, es decir:

$$C = (a + b C_{te}) + (c + d C_{te}) I$$

obtenemos la siguiente ecuación:

$$C = o_i + p_i I;$$

Donde $o_i = a + b C_{oi}$; y $p_i = c + d C_{oi}$

Por tanto, efectuando las regresiones de C contra I para las distintas C_o se obtendrán las siguientes ecuaciones:

$$C_1 = 100 + 1,5 I;$$

$$C_2 = 120 + 1,7 I;$$

$$C_3 = 140 + 1,9 I;$$

$$C_4 = 160 + 2,1 I;$$

$$C_5 = 200 + 2,5 I$$

$$C_i = O_i + p_i I$$

con las ordenadas (o_i) y pendientes (p_i), indicadas en la tabla III:

Tabla III. Ordenadas y pendientes parciales del ajuste por aproximación

C_{oi}	O_i	P_i
100	100	1,5
120	120	1,7
140	140	1,9
160	160	2,1
200	200	2,5

Al efectuar las regresiones de O_i frente a C_{oi} se obtienen los términos:

$$a = 0; \text{ y } b = 1;$$

y al regresar p_i frente a C_{oi} se obtienen, $c = 0,5$ y $d = 0,01$;

Por tanto la ecuación resultante es:

$$C = 0 + 1 C_o + 0,5 I + 0,01 C_o I$$

$$C = C_o + 0,5 I + 0,01 C_o I$$

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Comisión efectos de los medicamentos de la SEQC. Documento B. Protocolo para la valoración *in vitro* de las interferencias por medicamentos. Quim Clin 1992; 11: 449-52.
2. Comisión efectos de los medicamentos de la SEQC. Documento D. "Estudio de las interferencias endógenas en química clínica". Quim Clin 1994; 13: 84-92.
3. Comisión efectos de los medicamentos de la SEQC. Documento G. Protocolo para la valoración *in vivo* de las interferencias producidas por medicamentos. Quim Clin 1997;16: 210-3.
4. Kroll MH, Ruddle M, Blanck D W, Elin R J. A model for assessing interference. Clin Chem 1987; 33: 1121-3.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards Testing in Clinical Chemistry; proposed guidelines. NCCLS Publication EP7-P.Vilanova ,PA:NCCLS1986.
6. Kroll MH, Chesler R. Rationale for Using Regression Analysis with Complex Interferences. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992; 30: 415-24.
7. Gellert W, Krüstner H, Hellwich M, Kästner H. The VNR Concise Encyclopedia of Mathematics. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1977.p. 575-8.
8. Fulks W. Advanced Calculus, 2nd edn. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1977.p.259-61
9. Castaño Vidriales J L, Araquistain J L A. Interferencias causadas por la bilirrubina, hemoglobina y hemólisis en la determinación de 15 constituyentes séricos. Quim Clin 1989; 8: 47-55.

Correspondencia:
Comisión Interferencias y
Efectos de los Medicamentos
Bioquímica Clínica
SEQC
c/ Padilla 323-325, entlo. 4º
08025 Barcelona