

PREMIO FABA/FBA 2023

Interferencia positiva de las paraproteínas en la determinación de bilirrubina total y su rol en el diagnóstico de gammopatías monoclonales

► Luciana Soledad Gazzeli^{1a*}, Silvia Mabel Galvez^{2b}, Paola Claudia Prener^{2b}

¹ Licenciada en Bioquímica.

² Bioquímica.

^a Hospital Dr. Guillermo del Soldato, Pellegrini, provincia de Buenos Aires, Argentina.

^b Hospital Interzonal Especializado de Agudos y Crónicos San Juan de Dios, La Plata, provincia de Buenos Aires, Argentina.

* Autora para correspondencia.

Resumen

La interferencia por paraproteínas en los análisis clínicos ha sido extensamente informada a nivel mundial. Si bien se han propuesto estrategias metodológicas para evitar el informe de datos erróneos asociados a interferencias (p. ej. confirmación manual, sistema de alerta), en pocos casos se ha propuesto su detección como herramienta diagnóstica de patologías no sospechadas desde la clínica. A partir del trabajo conjunto de dos hospitales de la provincia de Buenos Aires se describió: i) la presencia de interferencia positiva de paraproteínas en la determinación de bilirrubina total con reactivos y autoanalizadores Wiener, y ii) su contribución, en un período inferior a los seis meses, a la detección de cuatro gammopatías no sospechadas (tres monoclonales). Se recomienda dar difusión de esta inferencia a nivel nacional y se propone un esquema de trabajo en laboratorio para identificar la interferencia así como un perfil mínimo de determinaciones para evaluar la existencia de gammopatías desconocidas.

Palabras clave: Pseudohiperbilirrubinemia; Gammopatías monoclonales; Interferencia analítica; Paraproteínas; Proteínas monoclonales

Positive interference of paraproteins in the determination of total bilirubin and its role in the diagnosis of monoclonal gammopathies

Abstract

Paraprotein interference in clinical biochemistry has been widely reported around the world. Methodological strategies have been proposed to avoid reporting erroneous data due to interferences (i.e. manual check, alert system); however, few cases have suggested its use as a diagnostic tool for unsuspected pathologies. Based on the joint work of two hospitals from Buenos Aires Province, the following has been described: i) the presence of positive interference of paraproteins in the assessment of total bilirubin with Wiener chemistry and autoanalyzers, and ii) its contribution, in less

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

than six months, to the diagnosis of four gammopathies previously unsuspected (three monoclonal ones). Sharing the occurrence of this interference in our country is recommended. An interference identification workflow is also proposed, as well as a set of biochemical assays to evaluate the occurrence of unsuspected gammopathies.

Keywords: Pseudohyperbilirubinemia; Monoclonal gammopathies; Analytical interference; Paraproteins; Monoclonal proteins

Interferência positiva de paraproteínas na determinação da bilirrubina total e seu papel no diagnóstico de gamopatias monoclonais

Resumo

A interferência da paraproteína na bioquímica clínica tem sido amplamente relatada em todo o mundo. Embora estratégias metodológicas para evitar a comunicação de dados errôneos associados a interferências tenham sido propostas (p. ex., verificação manual, sistema de alerta), em poucos casos sugerem seu uso como ferramenta diagnóstica para patologias não suspeitas a partir da clínica. Com base no trabalho conjunto de dois hospitais da Província de Buenos Aires, foi descrita: i) a presença de interferência positiva de paraproteínas na determinação da bilirrubina total com reagentes e autoanalizadores Wiener e ii) sua contribuição, em um período inferior aos seis meses, para o diagnóstico de quatro gamopatias não suspeitas (três monoclonais). Recomenda-se difundir essa interferência em nível nacional e se propõe um esquema de trabalho em laboratório para identificar a interferência bem como um perfil mínimo de determinações para avaliar a ocorrência de gamopatias desconhecidas.

Palavras-chave: Pseudo-hiperbilirubinemia; Gamopatias monoclonais; Interferência analítica; Paraproteínas; Proteínas monoclonais

Introducción

La interferencia de las paraproteínas (inmunoglobulinas o sus componentes -cadena pesada o liviana- producidas por proliferación clonal de células plasmáticas o de linaje B) en la determinación de analitos clínicos ha sido previamente descrita (1) (2). Estas interferencias pueden ser positivas o negativas y han sido notificadas para varias metodologías de la Bioquímica Clínica en plataformas automatizadas (2). En algunas técnicas analíticas se ha demostrado que la interferencia se da por precipitación de las paraproteínas luego del agregado de alguno de los reactivos (3) (4) (5) (6). Sin embargo, también se han descrito otros mecanismos de interferencia (2) (4).

En la determinación de la bilirrubina total, en particular, diferentes artículos científicos mencionaron la interferencia de las paraproteínas (7) (8) (9) (10). Esta interferencia es positiva, es decir, la concentración de bilirrubina total determinada en presencia de paraproteínas es superior a la real. En estos casos, el valor de bilirrubina total en presencia de interferencia excede el valor de referencia (1 mg/dL), fenómeno conocido como pseudohiperbilirubinemia o hiperbilirubinemia espuria o facticia. A diferencia de las hiperbilirubinemias de etiología establecida que se acompañan de sueros ictericos (i.e. coloración

amarilla intensa dada por la presencia de bilirrubina mayor de 1 mg/dL), las pseudohiperbilirubinemias por interferencia de paraproteínas se acompañan de sueros anictéricos (coloración amarilla pálida).

Inicialmente informada como rara para el ensayo de bilirrubina total y el analizador automático Hitachi 917 de Roche (3) (11), la frecuencia de esta interferencia podría ser del orden del ~3-4% (5). De acuerdo con los informes disponibles, la interferencia no ocurre en todos los pacientes, así como tampoco se ha podido establecer una relación entre la concentración y el tipo de paraproteína con la magnitud de la interferencia (3). La programación de alertas en los autoanalizadores ha sido propuesta como estrategia para la detección de esta interferencia (5) (11), lo que podría ser útil para evaluar su frecuencia clínica y avanzar en la identificación de las condiciones que le dan origen.

Sin embargo, en los reportes bibliográficos consultados, solo un estudio en Japón ha evaluado el uso de esta interferencia en la determinación de bilirrubina total como herramienta de orientación diagnóstica (9). En este trabajo se describe la presencia de interferencia positiva de las paraproteínas en la determinación de bilirrubina total con reactivos y autoanalizadores Wiener y su contribución al diagnóstico de gammopatías monoclonales no sospechadas a partir del cuadro clínico.

Materiales y Métodos

Casos de estudio

Los casos de estudio del presente trabajo provienen de dos hospitales de la provincia de Buenos Aires (Argentina) y comprenden tres grupos:

Grupo A (casos 1 y 2): primeros hallazgos de pseudohiperbilirrubinemia por paraproteínas identificados en análisis clínicos de rutina.

Grupo B (caso 3): primer caso de sospecha diagnóstica de gammopatía, basada en la interferencia positiva en la determinación de bilirrubina total y su confirmación en el laboratorio.

Grupo C (casos 4, 5 y 6): gammopatías identificadas en base a la interacción positiva en la determinación de bilirrubina total, en complementación con un perfil mínimo de determinaciones propuesto para orientar al diagnóstico (Fig. 1).

El Grupo A corresponde a dos casos del año 2018, provenientes de un hospital provincial, con inconsistencia entre la determinación de bilirrubina total en un autoanalizador CMD 600 (Wiener lab, Shenzhen, China) y el color del suero. Dada esta discrepancia se realizó una interconsulta con el profesional médico solicitante para conocer el diagnóstico presuntivo/definitivo. Posteriormente, la interferencia por precipitación de paraproteínas se corroboró realizando el ensayo de bilirrubina total de forma manual con inspección visual. El Grupo B corresponde a un caso detectado en marzo de 2023, proveniente de un hospital municipal, con diagnóstico presuntivo de síndrome coledociano e inconsistencia

entre el resultado de bilirrubina total determinada en el autoanalizador CM 250 (Wiener lab, CABA, Argentina) y el color del suero. Este caso presentaba otros parámetros bioquímicos alterados por lo que desde el laboratorio se sugirió al equipo médico la realización de la cuantificación de inmunoglobulinas y de un proteinograma electroforético. El Grupo C está constituido por nuevos casos de gammopatías insospechadas desde la clínica, los cuales fueron identificados en el laboratorio utilizando el “beneficio” de la interferencia positiva de paraproteínas en la determinación de bilirrubina total. En abril de 2023 se inició el monitoreo en los laboratorios de ambos hospitales, sobre nuevos casos con discordancia entre la medición de bilirrubina total por autoanalizador y el color del suero (bilirrubina total mayor de 1 mg/dL acompañada de suero anictérico), complementando la evaluación con un protocolo de trabajo basado en la cuantificación de proteínas totales, albúmina, inmunoglobulinas totales (IgG, IgA, IgM) y proteinograma electroforético.

Determinaciones bioquímicas

La determinación de bilirrubina total, tanto en autoanalizador (CMD 600, CM 250) como por el método manual, se basó en el ensayo de bilirrubina total de Wiener (<https://www.wiener-lab.com.ar/pt-BR/catalog/?sp=bilirrubina+total>). En este ensayo la bilirrubina indirecta, unida a la albúmina, es liberada por un tensioactivo, luego de lo cual se adiciona una sal de diclorofenildiazonio formando un azocompuesto de color rojo en solución ácida que se cuantifica espectrofotométricamente mediante la medida de absorbancia

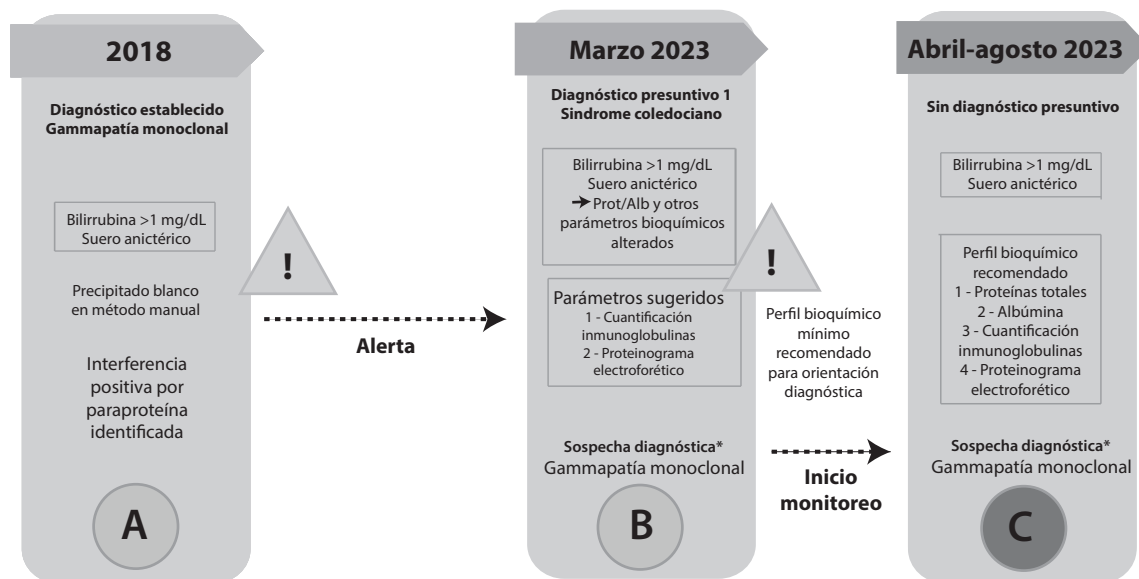


Figura 1. Línea temporal y características generales de los tres grupos (A, B, C) de casos presentados.

* Indica que la sospecha diagnóstica fue confirmada por inmunofijación y punción de médula ósea.

a 546 nm. La intensidad del color del azocompuesto es proporcional a la concentración de bilirrubina total. El ensayo utiliza dos reactivos; el reactivo 1 es una solución acuosa que contiene ácido clorhídrico 150 mmol/L y tensoactivo, y el reactivo 2 es una solución acuosa que contiene sal de diclorofenildiazonio 1,5 mmol/L en ácido clorhídrico 150 mmol/L. Las únicas interferencias informadas por el fabricante son lipemia y hemólisis.

La cuantificación de inmunoglobulinas se realizó mediante inmunoturbidimetría en un equipo Cobas C311 (Hitachi, Tokio, Japón) (Grupo B) y en un equipo CMD 600 (Grupo C). El proteinograma electroforético se corrió en soporte de acetato de celulosa gelatinizado y fue revelado mediante tinción con Amido Schwartz para el Grupo B y en soporte de agarosa con equipo Microgel automatizado (Interlab) y revelado por tinción con *blue acid* para el Grupo C. La determinación de proteínas totales y albúmina se realizó con reactivos Wiener.

Resultados

Grupo A: los dos sueros de este grupo presentaron valores de bilirrubina total en autoanalizador CMD 600 mayores que el valor de referencia a pesar de ser anictéricos por observación visual (Tabla I). La interconsulta reveló que ambos casos tenían diagnóstico de gammapatía monoclonal. Por su parte, la realización del ensayo de bilirrubina total de forma manual

permitió corroborar la formación de un precipitado blanco.

Grupo B: en el autoanalizador CM 250 se detectó una concentración de bilirrubina total mayor que el valor de referencia con un suero anictérico (Tabla I). Este caso presentó, además, aumento de proteínas totales respecto a la albúmina, hemoglobina y hematocrito disminuidos, un contexto de insuficiencia renal (Tabla I) y una disminución de la relación albúmina/globulinas (A/G=0,6; intervalo de referencia=1,2-2,2), lo que fortaleció la sospecha específica de mieloma múltiple. Mediante la cuantificación de inmunoglobulinas se detectó un valor de IgG superior al valor de referencia (Tabla I) y en el proteinograma electroforético se detectó un aumento de la fracción gamma (41,9%) con presencia de componente monoclonal.

Grupo C: en un período de cinco meses, en el laboratorio del hospital provincial se detectaron tres nuevos casos con valor de bilirrubina total mayor que el valor de referencia, con suero anictérico (Tabla I). Cada caso presentó un aumento de proteínas totales e inmunoglobulinas aumentadas (Tabla I). Los proteinogramas mostraron un componente monoclonal en la fracción beta 2 para el caso 4 (47,5%) y en la fracción gamma para el caso 5 (39,4%); en tanto que para el caso 6 se detectó un aumento de la fracción gamma (42,3%) con un componente no concluyente sobre su origen (monoclonal/policlonal) (Fig. 2). Además, se observó una disminución de A/G, con valores de 0,44, 0,68 y 0,62 para los casos 4, 5 y 6 respectivamente (Fig. 2).

Tabla I. *Parámetros bioquímicos de los grupos y casos analizados*

Determinaciones bioquímicas (intervalo de referencia)	Grupo A (2018) Identificación de interferencia por paraproteínas		Grupo B (2023) Sospecha diagnóstica por laboratorio	Grupo C (2023) Gammapatías identificadas y confirmadas por protocolo propuesto		
	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5	Caso 6
Hematocrito (36 - 48%)	ND	ND	27	25	38	44
Hemoglobina (12 - 16 g/dL)	ND	ND	9,8	7,5	12,2	14,3
Urea (10 - 50 mg/dL)	ND	ND	136	39	31	52
Creatinina (0,60 - 1,30 mg/dL)	ND	ND	5,89	1,18	0,93	1,47
Bilirrubina total (<1,00 mg/dL)	> 1,00	> 1,00	8,04	2,49	2,64	2,27
Bilirrubina directa (<0,30 mg/dL)	ND	ND	0,21	0,19	0,20	0,11
Color del suero (visual)	Anictérico	Anictérico	Anictérico	Anictérico	Anictérico	Anictérico
Proteínas totales (6,1 - 7,9 g/dL)	ND	ND	7,5	9,7	8,7	8,9
Albúmina (3,5 - 4,8 g/dL)	ND	ND	2,7	3,6	3,5	3,6
IgA (61 - 348 mg/dL)	ND	ND	29	3438	300	249
IgG (700 - 1600 mg/dL)	ND	ND	3207	317	3100	3507
IgM (40 - 250 mg/dL)	ND	ND	19	<20	44	153

ND: información no disponible. En negrita y cursiva se resalta la inconsistencia entre el valor de bilirrubina total y el color del suero y las inmunoglobulinas con valores anormales para cada caso.

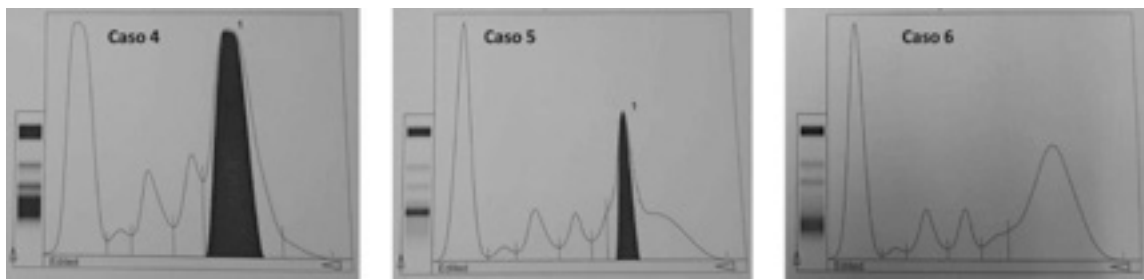


Figura 2. Perfil electroforético de seroproteínas del Grupo C. Caso 4: Componente monoclonal (CM) en la fracción β_2 . Caso 5: CM en la fracción γ . Caso 6: Fracción γ , aumentada

Discusión y Conclusiones

Los resultados confirmaron, en seis casos, la existencia de interferencia positiva en la determinación de bilirrubina total, en dos hospitales de la provincia de Buenos Aires que utilizan reactivos y autoanalizadores Wiener. Cabe destacar que en los cuatro casos de gammopatías detectadas en 2023, la sospecha diagnóstica se basó en esta interferencia positiva (pseudohiperbilirubinemia por paraproteínas), dado que los casos habían llegado al laboratorio desde distintos servicios y sin diagnóstico presuntivo de gammapatía. En el caso índice del Grupo B los resultados de laboratorio determinaron un cambio en el abordaje médico: la paciente fue derivada a un centro de mayor complejidad y a los pocos días se confirmó el diagnóstico de mieloma múltiple por punción de médula ósea. En el Grupo C, la sospecha diagnóstica de gammapatía monoclonal de los casos 4 y 5 fue confirmada posteriormente mediante inmunofijación y punción de médula ósea y actualmente se encuentran bajo tratamiento por mieloma múltiple. Para el caso 6, restan aún los estudios confirmatorios (inmunofijación y punción medular).

Hasta donde se conoce, no existen en la Argentina informes previos de interferencia positiva en la determinación de bilirrubina total; asimismo, tampoco hay suficiente difusión a nivel nacional sobre los casos de interferencia reportados en otros países. Cabe destacar, además, que sería recomendable que esta interferencia sea advertida por la empresa junto con la de lipemia y hemólisis. Por tal motivo las autoras se comunicaron en marzo de 2023 con la representación de la empresa Wiener en la Argentina para ponerla en conocimiento de la interferencia detectada.

Conocer la existencia de esta interferencia en la determinación de bilirrubina total es relevante para evitar informar valores falsamente elevados en pacientes con diagnóstico establecido de gammopatías. En dos de los casos los niveles de transaminasa glutámico oxalacética (TGO), transaminasa glutámico pirúvica (TGP), fosfatasa alcalina (FAL) y gamma-glutamyltransferasa (GGT) se encontraban aumentados. Este contexto bioquímico

de hepatograma alterado podría haber hecho validar como correcto el resultado de bilirrubina total aumentado. Se sugiere, por lo tanto, contrastar en todos los casos el valor de bilirrubina total con el color del suero.

Parece, sin embargo, más relevante aún el uso de esta interferencia analítica como indicador desde el laboratorio de una gammapatía no sospechada desde la clínica. El diseño de un sistema de alerta basado en la inconsistencia entre la determinación de la bilirrubina total y el color del suero, y la implementación del perfil de determinaciones propuesto para orientar al diagnóstico, surge como una herramienta importante del laboratorio, dada la complejidad de los cuadros clínicos de gammopatías. Sería importante comunicar esta interferencia e instar al resto de los laboratorios a implementar un monitoreo siguiendo el algoritmo de trabajo propuesto u otro que surja o se consensúe.

Se remarca la importancia del rol del bioquímico en la detección de las interferencias. En este trabajo dicha interferencia ayudó a enfocar un diagnóstico totalmente insospechado en cuatro casos. El número de casos detectados en el Grupo C, en los cinco meses en los que se realizó el monitoreo, fue mayor en el hospital provincial (3 casos) que en el municipal (ningún caso), lo que podría explicarse por su nivel de complejidad y el mayor número de muestras analizadas (9147 vs. 599). Estos resultados sugieren la probabilidad de aparición de interferencias no detectadas en el ámbito público o privado de la Argentina, ya que la detección depende del contexto de cada caso y del flujo de trabajo del laboratorio. Se remarca la importancia de protocolizar los procedimientos entre laboratorios para minimizar los errores en pos de una mejora continua de los resultados y la calidad de atención. El monitoreo en un período de tiempo mayor permitirá tener una evaluación más acabada de la frecuencia de esta interferencia.

La evidencia entusiasma a seguir en la búsqueda de nuevos casos implementando este algoritmo de trabajo. Se propone empezar por contrastar el valor de la bilirrubina total, ya sea mediante inspección visual del color del suero o por la incorporación de un índice de ictericia en los autoanalizadores. Frente a la inconsis-

tencia de dicha relación se sugiere, previa consulta con el médico, realizar las determinaciones de proteínas totales, albúmina, cuantificación de inmunoglobulinas y proteinograma electroforético. Considerando que los autoanalizadores y los reactivos para los cuales se ha detectado esta interferencia [Wiener, en este trabajo; Roche (3) (5) (11); otros autoanalizadores y reactivos (2)] son de uso común en la Argentina, el esquema de trabajo propuesto podría ser de gran ayuda para el diagnóstico de gammopatías no sospechadas desde la clínica. Esta estrategia ha sido propuesta previamente en Japón (9), en tanto que en España se ha propuesto una estrategia similar pero basada en la interferencia de paraproteínas en la determinación de bilirrubina directa (12). Es importante resaltar que, si bien en los casos confirmados las gammopatías fueron monoclonales, existen reportes de interferencia por inmunoglobulinas policlonales para otros analitos (12). Se pretende difundir esta interferencia a nivel nacional con la implementación de sistemas de alerta en las provincias que contribuyan de manera beneficiosa a la detección de gammopatías no sospechadas desde la clínica y a su tratamiento oportuno.

Agradecimientos

A la Dra. Verónica El Mujtar por sus contribuciones para la preparación de la versión final del manuscrito. A la bioquímica María de los Angeles Soriano y a la técnica en laboratorio Flavia Rodríguez por sus aportes a este trabajo. Al personal de ambos hospitales en su conjunto.

Fuentes de financiación

Las determinaciones de laboratorio comprendidas en este trabajo fueron realizadas en hospitales públicos de la Argentina y financiadas de acuerdo con la normativa vigente. No se recibió una financiación específica.

Conflictos de intereses

Las autoras declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Bioq. LUCIANA GAZZELI
Correo electrónico: lugazzeli@hotmail.com

Referencias bibliográficas

1. Yang Y, Howanitz PJ, Howanitz JH, Gorfajn H, Wong K. Paraproteins are a common cause of interferences with automated chemistry methods. *Arch Pathol Lab Med* 2008 Feb; 132 (2): 217-23.
2. Dalal BI, Brigden ML. Factitious biochemical measurements resulting from hematologic conditions. *Am J Clin Pathol* 2009 Feb; 131 (2): 195-204.
3. Pantanowitz L, Horowitz GL, Upalakalin JN, Beckwith BA. Artifactual hyperbilirubinemia due to paraprotein interference. *Arch Pathol Lab Med* 2003 Jan; 127 (1): 55-9.
4. Berth M, Delanghe J. Protein precipitation as a possible important pitfall in clinical chemistry analysis of blood samples containing monoclonal immunoglobulins: 2 case reports and a review of the literature. *Acta Clin Belg* 2004 Oct; 59 (5): 263-73.
5. Sheppard CA, Allen RC, Austin GE, Young AN, Ribeiro MA, Fantz CR. Paraprotein interference in automated chemistry analyzers. *Clin Chem* 2005 Jun; 51 (6): 1077-8.
6. Alberti MO, Drake TA, Song L. The pH of chemistry assays plays an important role in monoclonal immunoglobulin interferences. *Pract Lab Med* 2015 Dec; 3: 8-16.
7. Cascavilla N, Falcone A, Sanpaolo G, D'Arena G. Increased serum bilirubin level without jaundice in patients with monoclonal gammopathy. *Leuk Lymphoma* 2009 Jan; 50 (8): 1392-4.
8. Dutta AK. A curious case of hyperbilirubinemia. *Indian J Clin Biochem* 2012 Apr; 27 (2): 200-1.
9. Seimiya M, Suzuki Y, Yoshida T, Sawabe Y, Matsushita K, Nomura F. The abnormal reaction data-detecting function of the automated biochemical analyzer was useful to prevent erroneous total-bilirubin measurement and to identify monoclonal proteins. *Clin Chim Acta* 2015 Feb; 441: 44-6.
10. Chen Y, Graham L, Bouhtiauy I, Watts G, Hamilton M. Hyperbilirubinemia in anicteric blood? *Clin Chem* 2014 Nov; 60 (11): 1457-8.
11. Smogorzewska A, Flood JG, Long WH, Dighe AS. Paraprotein interference in automated chemistry analyzers. *Clin Chem* 2004 Sep; 50 (9): 1691-3.
12. García-González E, González-Tarancón R, Aramendía M, Rello L. Analytical interference by monoclonal immunoglobulins on the direct bilirubin AU Beckman Coulter assay: the benefit of unsuspected diagnosis from spurious results. *Clin Chem Lab Med* 2016 Dec; 54 (8): 1329-35.

Recibido: 19 de diciembre de 2023

Aceptado: 15 de enero de 2024