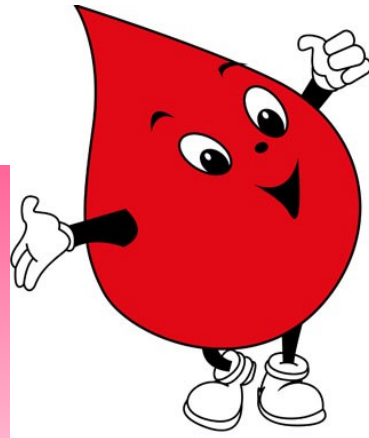
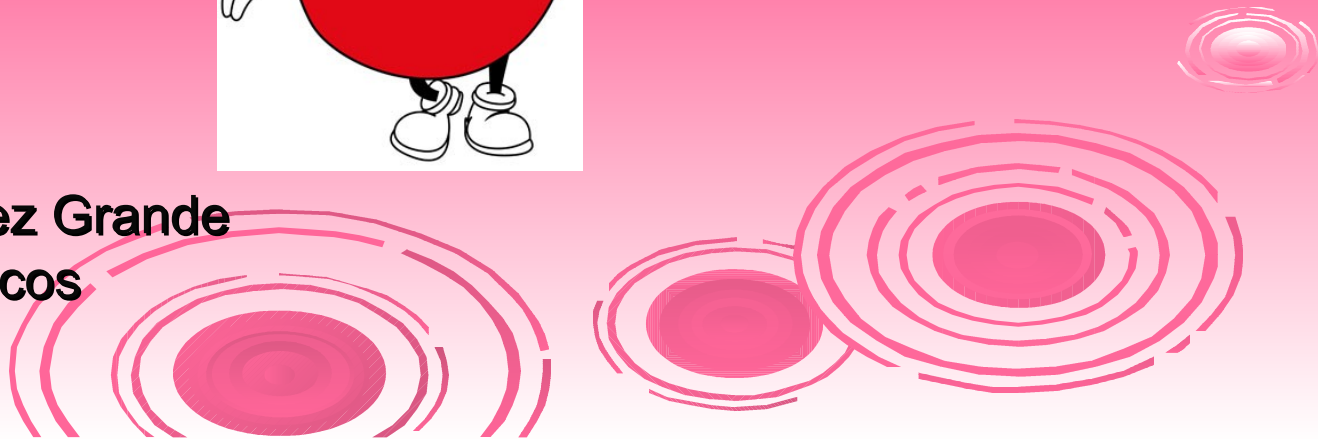


Interferencias analíticas: Hemólisis



Esther Fernández Grande
R1 A.Clínicos





Revista del Laboratorio Clínico

www.elsevier.es/LabClin



REVISIÓN

Hemólisis en las muestras para diagnóstico

Rubén Gómez Rioja^{a,b,*}, María Jesús Alsina Kirchner^{a,c}, Virtudes Álvarez Funes^{a,d},
Nuria Barba Meseguer^{a,e}, Mariano Cortés Rius^{a,f}, María Antonia Llopis Díaz^{a,c} y
Cecilia Martínez Bru^{a,f}

^aComité de Garantía de la Calidad y Acreditación, Comisión de la Calidad Extraanalítica, Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular

^bServicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España

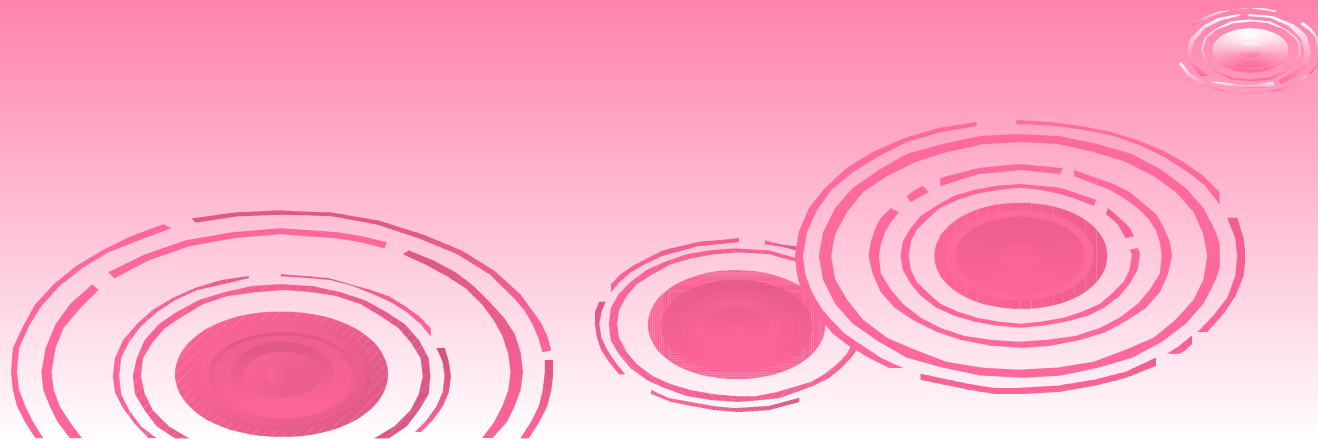
^cLaboratori Barcelonès Nord i Vallès Oriental (ICS), Badalona, Barcelona, España

^dLaboratori Clínic L'Hospitalet-Cornellà, Barcelona, España

^eLaboratori CatLab, Viladecavalls, Barcelona, España

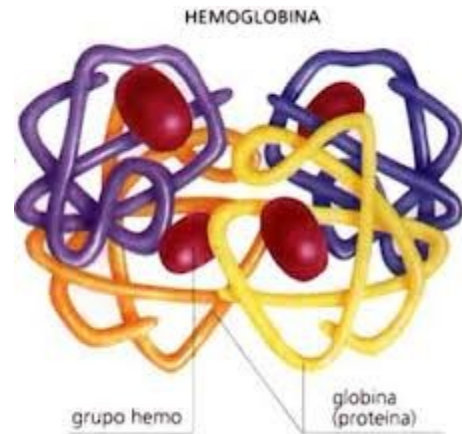
^fServei de Bioquímica, Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

- **Hemólisis: es el proceso de destrucción de los hematíes, que conlleva la liberación del contenido intraeritrocitario en el plasma alterando su composición.**
- **Algunos componentes se hallan en los eritrocitos a concentraciones superiores (10 veces): K, LDH, FE, FAC, AST, ALT.**
- **Su presencia da lugar a errores en las determinaciones de ciertos parámetros. El tipo de magnitud que se ve afectada depende de la metodología empleada para medirla.**



COMPONENTES DE LA HEMOGLOBINA

1. GLOBINA: proteína conjugada oligomérica constituida por 4 subunidades, cada subunidad contiene un grupo HEMO unida a la cadena polipeptídica.

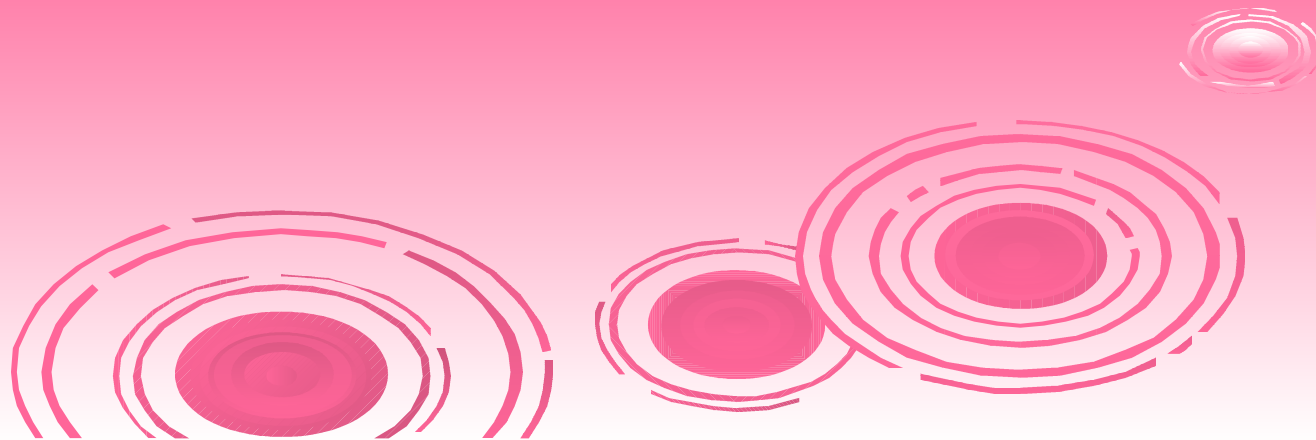


2. GRUPO HEMO: es un derivado porfirínico que contiene un átomo de Fe (elemento clave en el transporte de O₂). Este grupo constituye el núcleo prostético.



Tipos de Hemólisis

- **In vivo:** debido a un proceso patológico en el paciente. La hemólisis puede ser:
 - * **Extravascular:** se produce en las áreas especializadas en la recuperación de los componentes intraeritrocitarios. En el interior de macrófagos del bazo, hígado o médula ósea.



hemoglobina
HADM

HEMOGLOBINA

Degradación dentro del fagocito

Hem

Globina

Excreta en el Hígado

Enlaza a la Albúmina

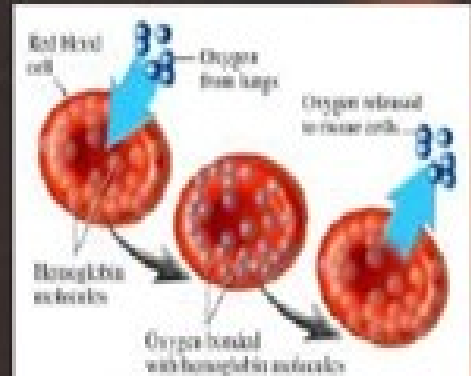
Hierro

Biliverdina

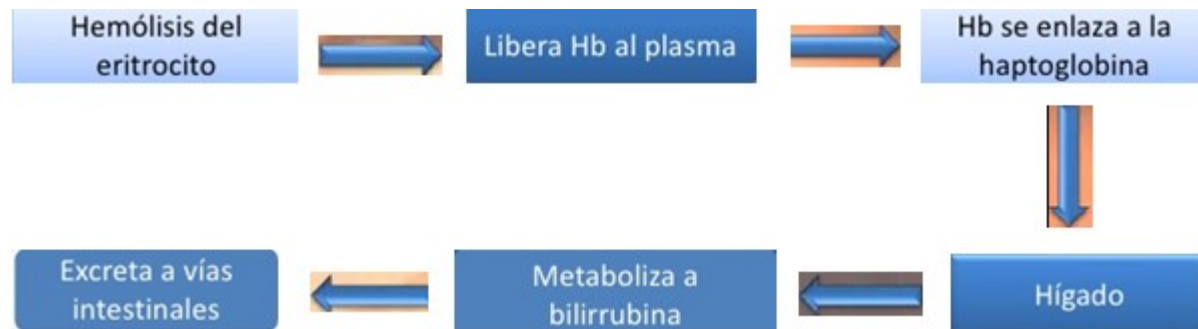
Monóxido de carbono

BILIRRUBINA

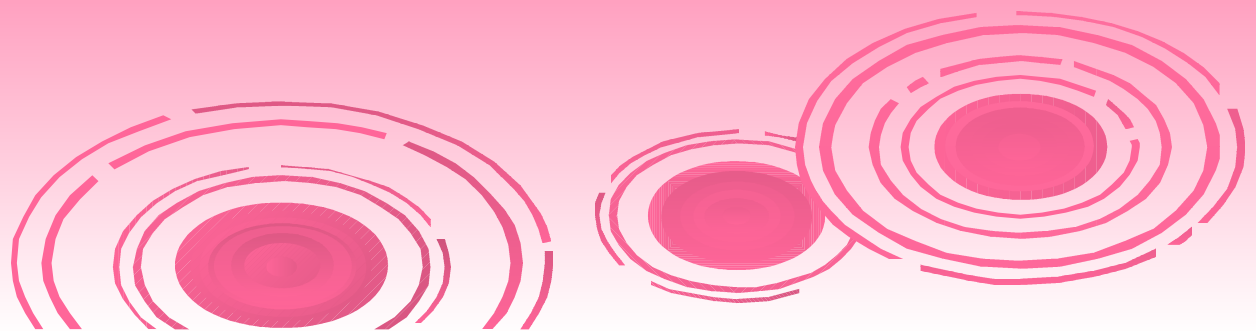
Penetra en plasma



- **Intravascular:** se produce dentro del sistema vascular y la hemoglobina es liberada directamente a la sangre. Ocurre en enfermedades que producen una destrucción masiva sobrepasando la capacidad de los sistemas de recuperación dando lugar a hemoglobina libre en el plasma.

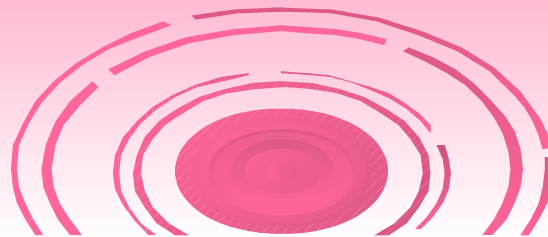
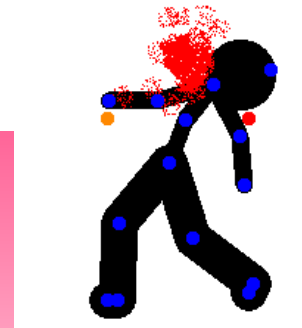


En estos casos, la mayor parte de la hemoglobina libre forma un complejo con la haptoglobina, el cual es degradado en el hígado. Una pequeña porción se une a la albúmina o hemopexina formando complejos que también se degradan en el hígado.

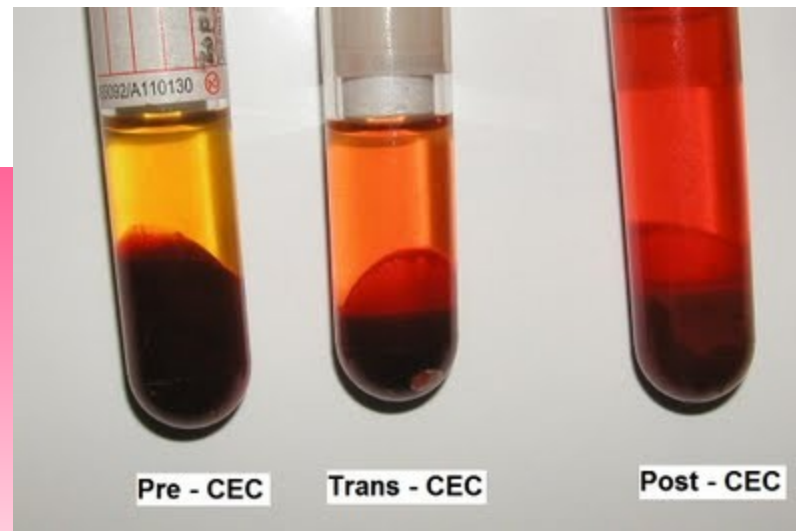


Causas de hemólisis intravascular

- Hemoglobinuria paroxística familiar
- Enfermedades asociadas a fragmentación eritrocitaria: anomalías cardíacas/vasculares o microangiopatías.
- Anemia hemolítica inmunológica: transfusiones, anemia hemolítica autoinmunitaria...
- Infecciones: Clostridium, plasmodium...
- Agentes químicos: venenos, choque osmóticos...
- Agentes físicos: quemados.



- **In vitro:** es un efecto preanalítico debido a una mala extracción o a las condiciones de transporte y preparación de las muestras. Es la causa mas frecuente de hemólisis en las muestras (>95%).

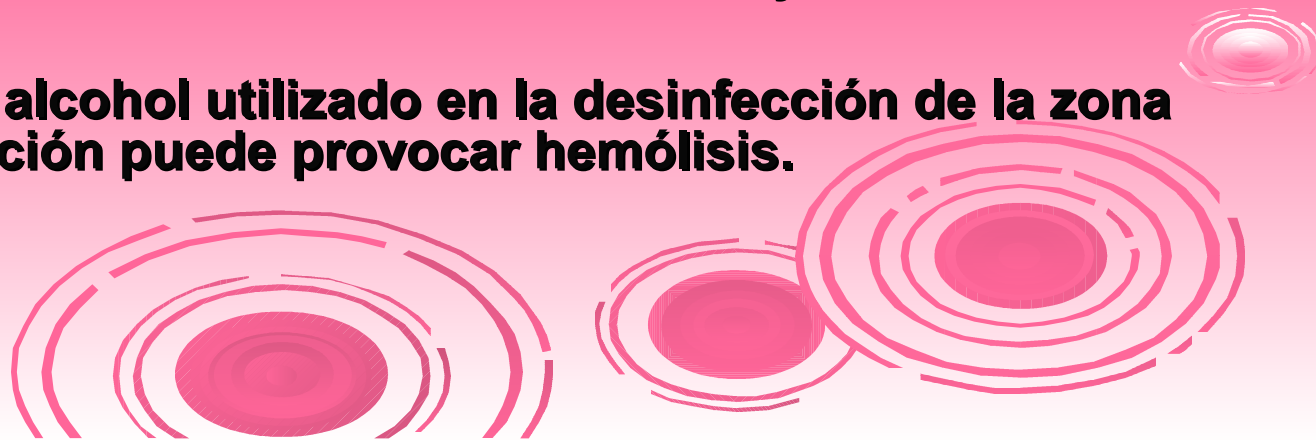


Causas de hemólisis in vitro

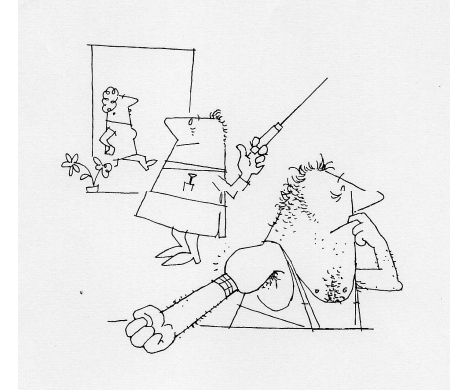


➤ Flebotomía

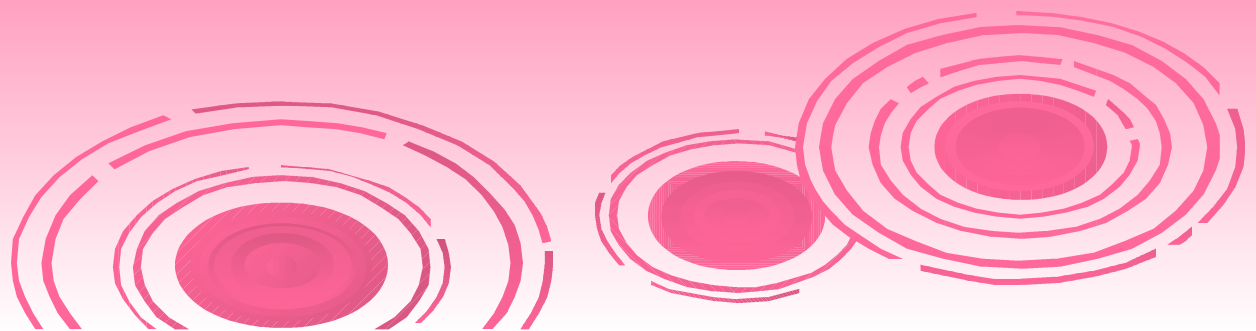
- **Dispositivo de acceso vascular:** el uso del catéter, frente al de la aguja, se ha relacionado con una mayor aparición de muestras hemolizadas.
- **Calibre del dispositivo de extracción:** el grado de hemólisis es inversamente proporcional al diámetro del catéter o aguja ya que se produce un aumento el flujo y la fricción causante de la hemólisis.
- **Lugar de punción:** la fosa antecubital disminuye la hemólisis.
- **Antiséptico:** el alcohol utilizado en la desinfección de la zona antes de la punción puede provocar hemólisis.



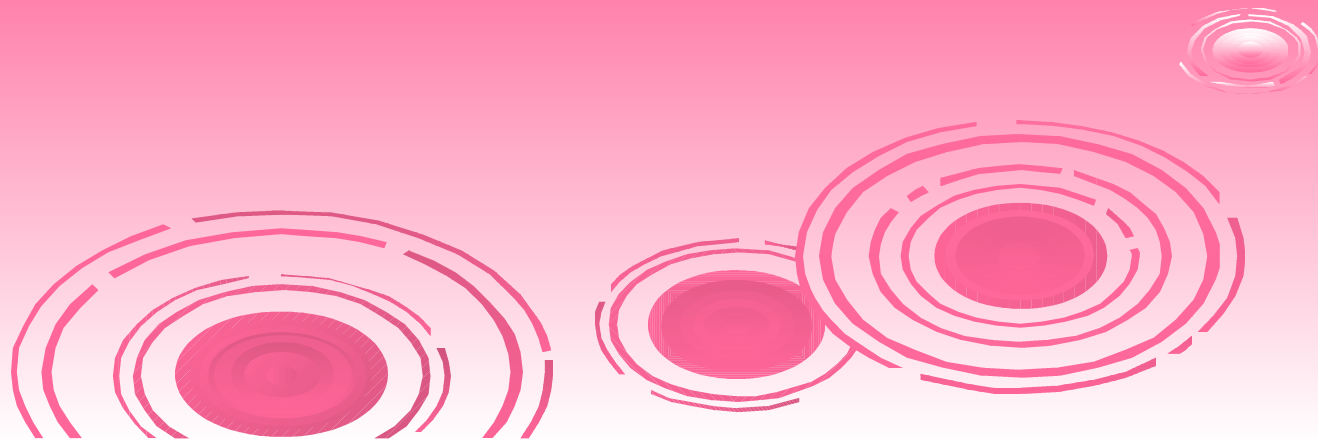
➤ Transporte



- **Tubo neumático: se asocia a cierto grado de hemólisis pero no da lugar a una alteración significativa de los resultados analíticos. La muestra mas susceptible es el suero.**
- **Transporte por carretera: evitar agitación y cambios bruscos de temperatura.**



- **Tiempo de torniquete: aumenta la presión venosa y la hemoconcentración.**
- **La punción capilar.**
- **Tipo de tubo: mayor incidencia en los tubos de mayor volumen.**
- **Tubos de vacío incompletos.**
- **Mezclado.**
- **Experiencia.**



➤ **Procesamiento**

- **Tiempo entre recogida y centrifugación:** en este periodo se produce el consumo de metabolitos por parte de las células, difusión de líquido intracelular por fallo de los sistemas de membrana y hemólisis.
- **Temperatura de centrifugación:** el frío aumenta la hemólisis.
- **Fuerza centrífuga:** debe establecerse el tiempo y la fuerza adecuados para conseguir una correcta separación sin producir hemólisis



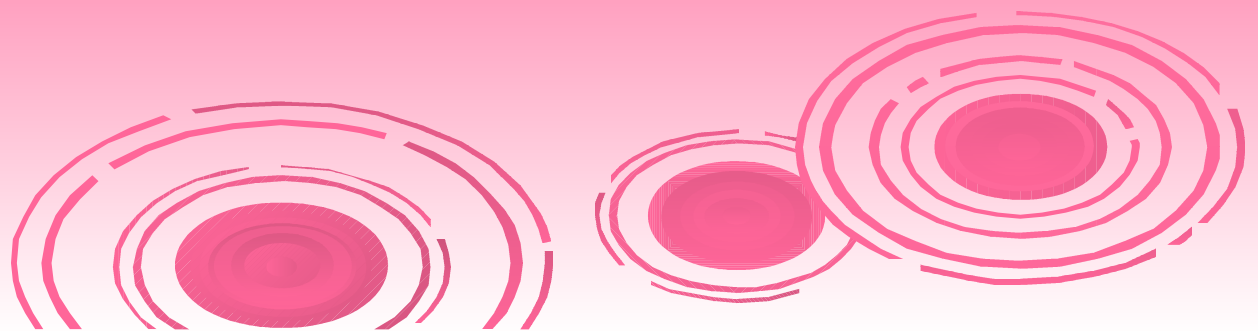
- Fallos en la barrera de separación: debido a hiperproteïnemia o a la presencia de contrastes yodados.
- Centrifugación de muestras parcialmente coaguladas.
- Recentrifugación da lugar al ascenso del suero retenido en el conjunto celular. **Da lugar a un aumento del potasio.**



Distinción entre in vivo o in vitro

In vivo: podemos usar como indicadores el descenso de la haptoglobina sérica, el incremento de la bilirrubina indirecta o el aumento de los reticulocitos que se produce para compensar esa destrucción eritrocitaria.







In vitro: el contenido intraeritrocitario integro se diluye en el plasma de la muestra. También podemos diferenciarla si en la extracción alguna de las muestras no está hemolizada.

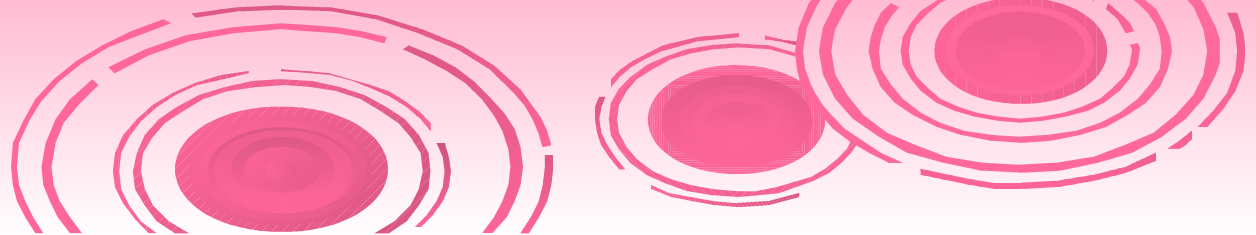


Efecto



- * La hemólisis tiene diferentes efectos según las magnitudes sobre las que actúe:
- Las que se diluyen, como el sodio. Se infraestiman.

Iones			
U.SODIO		123.9	134.5
U.POTASIO		6.9	4.1
U.CLORO		89.5	110.1
U.CA		8.5	5.8
U.FOSFO		8.9	4.7
U.MG		2.61	1.44



➤ Los que aumentan significativamente su concentración en el plasma:

- **Potasio:** concentración intracelular (140mEq/L)
concentración extracelular (4 mEq/L)

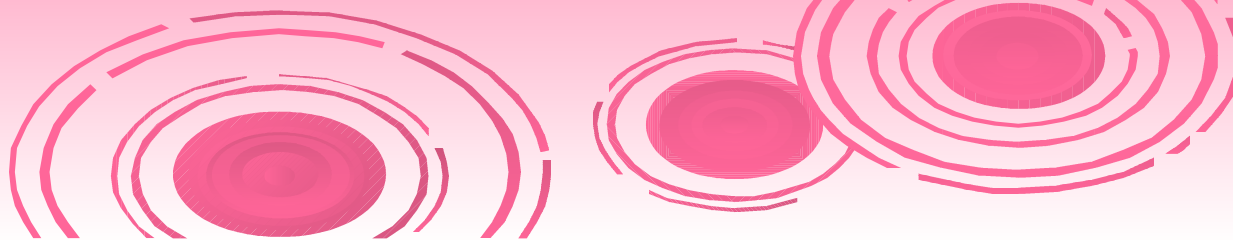
- **AST:** 7-15 veces mayor en eritrocitos

- **LDH:**

Láctico Deshidrogenasa

Tipo	Composición	Localización
LDH ₁	HHHH	Miocardio, eritrocito, riñón, páncreas
LDH ₂	HHHM	Miocardio, eritrocito, riñón
LDH ₃	HHMM	Páncreas, pulmón, leucocitos
LDH ₄	HMMM	Hígado, músculo esquelético
LDH ₅	MMMM	Hígado, músculo esquelético

Se sobreestiman.



- Interferencia espectral: Incremento del coeficiente de extinción en la medición de 300 a 700 nm, esta condicionado por la alta extinción propia de la hemoglobina entre 400 y 600 nm: BT, AMI, FAL, GGT, AU, FOS, PT, ALB.

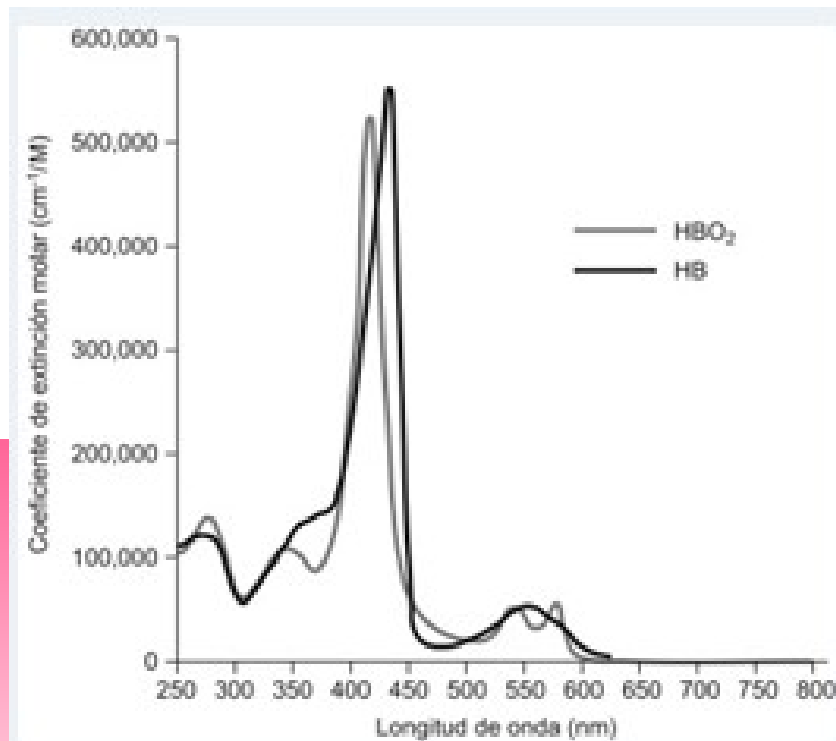
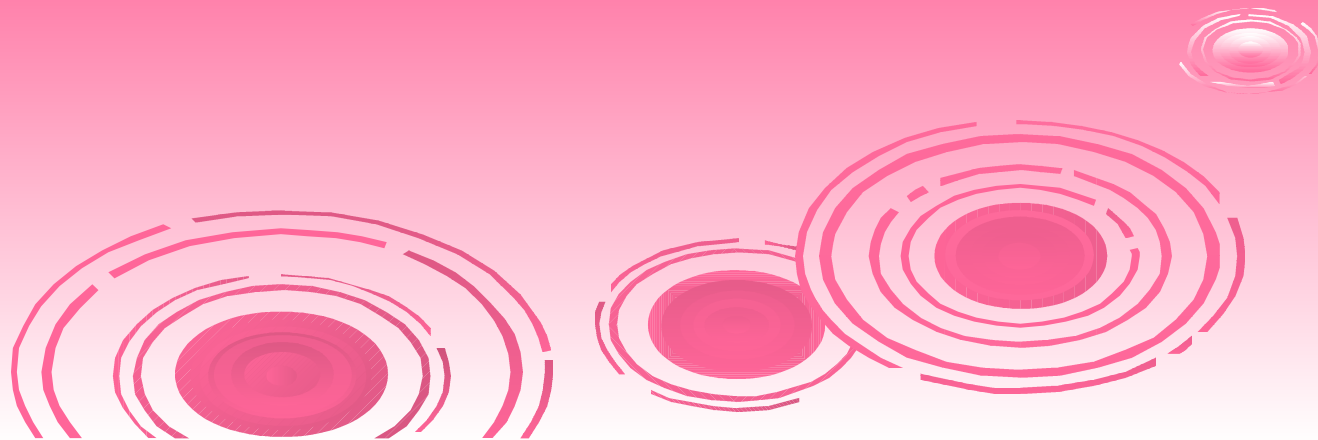


Figura 1. Espectro de absorción de la hemoglobina.

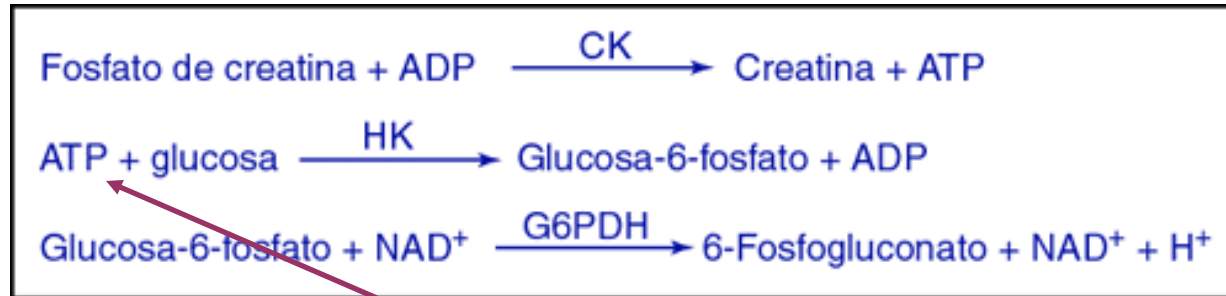
Hb: deoxihemoglobina; HbO₂: oxihemoglobina.

➤ Interferencia química:

- DD (proteasas eritrocitarias disminuyen factores coagulación y fibrina).
- * BT y BD (actividad pseudoperoxidasa de la Hb).
- CK (adenilatocinasa de los eritrocitos).



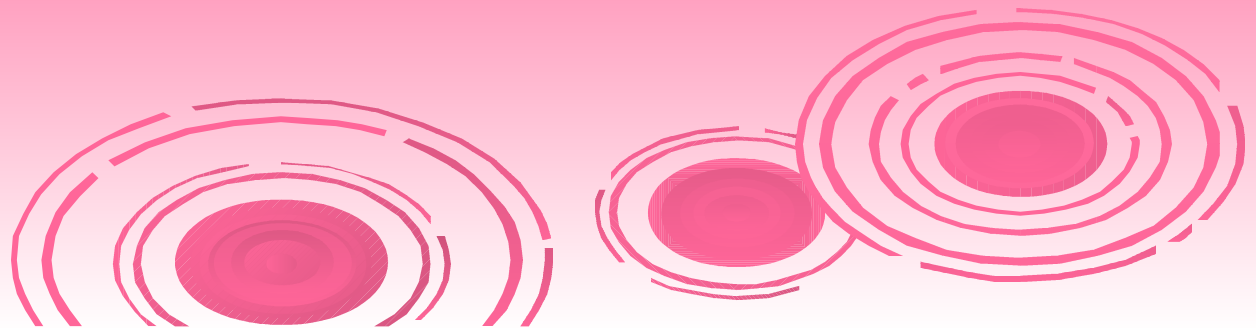
Determinación de CK



SO 15 197L.EPS



- La adenilato quinasa intraeritrocitaria, a partir de 2 moléculas ADP, sintetiza nuevas moléculas de ATP, que actúan como sustrato de la Hexokinasa para producir Glu-6P que se oxidará dando lugar a NADH, sobreestimando así la actividad CK.



Interferencia de la Hg en Lx 20

Beckman LX

Synchron

Índices séricos

Dilución en diluyente
del sistema (buffer).

Lectura a 6
longitudes de onda

Cualitativo

0: No detectada

1: 0 a 0,5

2: 0,5 a 1

3: 1 a 1,5

4: 1,5 a 2

5: 2 a 2,5

6: 2,5 a 3

7: 3 a 3,5

8: 3,5 a 4

9: 4 a 4,5

Fósforo	↑ (2,5)	↔	↑ (2)
Magnesio	↑ (1,3)	↑ (2)	
Proteínas totales		↔	↑ (1)
AST	↑ (0,2)	↑ (0,5)	↑ (0,5)
ALT	↑ (2,5)	↑ (1)	↑ (5)
GGT	↓ (2,5)	↓ (1)	↑ (2)
LDH	↑ (0,2)	↑ (0,5)	
FAL	↓ (2,5)	↑ (1)	↓ (0,5)
CK	↑ (0,2)	↑ (1)	
Albúmina	↓ (2,5)	↔	↑ (1)
Hierro	↑ (0,6)	↑ (0,5)	↓ (5)
Creatinina	↑ (1,3)	↔	↓ (0,5)
Bilirrubina	↔	↑ (0,5)	
Amilasa		↑ (1)	

Entre paréntesis está el punto de corte (en g/l de Hg) que define el error significativo producido

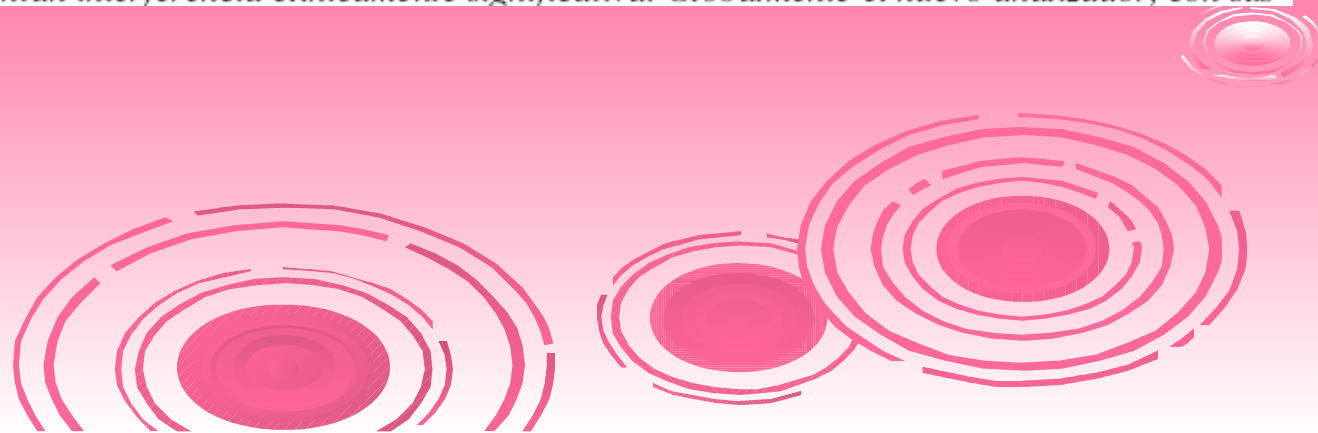


Estudio de las interferencias producidas por la hemólisis en la medición de 18 constituyentes séricos en un ADVIA 2400

R. Caballero Sarmiento

Resumen

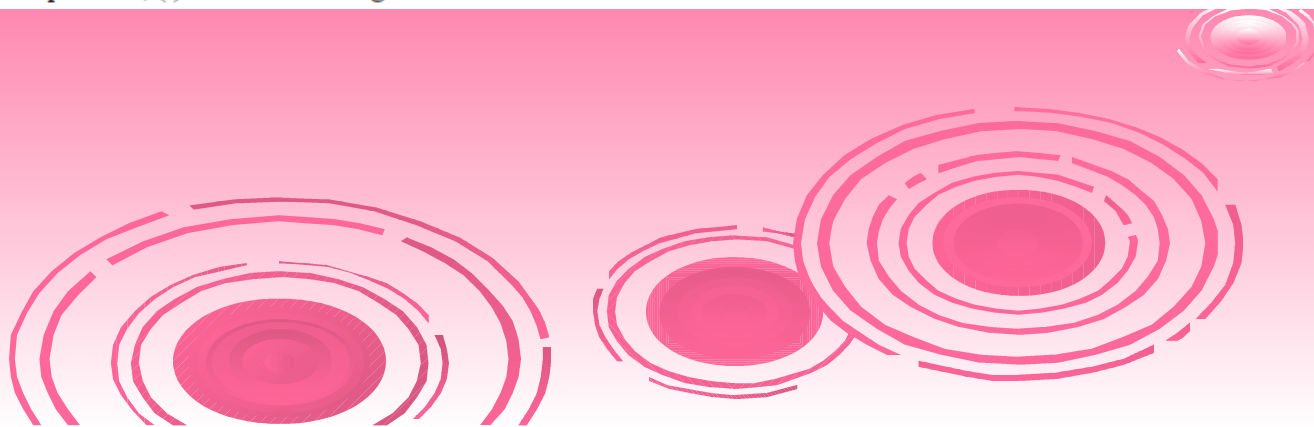
Se ha estudiado la interferencia por hemólisis en 18 magnitudes séricas en un analizador incorporado en el mercado como sustituto de otro. El estudio tiene como objetivos determinar y cuantificar el efecto de la hemólisis en 18 constituyentes medidos en el analizador ADVIA 2400, comparar dicho efecto 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



Hemólisis en Advia 2400

Hemoglobina			+-	++	+++	++++
	Medias*	LICS*	0,05 g/dL	0,1 g/dL	0,2 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%	(-)	(-)	(-) 31,5%
Bilirrubina esterificada	0,317	0,0292	(-) 200%	(-)	(-)	(-) 2207%

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

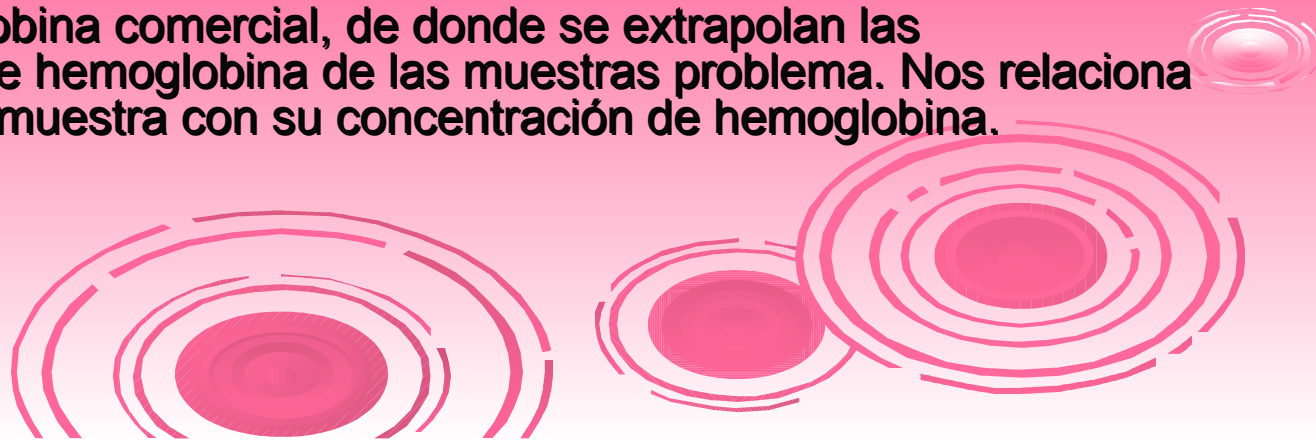


DetECCIÓN DE LA HEMÓLISIS

- **Visual:** poco fiable. Hay magnitudes que se sobreestiman en muestras ligeramente hemolizadas difíciles de detectar de forma visual.
- **Método de referencia:** Cianometahemoglobina (HiCN)
Consiste en diluir la sangre en una solución de ferrocianuro potásico y cianuro potásico.

El ferrocianuro potásico oxida las hemoglobinas a metahemoglobinas (Hi) y el cianuro potásico proporciona los iones cianuro (CN-) para formar el hemiglobincianuro o cianmetahemoglobina que tiene una absorción máxima a una longitud de onda de 540 nm. La capacidad de absorción de la solución se mide en un espectrofotómetro a 540nm.

Los resultados se llevan a una curva estándar realizada con soluciones de cianometahemoglobina comercial, de donde se extrapolan las concentraciones de hemoglobina de las muestras problema. Nos relaciona la absorción de la muestra con su concentración de hemoglobina.



* Índice sérico

Los índices séricos son una guía cualitativa de la apariencia de las muestras.

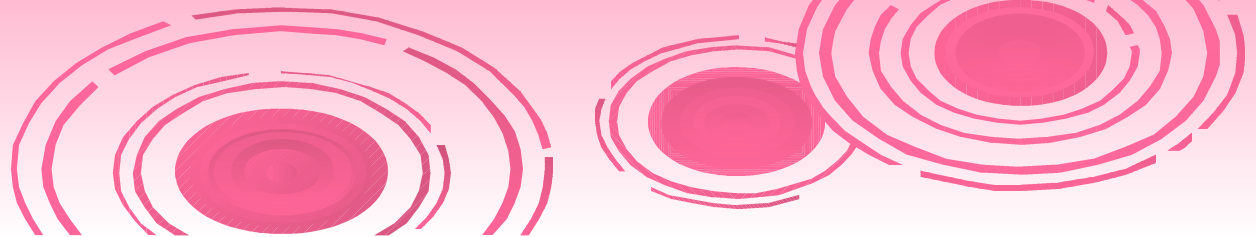
ÍNDICE DE HEMÓLISIS	HEMOGLOBINA LIBRE (g/L)
5	0
15	0.2 <i>Hemólisis mínima visible</i>
25	0.36
50	0.73
100	1.46 <i>Hemólisis visible fiable</i>
300	5.11
750	8.99



Cálculo del Índice

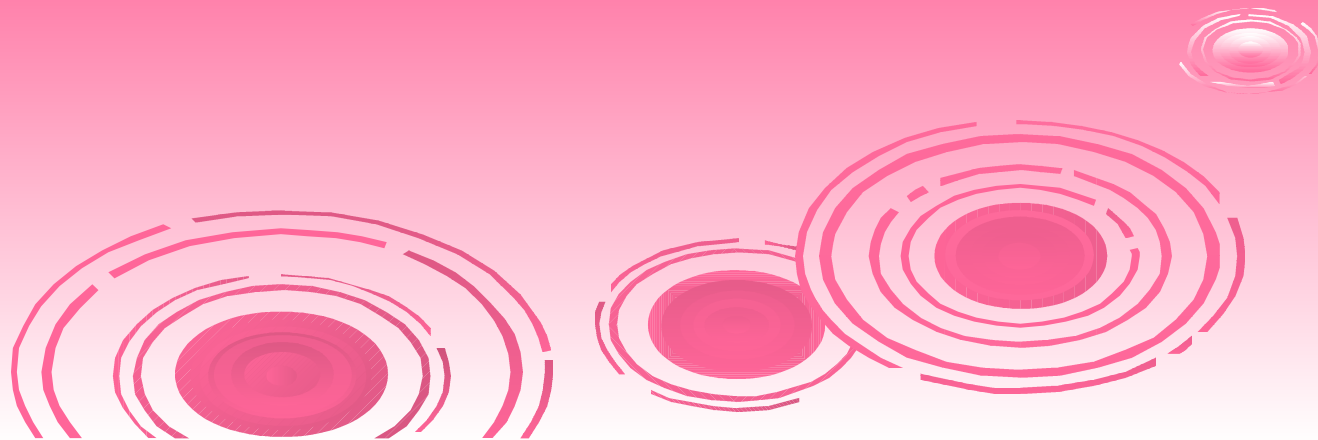
- El analizador aspira una parte alícuota de la muestra del paciente, la diluye con una solución de ClNa al 0.9% y realiza una medición bicrómica (600/570 nm).
- A partir de este valor de absorbancia (mAbs), el instrumento calcula el valor del índice H del paciente mediante una relación matemática.

$$H = \frac{1}{A} \cdot (Abs_2 - B \cdot Abs_1)$$



Corrección de la hemólisis mediante fórmulas matemáticas: No se recomienda

- Si $Hb > 100\text{mg/dL}$ (IH 70): el potasio aumenta en 0.4 mmol/L
- Potasio corregido = $K\text{ medido} - (IH * 0.004)$



Actuación frente a muestras hemolizadas (OMS).

- **No informar muestras deterioradas sin comentario específico. En caso de no poder eliminar la interferencia sustituir el valor de la magnitud por el comentario.**
- **Cuando exista efecto significativo por la hemólisis deben indicarse los límites a partir de los cuales no debe realizarse el análisis.**



Hemólisis en Advia 2400

Hemoglobina			+-	++	+++	++++
	Medias*	LICS*	0,05 g/dL	0,1 g/dL	0,2 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%	(-)	(-)	(-) 31,5%
Bilirrubina esterificada	0,317	0,0292	(-) 200%	(-)	(-)	(-) 2207%

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



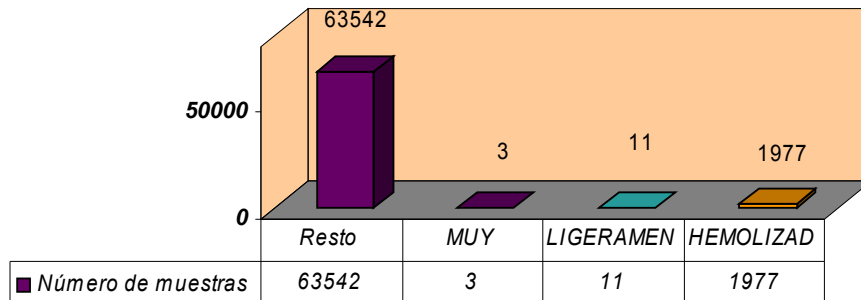
Actuación frente a muestras hemolizadas (OMS).

- No informar muestras deterioradas sin comentario específico. En caso de no poder eliminar la interferencia sustituir el valor de la magnitud por el comentario.
- Cuando exista efecto significativo por la hemólisis deben indicarse los límites a partir de los cuales no debe realizarse el análisis.
- Utilizar métodos alternativos no influidos por la hemólisis en magnitudes cuya determinación se vea afectada.
- Considerar la interferencia como significativa cuando exceda el valor de referencia o error sistemático deseable.
- Distinción entre hemólisis in vivo o in vitro.
- Identificar la causa de la hemólisis, y utilizar material de calidad y personal adecuadamente formado.



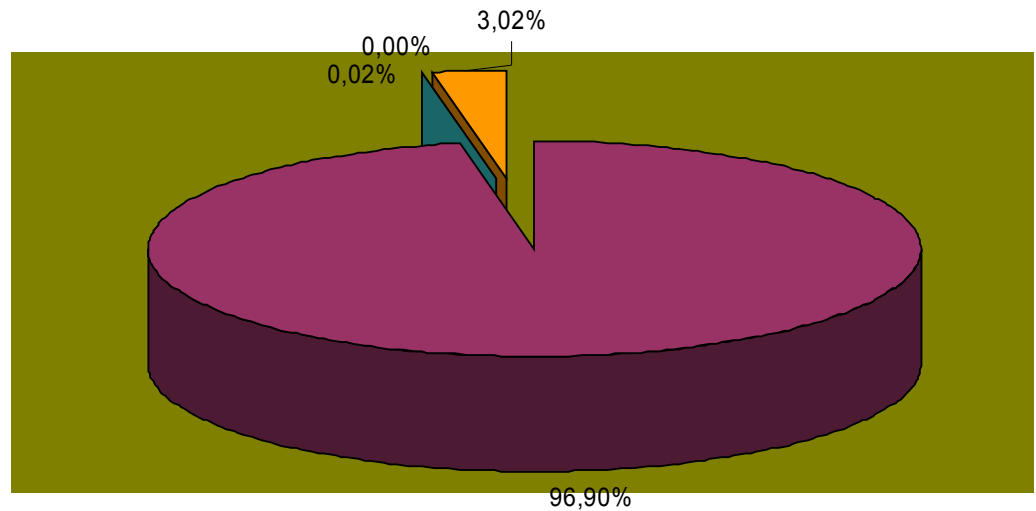
Datos urgencias Enero - Octubre 2012

Hemólisis



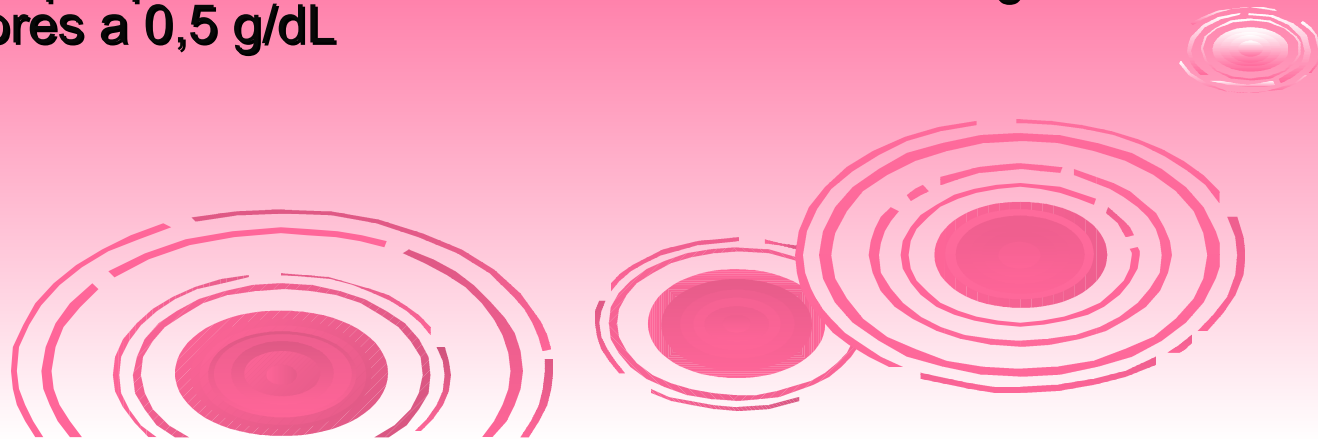
Número de muestras

Muestras de Urgencias



Conclusiones

- **> 95% efecto preanalítico**
- **No realizar las determinaciones, sustituirlas por un comentario y pedir nueva muestra.**
- **Utilizar sistemas automatizados de cuantificación de hemoglobina sérica.**
- **El laboratorio debe establecer la significación del efecto de la hemólisis para cada magnitud.**
- **Rechazar sueros que presenten concentraciones de hemoglobina iguales o superiores a 0,5 g/dL**



**GRACIAS POR SU
ATENCIÓN**

