

Estudio de la interferencia por hemólisis en la determinación de bilirrubina total*

Hemolysis interference study in determination of total bilirubin

Estudo da interferência por hemólise na determinação de bilirrubina total

- Luciana Carmen Eik¹, María Guillermina Buscetti², Ignacio María Di Camillo², Yanina Soledad Medina¹, Paola Di Pinto², Erica Minghetti², Daniela Obando², María Pía Díaz Weiss², Mara Garri Zaccaria², Daniela Rocha², Alejandra Gutiérrez¹, Ezequiel Hernán Rementa¹

1. Bioquímico/a.

2. Licenciado/a en Bioquímica.

* Residencia de Bioquímica. Laboratorio Central. H.I.G.A. "Gral. San Martín" de La Plata. Calle 1 y 70. 1900 La Plata, Argentina.

Resumen

La hemólisis es una causa frecuente de rechazo de muestras que genera un sesgo negativo en la determinación de bilirrubina total (BT). Los objetivos de este trabajo fueron determinar el grado de hemólisis (GH) para reemplazar la inspección visual subjetiva, establecer la magnitud de su interferencia y conocer la concentración inicial de hemoglobina a partir de la cual se produce interferencia clínicamente relevante (ICR). Se recolectaron sueros con diferentes concentraciones de BT. Se preparó un hemolizado para generar distintas concentraciones de interferente. Se cuantificó la BT mediante el método de diclorofenildiazonio en los sueros con las diferentes concentraciones de hemoglobina y se determinó GH midiendo absorbancia a 578 nm. Se consideró ICR cuando se superó la máxima inexactitud deseable. Para cada nivel de BT se determinó la concentración de hemoglobina máxima aceptable ($CHb_{m\acute{a}x}$ aceptable) por sobre la cual se considera ICR. La Abs₅₇₈ permitió definir cuatro GH (GH1, GH2, GH3 y GH4). A partir de los interferogramas se determinó la $CHb_{m\acute{a}x}$ aceptable para cada nivel de BT; ésta mostró un aumento lineal con la BT. A partir de 14,8 mg/dL de BT no se encontró ICR en los rangos estudiados. El GH permite tomar conductas objetivas ante muestras hemolizadas según el algoritmo propuesto.

Palabras clave: bilirrubina * interferencia * hemólisis * hemoglobina

Abstract

Hemolysis is a common cause for rejection of samples that generates a negative bias in total bilirubin (TB) determination. The objectives of this study were to determine the hemolysis degree (HD) to replace the subjective visual inspection, to establish the extent of their interference and to meet the initial hemoglobin concentration from which clinically relevant interference (CRI) occurs. Sera was collected at different TB concentrations.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Hemolysate was prepared to generate different concentrations of interfering. TB was quantified by dichlorophenyldiazonium method in sera with several hemoglobin concentrations, and DH was determined by measuring absorbance at 578 nm (Abs578). CRI was considered when it exceeded the maximum desirable inaccuracy. For each TB level, the maximum acceptable concentration of hemoglobin ($CHb_{m\acute{a}x}$ acceptable) above which ICR is considered was determined. The Abs578 made it possible to define four DH (DH1, DH2, DH3 and DH4). The $CHb_{m\acute{a}x}$ acceptable was determined for each level of TB from the interferograms; it showed a linear increase with TB. From 14,8 mg/dL BT, CRI was not found in the ranges studied. The DH makes it possible to have objective behaviours in hemolyzed samples according to the proposed algorithm.

Keywords: bilirubin * interference * hemolysis * hemoglobin

Resumo

A hemólise é uma causa frequente de rejeição de amostras que gera um viés negativo na determinação da bilirrubina total (BT). Os objetivos deste estudo foram: determinar o grau de hemólise (GH) para substituir a inspeção visual subjetiva, estabelecer a extensão da sua interferência e conhecer a concentração inicial de hemoglobina a partir da qual ocorre a interferência clinicamente relevante (ICR). Foram coletados soros com diferentes concentrações de BT. Um hemolisado foi preparado para gerar diferentes concentrações de interferente. Foi quantificada a BT pelo método de diclorofenil diazônio nos soros com as diferentes concentrações de hemoglobina e foi determinado o GH medindo a absorvância a 578 nm (Abs578). ICR foi considerada quando se superou a máxima inexistência desejável. Para cada nível de BT foi determinada a concentração de hemoglobina máxima aceitável (CHb_{Max} aceitável) acima da qual é considerada ICR. A Abs578 permitiu definir quatro GH (GH1, GH2, GH3 e GH4). A partir dos interferogramas se determinou a CHb_{Max} aceitável para cada nível de BT; ela apresentou um aumento linear com a BT. A partir de 14,8 mg/dL de BT, a ICR não foi encontrada nos intervalos estudados. O GH permite ter condutas objetivas diante de amostras hemolisadas de acordo com o algoritmo proposto.

Palavras-chave: bilirrubina * interferência * hemólise * hemoglobina

Introducción

La interferencia es uno de los problemas más complejos y persistentes en las determinaciones de laboratorio. La hemólisis, la hiperbilirrubinemia y la hiperlipemia son las causas que más frecuentemente producen interferencias espectrales o químicas, modificando cuantitativamente el resultado final (1).

Se denomina hemólisis al proceso de destrucción de los hematíes que produce la liberación de sustancias intracelulares al plasma circundante, siendo el principal componente intracelular liberado la hemoglobina (2).

El grado de hemólisis (GH) se puede clasificar, según algunos autores, como ligero cuando la hemoglobina está presente en una concentración menor a 0,05 g/dL, intermedio si está entre 0,05 y 0,30 g/dL y alto si es mayor a 0,30 g/dL (3).

La hemoglobina tiene un espectro de absorción que comienza alrededor de los 340 nm con un pico característico en 405 nm y varios picos entre 500-600 nm, siendo los principales a 542 nm y 577 nm, lo que produce un color rojizo en el plasma o suero de una muestra hemolizada, cuya intensidad es proporcional a la hemoglobina liberada (2).

En la determinación de la bilirrubina total (BT) donde el método se basa en la formación de un azocompuesto de color rojo que absorbe a 546 nm, los picos de la hemoglobina presentes en esta longitud de onda generan un sesgo negativo en la medición.

Se define hiperbilirrubinemia como el aumento de BT sérica por encima del valor de referencia de la población y cuando es mayor a 2,5 mg/dL se evidencia clínicamente la ictericia. Ésta consiste en la coloración amarillenta en piel, escleras y mucosas y es una de las presentaciones más comunes de los pacientes con enfermedades hepáticas y biliares.

En el recién nacido, se utilizan nomogramas ajustados por edad en horas de vida y la presencia o ausencia de factores de riesgo adicionales para establecer un nivel umbral de bilirrubinemia. En función de esto se determina la conducta terapéutica a seguir, ya sea fototerapia o exanguinotransfusión (4).

En el laboratorio la hemólisis es una causa frecuente de rechazo de muestras. Las procedentes del Servicio de Neonatología suelen presentar esta característica debido a la dificultad en la extracción de sangre. El porcentaje de muestras hemolizadas descrito en diversos estudios es muy variable y se encuentra entre 0,05 y 3,30% (3-5).

Frente a la detección visual de hemólisis es criterio de calidad del laboratorio que las muestras sean rechazadas, solicitando una nueva extracción. Sin embargo, es frecuente que las muestras de Neonatología se procesen sin medir el grado de interferencia y sin evaluar si dicha interferencia es clínicamente relevante. En estos casos sólo se procede a alertar sobre el estado de la muestra en la emisión del resultado.

La OMS, en base a recomendaciones de la Sociedad Alemana de Química Clínica, define interferencia clínicamente relevante (ICR) cuando supera el error sistemático deseable. Varios estudios reportados utilizan este mismo criterio (6-7).

Por lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron:

- Estudiar el efecto causado por la hemólisis en la determinación de BT por procedimientos automatizados y establecer cuantitativamente su magnitud.
- Determinar el GH para reemplazar la inspección visual subjetiva.
- Conocer la concentración inicial de hemoglobina a partir de la cual se produce ICR.

Materiales y Métodos

SUEROS

Se tomaron muestras de sangre por punción venosa a sujetos de ambos sexos sin importar la edad, recogidas en tubos BD Vacutainer SST™ Gold Hemogard™ closure con activador de coagulación y gel separador del suero. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos y se determinó la concentración de BT sérica mediante el método diclorofenildiazonio (DPD) utilizando el reactivo Bilirrubina Total AA línea líquida, calibrado con calibrador A plus, ambos de Wiener lab. en un autoanalizador Wiener lab. BT 3000 PLUS, origen Roma-Italia. El coeficiente de variación de la técnica es 1,49% (\bar{X} =11,82 mg/dL, DE=0,18). Para evaluar el desempeño analítico se realizó un control de calidad interno (controles Standatrol S-E 2 niveles de Wiener Lab.) y el laboratorio participó de un programa de evaluación externa de calidad (PEEC, Fundación Bioquímica Argentina).

Se escogieron sueros con diferentes concentraciones de BT y se agruparon en rangos para formar *pooles* con niveles de BT desde valores normales hasta patológicos ajustados a los valores de decisión clínica según la población (B1: 0,38; B2: 1,10; B3: 1,97; B4: 2,87; B5: 4,86; B6: 9,36; B7: 14,8; B8: 15,44; B9: 19,94; B10: 24,7mg/dL). Los sueros utilizados estaban libres de hemólisis y lipemia. Para evitar la degradación de la bilirrubina por efecto de la luz se cubrieron los tubos de trabajo con papel aluminio hasta su procesamiento. Luego de conformados los *pooles de sueros* se cuantificó la concentración basal de BT.

PREPARACIÓN DEL HEMOLIZADO

Se escogieron dos muestras al azar tomadas por punción venosa en tubos plásticos de 4 mL BD Vacutainer® Lavender Hemogard™ closure con EDTA dipotásico aerosol-desechado 7,2 mg. Se tomó un volumen de 6 mL de una mezcla de las dos muestras y se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos. Se desechó el plasma y se lavó el paquete eritrocitario con 2 mL de solución salina isotónica (0,9% p/v) por inversión. Se centrifugó nuevamente a 1.500 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió en 4 ocasiones. En el último lavado se desechó el sobrenadante y se adicionaron al paquete eritrocitario 3 mL de agua destilada, agitándose vigorosamente con vortex durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sedimento y se cuantificó en el sobrenadante la concentración de hemoglobina libre en el Analizador Hematológico Wiener lab. Counter 19.

El equipo fue calibrado con calibrador WL 19 Cal AA y para evaluar el desempeño analítico se realizó un control de calidad interno (WL 19 Con AA 3 niveles) y el laboratorio participó de un programa de evaluación externa de calidad (PEEC, Fundación Bioquímica Argentina).

Con el hemolizado se prepararon cuatro soluciones de hemoglobina de 4,0; 2,0; 1,0 y 0,5 g/dL utilizando como disolvente solución fisiológica. Posteriormente se generaron *in vitro* diferentes niveles de interferencia agregando a los *pooles* de sueros con los diferentes niveles de BT las soluciones del hemolizado en una proporción de 1/20. Se admitió esta dilución de hasta un máximo de 5% v/v, ya que es importante que la distorsión de las propiedades físicas y químicas de los especímenes estudiados sea mínima, para que su comportamiento sea similar al de los especímenes de los pacientes.

De esta manera se obtuvieron cuatro niveles de interferencia: 0,200; 0,100; 0,050 y 0,025 g/dL de hemoglobina. Además, se generó la misma dilución del *pool* de sueros con solución fisiológica (en lugar del hemolizado), la cual se consideró como concentración basal del analito, sin interferencia. Cada una de estas diluciones se realizó por triplicado.

DETERMINACIÓN DE LA INTERFERENCIA

Se cuantificaron los niveles de BT mediante el método de DPD en un autoanalizador Wiener lab BT 3000 PLUS en los sueros con las diferentes concentraciones del interferente.

EVALUACIÓN DE LAS INTERFERENCIAS

Se realizó el análisis de los interferogramas mediante el método de Glick *et al.* (8), expresándose los resultados como un porcentaje del resultado original. Para ello, se graficó la relación C/C_0 (%) frente a la concentración del interferente (hemoglobina), donde C_0 es la concentración inicial del analito (BT) sin interferente y C , la con-

concentración medida experimentalmente del constituyente en estudio para cada nivel de interferente.

Como criterio de interferencia por hemólisis se consideraron las actuales especificaciones de calidad analítica para la máxima inexactitud deseable (MID), derivada de la variación biológica intraindividual (CV_{intra}) e interindividual (CV_{inter}), en base a lo establecido por la OMS.

Para la BT la MID (%) = $0,25 (CV_{intra}^2 + CV_{inter}^2)^{1/2} = 8,95\%$ (9).

Por lo tanto, la relación C/C_0 (%) que se corresponde con la MID es de 91,05%.

Se consideró a la interferencia como clínicamente relevante cuando fue superior a la MID.

Se definió:

- Interferencia nula (clínicamente no relevante): porcentaje de variación menor a la MID.
- Interferencia moderada: porcentaje de variación entre la MID y el 20% del valor inicial.
- Interferencia elevada: porcentaje de variación superior al 20% del valor inicial.

Se definió la concentración máxima de hemoglobina aceptable ($CHb_{máx}$ aceptable), como la concentración inicial de hemoglobina a partir de la cual se encontró ICR.

DETERMINACIÓN DEL GRADO DE HEMÓLISIS

La estimación del GH se llevó a cabo midiendo la absorbancia de la hemoglobina libre a una longitud de onda de 578 nm (Abs_{578}) sobre el total de alícuotas de suero estudiadas ($n=150$) que correspondieron a los 10 niveles de BT, cada uno con 5 niveles de hemoglobina y que fueron procesadas por triplicado.

Se programó el autoanalizador Wiener lab. BT 3000 PLUS para que realizara previamente una dilución 1/6 de la muestra en solución fisiológica para alcanzar el mínimo volumen requerido por el equipo empleando un escaso volumen de muestra. La elección de la longitud de onda de 578 nm tuvo en cuenta el rango espectral de la hemoglobina que se extiende desde 500 a 600 nm evitando el solapamiento con la absorbancia de la BT.

Se calculó el coeficiente de variación (CV) del método obteniéndose los siguientes resultados: 1,83% ($\bar{X}=0,37$, $DE=0,01$).

La exactitud no fue evaluada por no disponer de soluciones de referencia en los niveles de hemoglobina estudiados.

Los cálculos y gráficas fueron realizados con la hoja de cálculo Excel 2000, Microsoft.

Resultados

a) Efecto de la hemólisis en la determinación de BT

En la Tabla I se describe el porcentaje de variación medio que permite clasificar a la interferencia como

nula, moderada o elevada. El nivel B4 quedó excluido del estudio por presentar turbidez.

Se observa que a medida que se incrementa el GH el porcentaje de variación aumenta. Exceptuando los niveles B1, B7 y B10, el análisis de regresión lineal indicó la existencia de una correlación estadísticamente significativa ($r^2 > 0,90$) entre los porcentajes de variación y el interferente presente.

Los resultados mostraron que la presencia de hemoglobina produce una interferencia negativa en la determinación de BT.

Las Figuras 1, 2 y 3 muestran los interferogramas que representan el porcentaje de variación medido en función de la concentración de hemoglobina. Para graficarlos se agruparon los niveles de bilirrubina según las categorías de interferencia citadas. Las líneas horizontales muestran el límite de error; la continua corresponde a la ausencia de interferencia, la discontinua indica la MID a partir de la cual el error se definió como moderado y finalmente la punteada representa el porcentaje a partir del cual el error es elevado ($>20\%$).

b) Determinación del GH para reemplazar la inspección visual subjetiva

Los valores de absorbancia obtenidos del total de sueros estudiados ($n=150$) se agruparon en función del nivel de hemólisis generado artificialmente (Tabla II). Dado que la distribución de datos no fue normal, se determinaron los cuartiles q_1 y q_3 (25% y 75% respectivamente) para calcular los valores marginales según las siguientes ecuaciones (10):

$$\text{Límite superior} = q_3 + 1,5 (q_3 - q_1)$$

$$\text{Límite inferior} = q_1 - 1,5 (q_3 - q_1)$$

Luego de eliminar los valores marginales, se determinaron los intervalos de absorbancia para cada concentración de hemoglobina. En la Tabla II se muestran estos intervalos junto con las correspondientes imágenes que representan la determinación de hemólisis por inspección visual (imágenes propias obtenidas durante el ensayo).

Debido a que los 3 primeros grados de hemólisis mostraron superposición de las absorbancias, se los consideró indistinguibles por esta técnica y se los reagrupó definiendo:

GH1: grado de hemólisis 1 ($Abs < 0,15$)

GH2: grado de hemólisis 2 ($Abs: 0,16-0,23$)

GH3: grado de hemólisis 3 ($Abs: 0,24-0,41$)

GH4: grado de hemólisis 4 ($Abs > 0,42$)

c) Concentración inicial de hemoglobina a partir de la cual se produce ICR

A partir de los interferogramas obtenidos se determinó la concentración de hemoglobina que generó un porcentaje de variación mayor o igual a la MID. Esto indica la concentración de hemoglobina máxima aceptable ($CHb_{máx}$ aceptable) a partir de la cual se observa ICR (Tabla III).

Tabla I. Interferencia por hemólisis en la determinación de BT para distintos niveles de hemoglobina. Relación C/C₀ (%) y porcentaje de variación medio.

Hb (g/dL)	0		0,025		0,050		0,100		0,200		r ²
BT (mg/dL)	C/C ₀ (%)	PORCENTAJE DE VARIACIÓN (%)	C/C ₀ (%)	PORCENTAJE DE VARIACIÓN (%)	C/C ₀ (%)	PORCENTAJE DE VARIACIÓN (%)	C/C ₀ (%)	PORCENTAJE DE VARIACIÓN (%)	C/C ₀ (%)	PORCENTAJE DE VARIACIÓN (%)	
B1:0,38	100	0	82	18 (I-M)	79	21 (I-E)	81	19 (I-M)	72	28 (I-E)	0,60
B2:1,10	100	0	92	8	89	11 (I-M)	83	17 (I-M)	70	30 (I-E)	0,97
B3:1,97	100	0	94	6	93	7	83	17 (I-M)	76	24 (I-E)	0,95
B4:2,82*	100*	0*	95*	5*	83*	17*	84*	16*	78*	22*	*
B5:4,8	100	0	96	4	93	7	92	8	82	18 (I-M)	0,96
B6:9,36	100	0	98	2	97	3	94	6	88	12 (I-M)	0,99
B7:14,8	100	0	99	1	97	3	92	8	93	7	0,70
B8:15,44	100	0	99	1	98	2	97	3	92	8	0,98
B9:19,94	100	0	101	1	100	0	97	3	92	8	0,95
B10:24,7	100	0	100	0	100	0	99	1	98	2	0,78

C₀: Concentración inicial del analito (BT) sin interferente.
 C: Concentración medida experimentalmente del constituyente en estudio para cada nivel de interferente.
 Hb: Hemoglobina.
 BT: Bilirrubina total.
 * Se eliminó del estudio por presentar turbidez.
 I-M (INTERFERENCIA MODERADA): porcentaje de desvío mayor a la máxima inexactitud deseable y menor a 20% del valor inicial.
 I-E (INTERFERENCIA ELEVADA): porcentaje de desvío mayor al 20% del valor inicial.

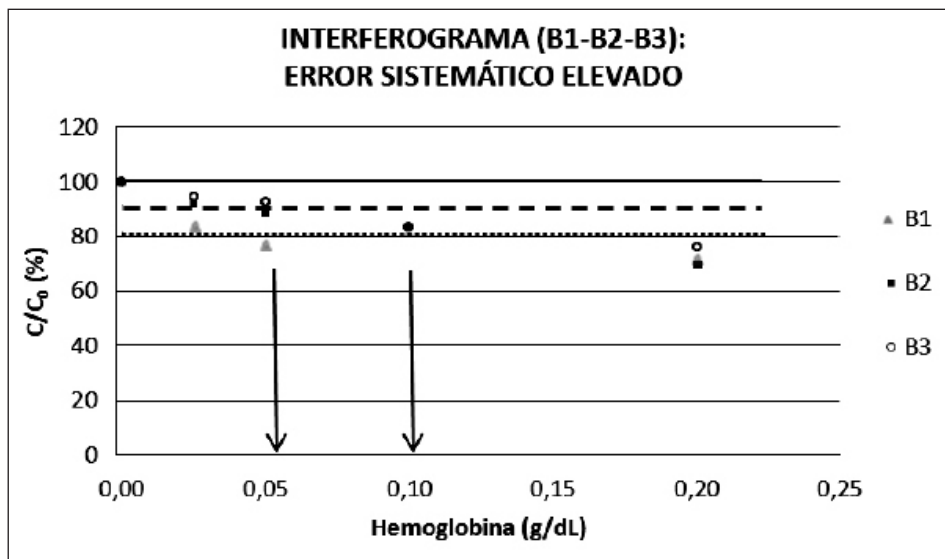


Figura 1. Interferograma para las concentraciones B1, B2 y B3 de bilirrubina total que presentan error sistemático elevado. B1 presentó interferencia para todas las concentraciones de hemoglobina estudiadas. Los niveles B2 y B3 no mostraron interferencia clínicamente relevante a concentraciones menores o iguales de 0,05 g/dL y 0,10 g/dL de hemoglobina respectivamente. — C/C₀ (%) = 100% (Ausencia de interferencia), - - C/C₀ (%) = 91,05% (MID), ... C/C₀ (%) = 80% (límite para interferencia igual al 20% del valor inicial).

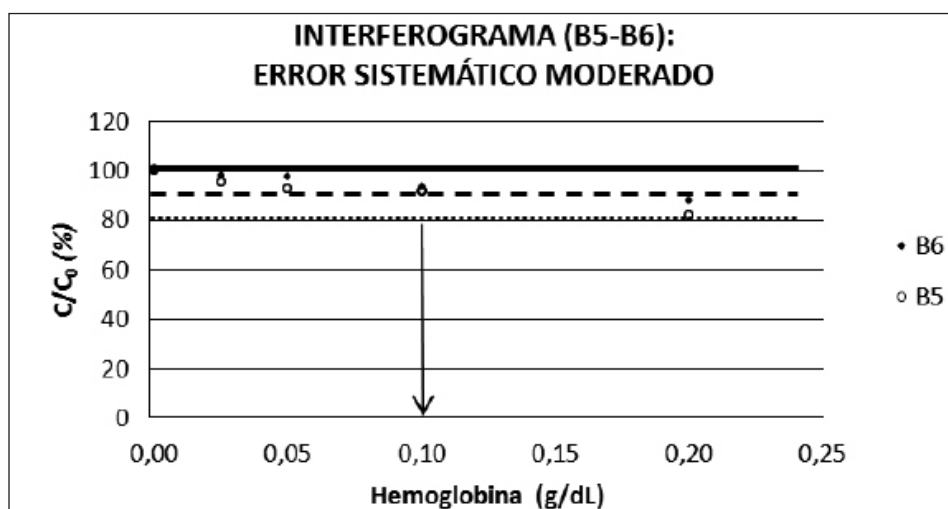


Figura 2. Interferograma para las concentraciones B5 y B6 de bilirrubina total que presentan error sistemático moderado. Se observa que para estos niveles no hay interferencia clínicamente relevante a concentraciones menores o iguales de 0,10 g/dL de hemoglobina. — $C/C_0(\%) = 100\%$ (Ausencia de interferencia), -- $C/C_0(\%) = 91,05\%$ (MID), ... $C/C_0(\%) = 80\%$ (límite para interferencia igual al 20% del valor inicial).

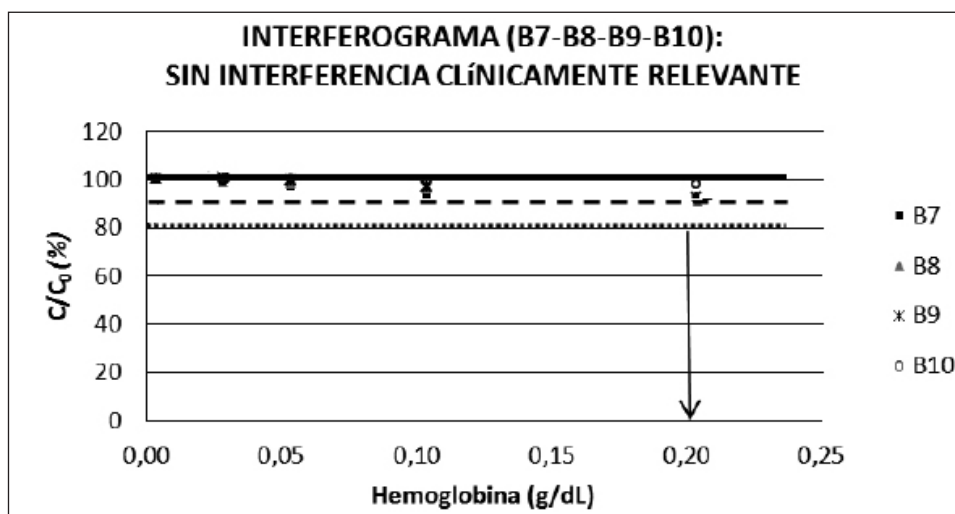


Figura 3. Interferograma para las concentraciones B7, B8, B9 y B10 de bilirrubina total que no presentan interferencia clínicamente relevante. Para estos niveles de bilirrubina la interferencia es clínicamente no relevante hasta 0,20 g/dL de hemoglobina. — $C/C_0(\%) = 100\%$ (Ausencia de interferencia), -- $C/C_0(\%) = 91,05\%$ (MID), ... $C/C_0(\%) = 80\%$ (límite para interferencia igual al 20% del valor inicial).

Se encontró que los valores de $CHb_{m\acute{a}x}$ aceptable aumentan linealmente con la concentración de BT ($r^2=0,9641$, $p<0,001$), es decir que a medida que se incrementa el nivel del analito estudiado, también lo hace el nivel de hemólisis aceptable (Fig. 4).

Discusión y Conclusiones

La interferencia por muestras hemolizadas es muy frecuente y es una problemática que afecta a todos los laboratorios. Es importante aplicar criterios de calidad y conocer el grado de interferencia para poder tomar conductas, ya

sea informando correctamente un resultado con el menor error posible o bien rechazando una muestra.

El estudio de valoración de interferencia por hemólisis debe realizarse con una muestra que tenga una concentración del analito próxima a los valores de decisión clínica. En algunos casos, el efecto de la interferencia no solo depende de la concentración de la sustancia interferente, sino también de la concentración del analito, en este caso la bilirrubina.

La mayoría de los actuales autoanalizadores tiene la capacidad de detectar la hemólisis en las muestras de suero mediante índices séricos que se correlacionan

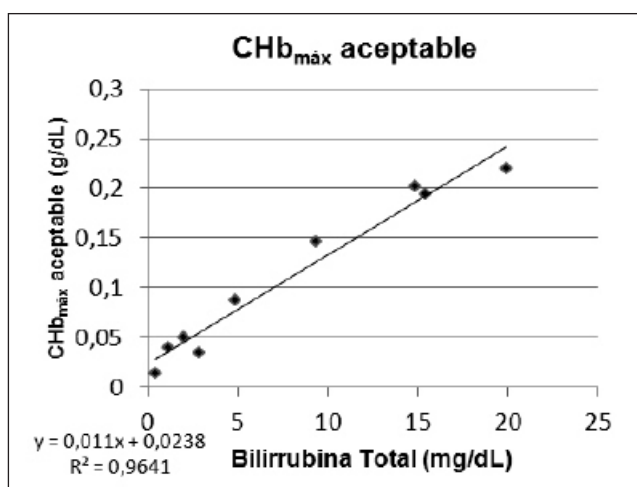


Figura 4. Relación entre la $CHb_{m\acute{a}x}$ aceptable y el nivel de bilirrubina total.

Tabla II. $CHb_{m\acute{a}x}$ aceptable para cada nivel de bilirrubina estudiado.

Inspección visual					
Concentración de Hb (g/dL)	0	0,025	0,05	0,10	0,20
Hemólisis cualitativa	-	-/+	+	++	+++
Intervalo de Absorbancia a 578 nm	0-0,13	0,05-0,15	0,08-0,15	0,16-0,23	0,24-0,41
Grado de hemólisis	GH1			GH2	GH3

Tabla III. Grado de hemólisis (GH).

BT (mg/dL)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
	0,387	1,107	1,97	2,827	4,857	9,363	14,817	15,443	19,94	24,7
$CHb_{m\acute{a}x}$ aceptable (g/dL)	0,014	0,040	0,050	0,035	0,087	0,147	0,202	0,194	0,220	>0,250

linealmente con las concentraciones del interferente. Los índices pueden ser usados para detectar la interferencia generando tablas de tolerancia. En nuestro medio, a pesar de contar con estos equipos, no se hace uso de esta tecnología por desconocimiento o por la excusa de consumo de tiempo de proceso del analizador y necesidad de reactivos específicos en algún caso (6) (11) (12).

Analizando los resultados obtenidos se observó que en numerosas situaciones la hemólisis produjo un error superior a la MID, lo cual indica que la interferencia por hemólisis es clínicamente relevante siendo necesaria la solicitud de una nueva muestra. Esto genera inconvenientes en el Servicio de Neonatología debido a la dificultad en la extracción sanguínea y a la complejidad

propia de sus pacientes. Por lo anterior se plantea la necesidad de minimizar el rechazo de muestras evaluando la importancia de la interferencia en la determinación, para lo cual la inspección visual de la hemólisis es insuficiente. Según lo reportado en bibliografía la misma es mínimamente visible a partir de 0,02 g/dL y es fiable a partir de 0,15 g/dL(6). Por este motivo no se consideró necesario estudiar concentraciones de interferentes mayores a 0,20 g/dL. Sin embargo, se puede decir desde la experiencia de los autores que la hemólisis comienza a ser visible a partir de los 0,10 g/dL de hemoglobina. Dada la subjetividad de esta observación sería apropiado medir la absorbancia a 578 nm para estimar el GH y a partir de este dato tomar diferentes

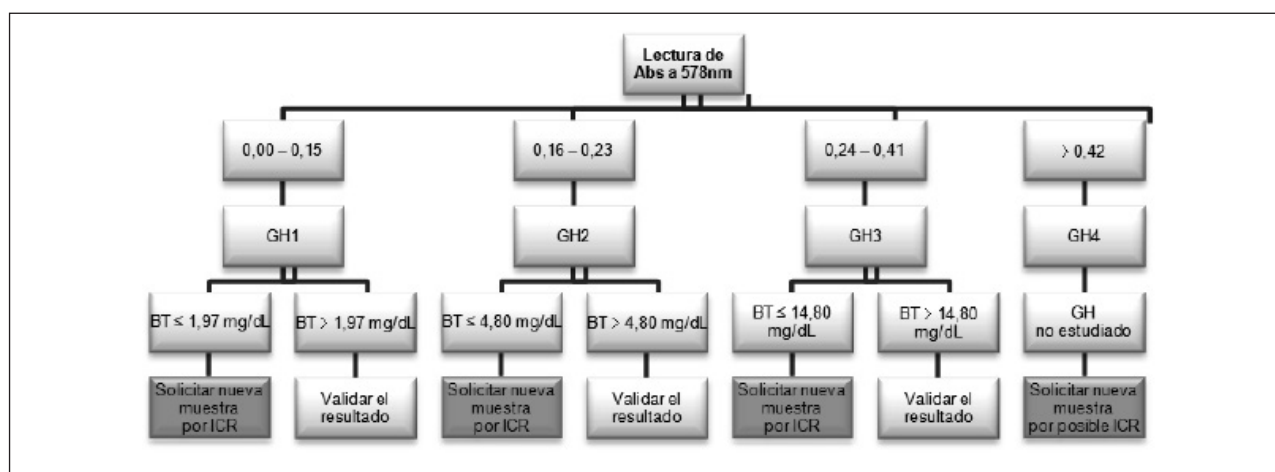


Figura 5. Algoritmo de trabajo propuesto para el procesamiento de muestras con solicitud de determinación de bilirrubina total.

conductas. Frente a la recepción de muestras para la determinación de BT se propone un algoritmo de trabajo (Fig. 5).

En primer lugar determinar el GH y en función de la absorbancia medida clasificarlo en GH1, GH2, GH3 o GH4. Luego realizar la medida de BT y validar el resultado según los siguientes criterios:

- Si la muestra presenta un GH1 sólo se podrán validar valores de BT mayores a 1,97 mg/dL. En caso contrario se deberá solicitar nueva muestra por presentar ICR (Tabla I).
- Si la muestra presenta un GH2 sólo se podrán validar valores de BT mayores a 4,80 mg/dL. En caso contrario se deberá solicitar nueva muestra por presentar ICR (Tabla I).
- Si la muestra presenta un GH3 sólo se podrán validar valores de BT mayores a 14,80 mg/dL. En caso contrario se deberá solicitar nueva muestra por presentar ICR (Tabla I).
- Si la muestra presenta un GH4 no se podrá validar el resultado de BT. Se deberá solicitar nueva muestra por posible ICR (GH no estudiado).

El seguimiento del algoritmo de trabajo propuesto permitiría minimizar el rechazo de muestras provenientes de Neonatología que habitualmente presentan valores altos de BT. De esta manera se reducirían las molestias ocasionadas a los pacientes de este servicio y se disminuiría el trabajo del personal responsable de la toma de muestra optimizando los recursos humanos e insumos.

Para poder utilizar la $CHb_{m\acute{a}x}$ aceptable como criterio de aceptación o rechazo de muestras sería necesario contar con métodos estandarizados para medir hemoglobina a bajas concentraciones. Ante la ausencia de una técnica con dichas características puede ponerse a punto la medida de absorbancia para la determinación del GH. Esta herramienta tiene la ventaja de ser operativa-

mente sencilla, aplicable en cualquier autoanalizador o espectrofotómetro y de bajo costo por no requerir ningún reactivo.

A futuro sería de utilidad el desarrollo de una expresión matemática que permitiese corregir el valor de BT medido según el GH existente en la muestra para lo cual se debería realizar un ensayo que estudiara un rango mayor de concentraciones de hemoglobina e intervalos más acotados entre los distintos niveles.

CORRESPONDENCIA

Bioq. MARÍA GUILLERMINA BUSCETTI
Calle 49 N° 491, Piso 10, Dpto. "D".
1900 LA PLATA, Buenos Aires, Argentina
Tel.: 221-155229984
E-mail: guillerminabuscetti@hotmail.com

Referencias bibliográficas

- Sánchez-Rodríguez MA, Colunga-Reyes R, Cedillo-Martínez M. Ecuaciones para eliminar la interferencia de sueros hemolizados, ictericos e hiperglucémicos en las determinaciones rutinarias en química clínica. *Bioquímica* 2002; 27 (2): 46-52.
- Pineda Tenor D, Martínez Laborde C, Menchén Herreros A, Fernández Rodríguez E. Aproximación matemática para la corrección de la influencia de la hemólisis en pruebas frecuentes del laboratorio clínico. *Rev Lab Clin* 2010; 3 (1): 25-30.
- Carraro P, Servidio G, Plebani M. Hemolyzed specimens: a reason for rejection or a clinical challenge. *Clin Chem* 2000; 46: 306-7.
- Bhutani VK, Johnson L, Sivieri EM. Predictive ability of a predischage hour-specific serum bilirubin for subsequent significant hyperbilirubinemia in healthy term and near-term newborns. *Pediatrics* 1999; 103 (1): 6-14.

5. Etcheverry GS, Domínguez MV, Espósito N, Mayon PC, Morales MJ, Roselli MS, *et al.* Auditoría clínica: una herramienta para el seguimiento de errores preanalíticos en el laboratorio. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2007; 41 (1): 51-6.
6. García Aguilar GD, Pico Picos MA, Quintana Hidalgo L, Cabrera Argany A, Lorenzo Medina M, Aguilar Doreste JA. Utilidad de los índices séricos para la valoración de las interferencias causadas por la hemólisis y la bilirrubina en la medición de distintos constituyentes bioquímicos. *Química Clínica* 2007; 26 (4): 196-201.
7. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44 (3): 311-6.
8. Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. *Clin Chem* 1986; 32: 470-5.
9. Westgard J. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. [en línea] [fecha de acceso 10 de julio de 2014]. Disponible en: <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.
10. Ventimiglia F, Fink NE. Intervalos de referencia: metodología para su creación y verificación. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2002; 36 (2): 223-33.
11. Gómez Rioja R, Alsina Kirchner MJ, Alvarez Funes V, Barba Meseguer N, Cortés Rius M, Llopis Díaz MA *et al.* Hemólisis en las muestras para diagnóstico. *Rev Lab Clin* 2009; 2 (4): 185-95.
12. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Procedimiento para el estudio de la interferencia por hemólisis, bilirrubina y turbidez y para la verificación de los índices de hemólisis, ictericia y lipemia. Comisión de Metrología y Sistemas Analíticos. Documento Técnico 2013.

Recibido: 23 de septiembre de 2015

Aceptado: 3 de mayo de 2016