

Corrección matemática de la interferencia por la hemoglobina en la determinación de la concentración sérica de hierro (II+III)

M.^aC. Cárdenas, I. Bonilla, R. Pérez, S. Díez, M.^aJ. Torrejón, G. Barberá

Resumen

La hemoglobina es causa de interferencia en la determinación de la concentración de hierro (II+III), para evitarla es necesario la obtención de un nuevo espécimen no hemolizado o bien su determinación teniendo en cuenta dicha interferencia a la hora de interpretar el resultado.

El objeto del trabajo fue el estudio y deducción de un sistema matemático de corrección de la interferencia por la hemoglobina en la determinación de la concentración sérica de hierro (II+III), por el método Ferrozine sin desproteinización en dos tipos de reactivos con y sin detergente en su composición.

Se encontró una interferencia clínicamente significativa en los dos casos. Con el reactivo que no llevaba detergente, esta interferencia fue dependiente de la concentración de hierro (II+III) y de hemoglobina. La interferencia fue positiva o negativa dependiendo de la concentración de la hemoglobina. Con el segundo tipo de reactivo (con detergente), la interferencia fue positiva e independiente de la concentración de hierro (II+III). Al aplicar esta corrección a especímenes de pacientes se obtuvieron buenos resultados.

En conclusión, la aplicación de la corrección matemática puede ser utilizada en la determinación de hierro (II+III) en especímenes hemolizados, en los cuales existe una interferencia clínicamente significativa y la obtención de un nuevo espécimen es difícil de realizar.

Introducción

La hemoglobina es una causa frecuente de interferencia en la determinación de varias magnitudes bioquímicas. La interferencia puede atribuirse a diferentes mecanismos tales como la liberación del contenido de los eritrocitos, interferencia espectral de la hemoglobina o reacción química de ésta o sus derivados (1). Una de las magnitudes afectadas es la concentración sérica de hierro (II+III). Además, esta determinación está sometida a otras causas de interferencia, como la presencia de proteínas (2) e iones cobre (II) (3). La interferencia por proteínas puede evitarse mediante precipitación con ácido tricloroacético, aunque los métodos más comúnmente utilizados la sustituyen por la adición de un detergente para obtener una mayor rapidez y automatización en la determinación. Los iones cobre (II) dan lugar a una sobreestimación de la concentración de hierro (II+III), siendo necesaria la adición en el reactivo de un agente complejante de cobre (tiosemicarbácida, tiourea) para evitarlo.

Summary

Hemoglobin causes interference in iron (II+III) determination. To avoid that, it is necessary to obtain a non hemolyzed sample or to take into account that interference prior to result interpretation.

The aim of this paper is the characterization and inference of mathematical correction of hemoglobin interference in the determination of iron (II+III) serum concentration as measured by the Ferrozine method without deproteinization, using two reagents with and without detergent in their composition.

We found a clinically significant interference using both reagents. In the case of the reagent without detergent the interference was dependent of the concentrations of both iron (II+III) and hemoglobin. The interference was positive or negative depending upon hemoglobin concentration. The interference was positive and iron (II+III) concentration independent in the case of the reagent with detergent. This correction applied to patients samples provided good results.

We conclude that mathematical correction can be used for iron (II+III) determination in hemolyzed samples, where a clinically significant interference exists and to obtain a new sample is difficult.

La llegada al laboratorio de un espécimen hemolizado en el cual debe realizarse la determinación de la concentración de hierro (II+III) supone el rechazo del mismo o bien su determinación teniendo en cuenta la posible interferencia en la interpretación del resultado. En ciertas poblaciones como la pediátrica o los adictos a drogas por vía parenteral, la frecuencia de especímenes hemolizados es alta y la obtención de un nuevo espécimen no suele realizarse por la dificultad de la extracción.

Una alternativa para la determinación de hierro (II+III) en especímenes hemolizados es la cuantificación y corrección matemática de la interferencia (1,4).

El objeto del trabajo es el estudio de la interferencia de la hemoglobina en la determinación de la concentración sérica de hierro (II+III) por el método Ferrozine con dos variantes (con y sin detergente), y la deducción de un sistema matemático de cuantificación de la interferencia.

Material y métodos

Especímenes

Se obtuvo una solución primaria de hemolizado a partir de un espécimen de sangre con EDTA, separando los hematíes

del plasma por centrifugación. Se lavaron los hematíes 3 veces con solución salina (concentración 0,15 mol/L) y tras el último lavado se añadió agua destilada para provocar la ruptura de la membrana, se congeló (y descongeló) a -30°C 3 veces. Posteriormente se centrifugó para eliminar restos celulares y se ajustó la concentración de hemoglobina a 35 g/L.

Para el estudio de interferencia se prepararon 4 mezclas de sueros de pacientes con 4 concentraciones diferentes de hierro (II+III) (5,4; 17,9; 26,8; 35,8 $\mu\text{mol/L}$). De cada mezcla se hicieron 2 series, una a la que se le añadieron cantidades crecientes de la solución primaria del hemolizado obteniendo unas concentraciones de hemoglobina de 0,5; 1; 1,5; 2; 4 y 6 g/L; y otra a la que se le añadió la misma cantidad del diluyente del hemolizado a la alícuota correspondiente. Esta serie se consideró de referencia. En todos los especímenes se determinó la concentración de hierro (II+III) por triplicado por las dos variantes del método, y la hemoglobina en la serie hemolizada. Se seleccionaron 21 especímenes de pacientes que presentaban en la misma extracción un espécimen de suero hemolizado y otro no, determinándose en ambos especímenes la concentración de hierro (II+III) y en el espécimen hemolizado la concentración de hemoglobina.

Instrumentación y reactivos

La determinación de la concentración de hemoglobina se realizó en un analizador BM/Hitachi 717 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania) mediante lectura bicromática a 415/450 nm (longitud de onda principal/ secundaria) de la mezcla de 20 μL de espécimen con 200 μL de solución salina fisiológica. Como calibrador se utilizó una dilución (1:200) de un espécimen de sangre (con EDTA) con agua destilada, valorado en un analizador hematológico Sysmex NE-8000 mediante el método de la cianometahemoglobina. La concentración sérica de hierro (II+III) se determinó en un analizador BM/Hitachi 747 (Boehringer Mannheim) por el método Ferrozine sin desproteinización. Se utilizaron dos tipos de reactivos siguiendo en ambos casos la metodología especificada por el fabricante (Boehringer Mannheim). La composición de los reactivos fue: Reactivo con detergente (ref. 1553739 R1, 1553747 R2) R1: Acetato sódico 150 mmol/L pH 5; Cloruro de guanidina 4 mol/L; Tiourea 100 mmol/L; Detergente. R2: Ferrozine $>1,7$ mmol/L; Ácido ascórbico >40 mmol/L. Reactivo sin detergente (ref. 1040880) R1: Acetato sódico 150 mmol/L pH 5; Clorhidrato de guanidina 4,5 mol/L; Tiourea 100 mmol/L; Ácido ascórbico. R2: Ferrozine 1,7 mmol/L.

Cálculo de la interferencia

La interferencia por la hemoglobina se expresó como error absoluto (calculado por la fórmula $C_i - C_o$, donde C_i es la concentración de hierro (II+III) en presencia de hemólisis y C_o la concentración de hierro (II+III) sin hemólisis) para poder aplicarse a las 4 concentraciones (5,6). Se tomó como interferencia clínicamente significativa cuando el valor de ésta superaba la mitad del coeficiente de variación biológica intraindividual de la concentración sérica de hierro (II+III)(4). La cuantificación de la interferencia se realizó mediante un análisis de correlación múltiple cuando ésta fue dependiente de la concentración de hierro (II+III), y por un análisis de regresión lineal (Passing y Bablok) cuando fue independiente (1,4).

Resultados

Se encontraron resultados diferentes para cada tipo de reactivo. En el caso del reactivo que no llevaba detergente se obtuvo una interferencia clínicamente significativa en las tres concentraciones inferiores, siendo ésta positiva para concentraciones altas de hemoglobina y negativa para concentraciones bajas. Esta interferencia fue dependiente de la concentración sérica de hierro (II+III) (figura 1) por lo que se cuantificó mediante un análisis de regresión múltiple con 3 variables independientes: 1) concentración de hierro

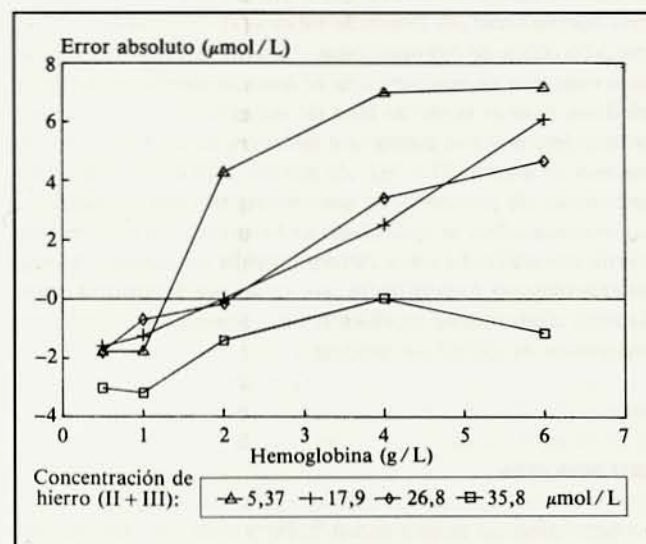


Figura 1. Efecto de la hemoglobina en la determinación de la concentración de hierro (II+III) con el reactivo sin detergente.

Tabla I. Parámetros de regresión múltiple y ecuación de corrección (reactivo sin detergente)

Variable	\bar{x}	ES	t	P
Variable dependiente: Fe observado ($r=0,993$, $F=494$, $P=0,0001$)				
Constante	-1,65	0,94	-1,75	0,0998
(Fe real)	0,97	0,03	26,31	0,0001
(Hb)	1,92	0,27	6,94	0,0001
(Fe real) (Hb)	-0,03	0,01	-3,18	0,0059
(Fe observado) = $-1,65 + 0,97$ (Fe real) + $1,92$ (Hb) - $0,03$ (Fe real) (Hb)				

Fe: concentración de hierro (II+III).

Hb: concentración de hemoglobina.

F: distribución F.

ES: desviación típica de la media.

t: t de Student.

(II+III); 2) concentración de hemoglobina y 3) el producto de ambas concentraciones, siendo la variable dependiente la concentración de hierro (II+III) en los especímenes hemolizados. Los parámetros de regresión múltiple, así como la ecuación resultante para calcular la concentración de hierro (II+III) real en los especímenes hemolizados, se muestran en la tabla I. En el caso del reactivo con detergente se encontró una interferencia positiva significativa para concentraciones de hemoglobina superiores a 0,5 g/L e independiente de la concentración de hierro (II+III) (figura 2).

Para el cálculo de la ecuación de corrección se aplicó una regresión lineal (Passing y Bablok) entre la concentración de hemoglobina (variable independiente) y el error absoluto (variable dependiente) (tabla II). Para explicar esta diferencia de comportamiento se estudió la primera parte de la reacción (antes de añadir el cromógeno) en ambos casos. Se observó una disminución de la absorbancia para el reactivo sin detergente a lo largo del tiempo, siendo estable en el otro caso (figura 3).

La tabla III muestra las concentraciones séricas de hierro (II+III) (determinadas con el reactivo con detergente) en especímenes de pacientes no hemolizados y en los hemolizados tras la aplicación de la ecuación de la tabla II.

Discusión

La hemólisis ha sido una interferencia en la determinación de la concentración sérica de hierro (II+III) que daba lugar a un rechazo del espécimen, ya que pequeñas cantidades de hemoglobina contribuían a un aumento importante en el contenido de hierro (II+III) en el mismo (1 mg de hemoglobina se une a 0,62 μmol de hierro). Los procedimientos basados en la absorción atómica miden todo el hierro contenido en el espécimen sea su origen hemoglobínico o no. Los actuales procedimientos que utilizan los colorantes complejantes de hierro (Batofenantrolina, Fereno o Ferrozine) presentan la ventaja de que en las condiciones de análisis no liberan el hierro unido a la hemoglobina, sin embargo cuando existe una marcada hemólisis o hay hemoglobina desnaturalizada existe una liberación de hierro significativa. Diversos autores han encontrado una fuerte interferencia positiva por la hemoglobina en la determinación de hierro (II+III) por el método Ferrozine (7), otros han encontrado aumentos del 6% para concentraciones de hemoglobina mayores a 0,5 g/L (8) y otros no han encontrado ninguna (9). Nuestros resultados muestran una interferencia positiva con ambos reactivos, que sobre todo en concentraciones de hierro (II+III) bajas podrían llevar a un error diagnóstico. Además, en el caso del reactivo sin detergente nos encontraríamos ante un doble mecanismo que produce una doble interferencia positiva y negativa, predominando un signo u otro en función de la concentración de hemoglobina. Al comparar el comportamiento de la primera parte de la reacción en ambos reactivos, se observa que para este caso existe una disminución de la absorbancia que podría explicar la interferencia negativa encontrada para bajas concentraciones de hemoglobina donde la cantidad de hierro liberado es mínima y la interferencia positiva se reduce.

Cuando utilizamos el reactivo con detergente, la interferencia encontrada es independiente de la concentración de hierro (II+III) lo que permite una cuantificación lineal de la misma. La regresión lineal presenta un buen coeficiente de correlación, y al aplicar la ecuación de corrección en especímenes de pacientes se obtienen buenas aproximaciones a la concentración real de hierro (II+III). Dada la menor y

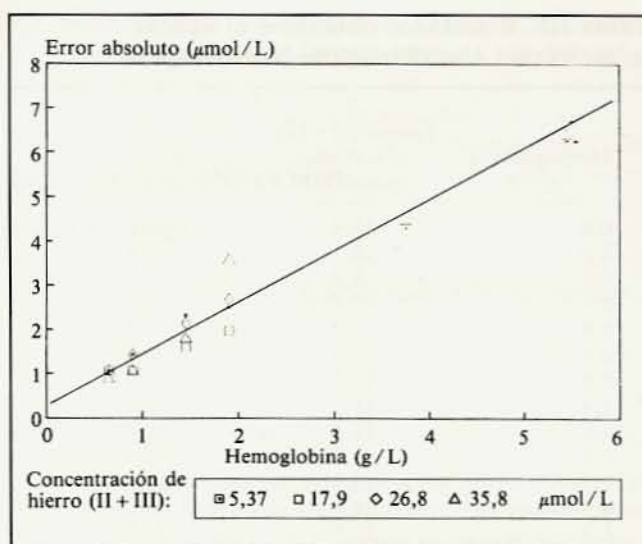


Figura 2. Efecto de la hemoglobina en la determinación de la concentración de hierro (II+III) con el reactivo con detergente.

Tabla II. Resultados de la regresión lineal y ecuación de corrección (reactivo con detergente)

Variable dependiente: Error absoluto ($r = 0,987$)		
Término	\bar{x}	ES
Intersección	0,238	0,100
pendiente	1,146	0,037
Error absoluto = $0,23 + 1,14 (\text{Hb})$		

ES: desviación típica de la media; Hb: hemoglobina.

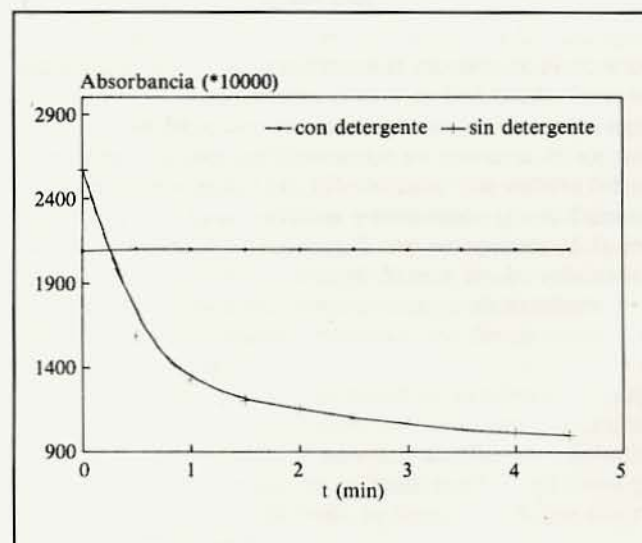


Figura 3. Variación de la absorbancia del hemolizado (concentración de hemoglobina inicial 4 g/L) en la primera parte de la reacción con ambos reactivos.

único mecanismo de interferencia con este tipo de reactivo, recomendamos su utilización.

En conclusión, la presencia de hemólisis en la determinación de la concentración de hierro (II+III) produce una interferencia, siendo más acusada cuando el reactivo utilizado no lleva incorporado un detergente. Esta interferencia puede ser cuantificada y corregida matemáticamente previa determinación de la concentración de la hemoglobina en el espécimen y conociendo la composición del reactivo utilizado. Su aplicación, sin embargo, debe reservarse a aque-

Tabla III. Resultados obtenidos al aplicar la corrección con el reactivo con detergente

Hemoglobina (g/L)	Hierro (II + III) observado ($\mu\text{mol/L}$)	Hierro (II + III) calculado ($\mu\text{mol/L}$)
0,6	13,4	13,1
2,0	14,3	14,8
0,8	8,9	10,0
0,8	17,7	18,4
0,8	7,0	7,5
0,6	12,7	12,7
1,5	27,3	27,9
1,4	15,2	16,4
0,9	41,5	42,6
1,3	17,9	18,6
1,4	19,7	21,5
0,5	24,9	25,2
1,2	22,7	21,8
1,9	9,3	8,6
0,7	16,1	17,0
0,7	22,4	22,9
0,8	21,5	21,3
1,5	9,5	9,1
1,9	14,7	15,7
0,5	20,6	20,2
0,7	8,6	8,9

llos especímenes donde la obtención de uno nuevo, no hemolizado, presente dificultades.

Correspondencia:
M^º Cruz Cárdenas Fernández
Centro de Especialidades Avda. de Portugal
Servicio de Análisis Clínicos
Avda. Portugal, 155
28011 Madrid

Bibliografía

- Jay DW, Provasek D. Characterization and mathematical correction of hemolysis interference in selected Hitachi 717 assays. *Clin Chem* 1993; 39: 1804-10.
- Bakker AJ. Influence of monoclonal immunoglobulins in direct determinations of iron in serum. *Clin Chem* 1991; 37: 690-4.
- Bakker AJ, Lerk R et al. Determining iron without copper interference from carryover of total protein reagent in Hitachi analyzers. *Clin Chem* 1988; 34: 2376.
- Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comisión Efectos de los medicamentos. Documento D. Estudio de las interferencias analíticas endógenas en química clínica. *Quim Clin* 1994; 13: 84-92.
- Kroll MH, Ruddel M, Blank DW, Elin RJ. A model for assessing interference. *Clin Chem* 1987; 33: 1121-3.
- Kroll MH, Chesler R. Rationale for using multiple analysis with complex interferences. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30: 415-24.
- Valcour AA, Krzymowski G et al. Proposed reference method for iron in serum used to evaluate two automated iron methods. *Clin Chem* 1990; 36: 1789-92.
- Derman DP, Green A et al. A systematic evaluation of batho-phenanthroline, ferrozine and ferene in an ICSH-based method for the measurement of serum iron. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 144-7.
- Castaño Vidriales JL, Araquistain JLA. Interferencias causadas por la bilirrubina, hemoglobina y hemólisis en la determinación de 15 constituyentes sericos. *Quim Clin* 1989; 8: 47-55.