

EFFECTO DE LA HEMÓLISIS DE LA MUESTRA DE SANGRE CANINA EN EL RESULTADO DE ALGUNOS ANALÍTOS ENZIMÁTICOS¹

Manuela J. Agudelo Vásquez²
Vladimir Ortega Botero³
Martha Olivera-Angel⁴

RESUMEN

Antecedentes: la hemólisis es el proceso de destrucción de los hematíes, que conlleva a la liberación del contenido intraeritrocitario en el plasma alterando su composición. La principal molécula intraeritrocitaria es la hemoglobina, que tiene un espectro de absorción característico del grupo Hem, con un pico de 405 nm y varios picos entre 500-600 nm, lo que produce un color rojizo en el plasma proporcional a la hemoglobina liberada (Figura 1). Se suele definir la hemólisis como la aparición en el plasma de 0,3g/l de hemoglobina, que se considera la concentración mínima detectable visualmente. La hemólisis en las muestras para analizar puede interferir con los resultados, por tanto, si es una prueba mal tomada debe ser una causa de rechazo. En el laboratorio de clínica veterinaria no se tiene un estudio del comportamiento de los distintos analitos, por lo que la importancia de este trabajo se basa en determinar los efectos de la hemólisis en suero canino sobre la lectura de algunos analitos que se solicitan frecuentemente en el laboratorio. **Objetivo:** describir la variación que existe en los resultados de algunos analitos con respecto a la cantidad de hemólisis presente en una muestra. **Método:** el hemograma se realizó por la lectura en el equipo Abacus Junior Vet®; para los analitos se usó el método de Turbidimetría en el equipo

A15 BioSystems Química Clínica. La hemólisis se indujo mecánicamente en diferentes niveles. **Resultados:** se empleó el análisis de varianza con un diseño completamente aleatorizado y se determinaron entre los tratamientos evaluados diferencias estadísticas a niveles de $p < 0,05$; se realizaron además interferogramas que permiten definir el grado de interferencia si lo hubiese. **Conclusión:** la hemólisis en el suero canino tanto leve (0,10 - 1,00 g/l) como marcada (2,51 - 4,5 g/l) interfiere con la lectura de los analitos ALT, la Creatinina y la Urea.

Palabras clave: hemólisis, ALT, Creatinina, Urea, canino, espectrofotometría, interferencia.

EFFECT OF CANINE BLOOD SAMPLES HEMOLYSIS IN THE RESULT OF SOME ENZYME ANALYSES

ABSTRACT

Background: Hemolysis is the destruction process of red blood cells, which involves the release of the intra-erythrocytic content into the plasma altering its composition. The main intra-erythrocytic molecule is hemoglobin, that has a characteristic absorption spectrum of the heme group, with a peak at 405 nm and several

¹ Trabajo financiado por Grupo Biogénesis 2013-2014. Universidad de Antioquia.

² Estudiante Bacteriología y Laboratorio Clínico. Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia.

³ Zootecnista, Laboratorio de leches, Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Antioquia.

⁴ Profesora Titular, Coordinadora Unidad de Diagnóstico, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación Biogénesis. Universidad de Antioquia. Correspondencia y solicitudes de reimpresiones: Martha Olivera-Angel. Calle 70 No. 52-21, Medellín, Colombia. Tel: (57)4- 2199153. Correo electrónico: martha.olivera@udea.edu.co

peaks between 500-600 nm, and produces a reddish color in plasma, proportional to the hemoglobin released (Figure 1). Hemolysis is usually defined as the appearance of 0.3 g/l of hemoglobin in plasma which is considered the minimum visually detectable concentration. Hemolysis in the samples to be analyzed can interfere with the results and therefore, if it is a bad test taking it should be a cause for rejection. The Veterinary Clinic Laboratory does not have a study of the behavior of different analytes, so the importance of the present study is based on determining the effects of hemolysis in canine serum on the reading of some analytes that are frequently requested in the laboratory. **Objective:** To describe the range of variation of the results of some analytes with respect to the

amount of hemolysis in a sample. **Method:** The blood count was performed in the Abacus Junior Vet® equipment; the Turbidimetry method in the BioSystems A15 for Clinical Chemistry was used for the analytes. Hemolysis was induced mechanically. **Results:** Analysis of variance with a completely randomized design was used and statistical differences at $p < 0.05$ levels were determined. Interferograms which allow defining the degree of interference, if any, were carried out. **Conclusion:** Hemolysis in canine serum either mild (0.10 - 1.00 g/l) or severe (2.51 to 4.5 g/l) interferes with the reading of analytes ALT (Alanine Aminotransferase), Creatinine and Urea.

Key words: hemolysis, ALT, Creatinine, Urea, canine, spectrophotometry, interference.

INTRODUCCIÓN

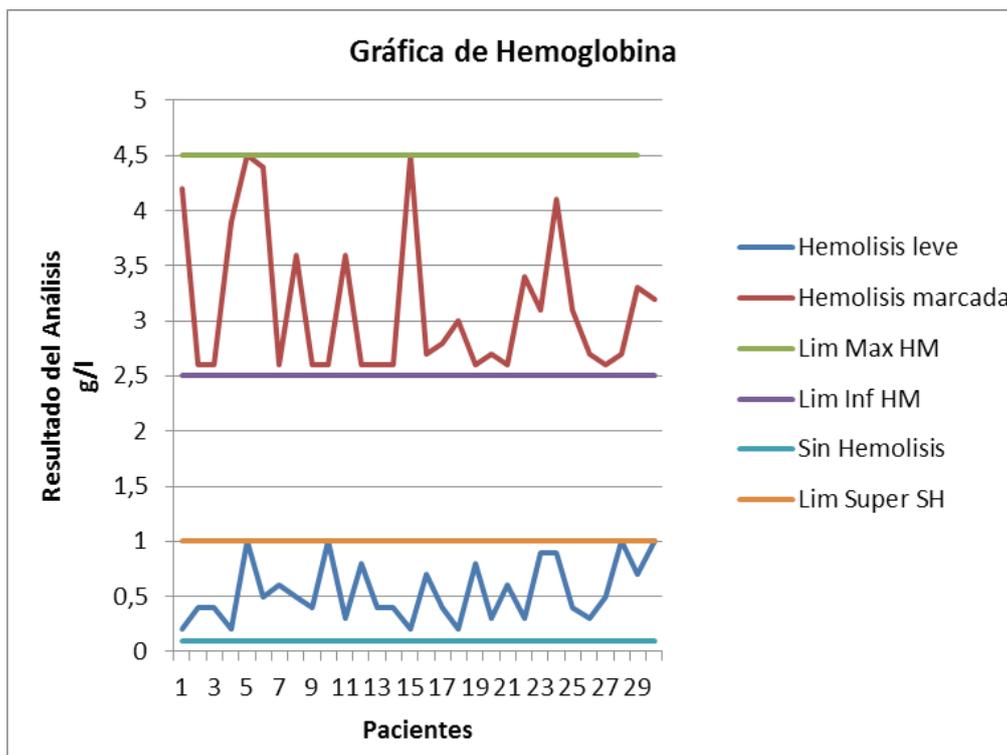
La hemólisis se divide en dos clases *in vitro* e *in vivo*. La hemólisis *in vivo* es propia de enfermedades sanguíneas tanto congénitas como adquiridas, la hemólisis *in vitro* sucede durante la fase pre-analítica de la muestra en el laboratorio (recogida, manipulación y procesado de la muestra). La influencia que la hemólisis tiene sobre los analitos depende de dos factores; uno, es la localización que tiene el analito dentro de la molécula de hemoglobina y el otro, es según su liberación al interior de los hematíes lisados en el plasma sanguíneo que pueden competir en el espectro de absorción con el de la hemoglobina (1).

Con el fin de disminuir los posibles errores dentro de la fase analítica el laboratorio debe tener un protocolo en donde se defina en cómo debe llegar la muestra para que sea aceptada.

Durante mucho tiempo se han llevado a cabo estudios sobre el grado de interferencia de la lipemia, la hemólisis y la ictericia en los laboratorios de clínica humana (2, 3), pero pocos son los que se han realizado en los laboratorios de clínica veterinaria.

Actualmente, está aumentando cada vez más la importancia de los estudios clínicos veterinarios, las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) se definen como el conjunto de reglas, procedimientos operacionales y prácticas establecidas y promulgadas por determinados organismos como la Organization for Economic Cooperation and Development (OCDE), o la U.S Food and Drug Administration (FDA), entre otras, consideradas de obligado cumplimiento para asegurar la calidad e integridad de los datos producidos en los diferentes procesos de laboratorio, con el fin de armonizar protocolos, información y documentación de los Procedimientos Operativos Estandarizados (POE).

El objetivo de este trabajo es el de determinar si el grado de hemólisis interfiere con la lectura de la ALT, la Creatinina y Urea, analitos requeridos con gran frecuencia en la Unidad de diagnóstico de la Facultad de Ciencias Agrarias. Este laboratorio procesa anualmente 4000 y 6000 muestras en caninos.



Gráfica 1. Concentraciones de hemoglobina en los diferentes tratamientos.

Se midieron los siguientes analitos:

Alanina aminotransferasa (ALT): esta enzima se encuentra dentro de las células del hígado. Cuando el hígado presenta una inflamación o lesión, libera la enzima en el torrente sanguíneo.

Creatinina: los riñones sanos retiran la Creatinina de la sangre y la llevan a la orina para que salga del cuerpo. Cuando los riñones no funcionan bien, la Creatinina se acumula en la sangre y, por tanto, es un parámetro que indica la función renal.

Urea: sustancia de desecho del metabolismo proteico. En los riñones la Urea pasa a la orina, por consiguiente, también es un parámetro que da indicios sobre la función renal.

Según los insertos de los analitos del equipo usado la hemólisis no interfiere en el análisis de la ALT, ni en la Creatinina, así como tampoco en

la Urea si la concentración de hemoglobina es menor de < 5 g/l.

La hemólisis es el proceso de destrucción de los hematíes, que conlleva la liberación del contenido intraeritrocitario en el plasma, alterando su composición. La principal molécula intraeritrocitaria es la hemoglobina, que tiene un espectro de absorción característico del grupo Hem, con un pico de 405 nm y varios picos entre 500-600 nm, lo que produce un color rojizo en el plasma proporcionado por la hemoglobina liberada. Se define la hemólisis como la aparición en plasma de más de 0,3g/l de hemoglobina, que se considera la concentración mínima detectable visualmente (1, 2).

Con el fin de confirmar las recomendaciones de la casa productora, que aunque vende el equipo para análisis veterinario, las pruebas están desarrolladas en humanos, por lo que fue necesario diseñar este experimento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

Los caninos muestreados para este trabajo son procedentes del municipio de Medellín (Antioquia, Colombia) y sus alrededores, a una altura de 1479 msnm. El estudio se realizó en el Laboratorio Clínico Veterinario de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia, en la sede Robledo (Medellín, Antioquia).

Intervalo biológico de referencia (4)

Caninos en la Universidad de Antioquia de la Facultad de Ciencias Agrarias.

ALT: 3 -50U/L.

Creatinina: 0,5 - 1.5mg/dl.

Urea: 9,3 - 65,2mg/dl.

Marcadores de hemólisis (5).

Sin hemólisis (0 - 0,1 g/l).

Hemólisis leve (0,10 - 1,00 g/l).

Hemólisis marcada (2,51 - 4,5 g/l).

Tratamientos empleados

El estudio se llevó a cabo induciendo dos grados de hemólisis para todas las muestras de sangre de cada uno de los pacientes, obteniendo tres tratamientos para cada analito evaluado.

TTO: Análisis de la muestra inicial sin hemólisis.

TT1: Análisis de la muestra con inducción de hemólisis leve.

TT2: Análisis de la muestra con inducción de hemólisis marcada.

Población y muestra

Se usaron 30 muestras que fueron remitidas al laboratorio para examen prequirúrgico de rutina (hemograma y química sanguínea); los pacientes caninos habían sido programados para cirugía de castración en condiciones de bienestar animal. Previa a la sedación el Médico

Veterinario procedió tomar una prueba de sangre para suero y para plasma (EDTA) (11), de todas las edades sin importar el sexo.

Mediciones bioquímicas

1. El hemograma se realiza con un método sistematizado por medio del equipo Abacus Junior Vet®. Aquellas muestras con parámetros normales se alicuotaron y se les indujo hemólisis moderada o severa.
2. Para química sanguínea se centrifugan las muestras y el suero se pasa por el equipo automatizado A15 BioSystems Química Clínica (6), que se basa en espectrofotometría. Allí se programa para leer ALT, Creatinina y Urea.
3. La hemólisis se induce mecánicamente utilizando un palillo de madera, homogenizando la muestra suavemente de tal manera que se libere hemoglobina y se obtenga una hemólisis leve o severa que se cuantifica en el equipo de hematología. Posteriormente, se centrifuga y se leen los analitos ALT, Creatinina y Urea en el equipo de química A15 BioSystem.

Análisis estadístico

Se hizo estadística descriptiva y posteriormente un diseño totalmente aleatorizado. Para analizar las interferencias que existen entre los dos grados de hemólisis (leve y moderada) (7) con respecto a las concentraciones de ALT, Creatinina, Urea y, a su vez, las distintas interferencias entre cada uno de los grados de hemólisis con respecto a la relación que tienen con cada analito, usando un diseño totalmente al azar ANOVA, mientras que con prueba de Turkey se compararon las medias. Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con el programa SAS (2001), con un nivel de significancia de 5 %.

Clasificación de interferencia: se midió y clasificó según lo reportado por [Castano y Alcain \(1989\)](#) usando la siguiente ecuación:

Ecuación $(C/C_0) \times 100 - (p I)$.

C= concentración experimental del constituyente en estudio.

C₀=concentración teórica o inicial.

I = concentración del interferente (máx.=máxima).

p = pendiente recta regresión.

Se describe brevemente la interpretación de los resultados. La interferencia nula comprende la máxima concentración tolerable que es el mayor valor del intervalo biológico de referencia para caninos: 0,45g/dl, 50U/l, 135umol/l, 23,28umol/l para hemoglobina, ALT, Creatinina y Urea, respectivamente; se permite hasta un 5 % del valor inicial ($105 > C/C_0 > 95$). Interferencia positiva incluye aquellos resultados que se desvían más del 5 %, pero menos del 20 % ($120 > C/C_0 > 105$), interferencia negativa aquellos que se desvían más del -5 %, pero menos del -20 % ($80 > C/C_0 > 95$). Interferencia fuertemente positiva incluye aquellos resultados que se desvían más de un 20 % ($C/C_0 > 120\%$) del resultado inicial, con interferencia fuertemente negativa resultados que se desvían de un -20 % ($C/C_0 < 80\%$) (8).

RESULTADOS

De los 30 pacientes que se incluyeron en el estudio, en el TT1, se descartó una muestra porque no cumplió los parámetros de linealidad (FDL) en los analitos ALT y Urea.

En la Gráfica 2, se presentan los resultados de las diferentes concentraciones de hemoglobina cuando se consideraron leves y marcadas.

En las Gráficas 3, 4 y 5, se grafican los resultados de ALT, Creatinina y Urea, a diferentes rangos de hemoglobina, comparadas con el control. El efecto de la hemólisis sobre la ALT en ambos tratamientos presenta diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a la creatinina el TT0 presenta diferencia significativa ($p < 0,05$) con el TT2. Con respecto a la Urea el TT1 no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$), pero si entre en el TT0 y TT2 ($p < 0,05$).

Los promedios de las lecturas encontradas en las variables se observan en la Tabla 2.

Tabla 1. Promedios y desviación estándar de los resultados en cada uno de los tratamientos.

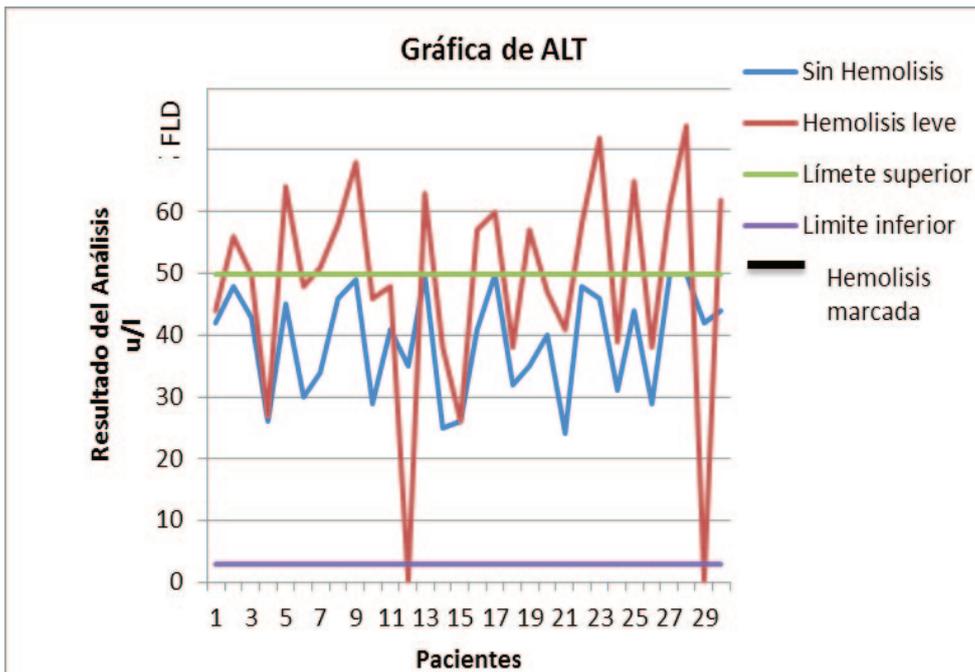
Trat	Variable ²	min	max	Prom ³	DE ⁴
TT0 ¹	Hemoglobina ⁵	0	0	0,00	0
	ALT	24	50	39,17	8,6745
	Creatinina	0,68	1,5	1,11	0,2148
	Urea	15,8	54,1	35,93	10,292
TT1	Hemoglobina	0,2	1	0,54	0,2712
	ALT	26	74	52,00	12,617
	Creatinina	0,77	7,25	1,45	1,1271
	Urea	17,9	62,5	37,84	11,05
TT2	Hemoglobina	2,6	4,5	3,14	0,6578
	ALT	*	*	*	*
	Creatinina	0,86	2,59	1,56	0,4448
	Urea	28,7	112,4	59,64	24,125

¹TT0= Sin Hemólisis; TT1= Hemólisis leve; TT2= Hemólisis marcada. ²A= Hemoglobina; B= ALT; C=Creatinina; D=Urea. ³Prom= Promedio. ⁴DE = Desviación Estándar. ⁵No hay lisis celular de glóbulos rojos. ^{6*} Por Fuera del Límite de Linealidad el equipo.

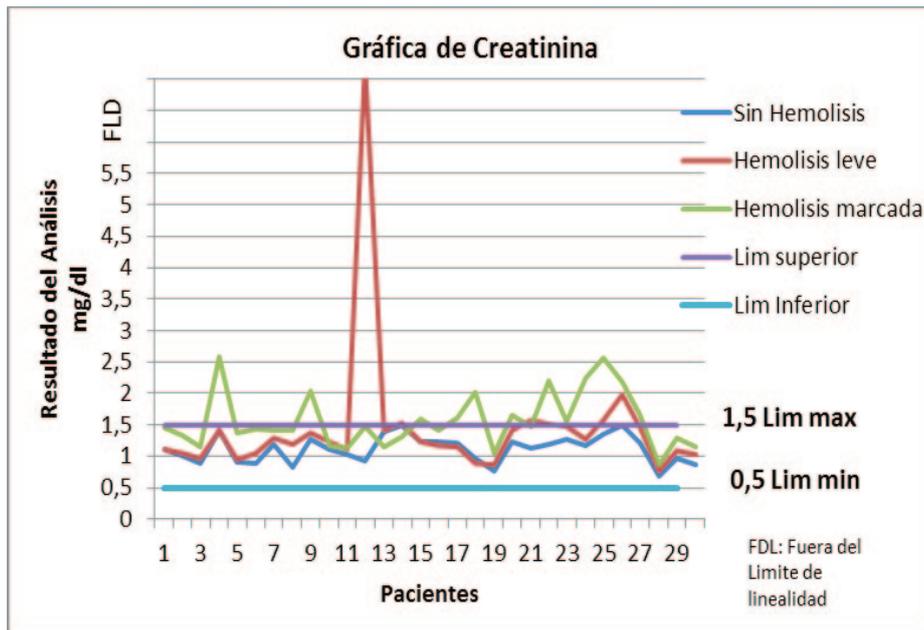
Tabla 2. Interferencia causada por Hemólisis.

TTT	Analíto	Interferencia	r ¹
Hemólisis leve	ALT	Positiva	0.84
	Creatinina	No hay interferencia	0.03
	Urea	Fuertemente Positiva	0.913
	ALT	FLL	---
Hemólisis Marcada	Creatinina	Positiva	0.558
	Urea	Positiva	0.597

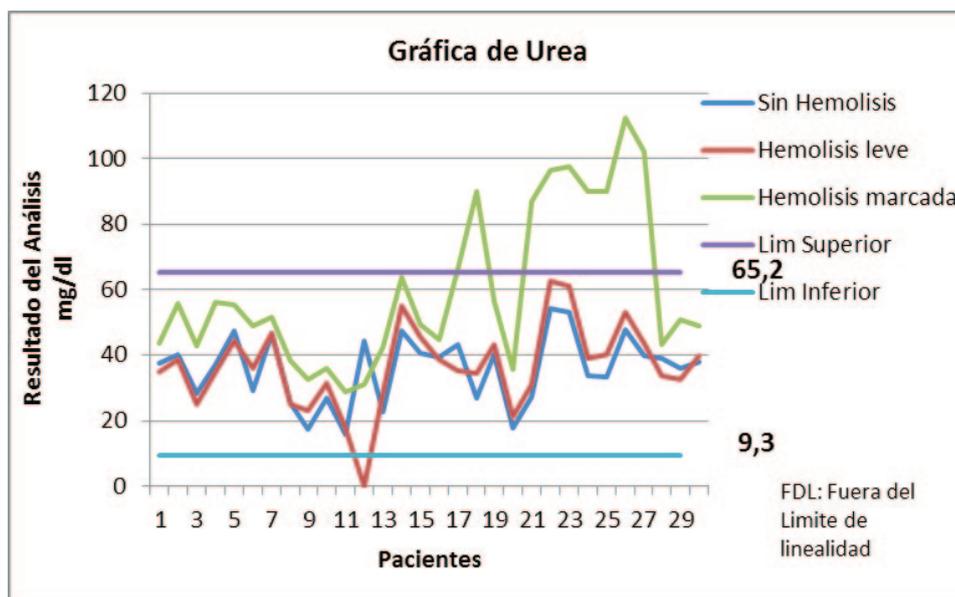
¹Coficiente de Pearson.



Gráfica 2. Concentraciones de ALT en los diferentes tratamientos.



Gráfica 3. Concentraciones de Creatinina en los diferentes tratamientos.



Gráfica 4. Concentraciones de Urea en los diferentes tratamientos.

DISCUSIÓN

Cuando el suero de un paciente presenta marcada hemólisis se ve reflejado en interferencias frente a los distintos analitos como son Creatinina y Urea, y en más alto grado frente a la ALT. La ALT y Urea son cromógenos que producen interferencia espectral (9), encontrándose en la literatura que producen modificaciones a diferentes concentraciones entre distintos analitos.

Es posible que la concentración de ALT se vea modificada por la fuerza iónica, viscosidad, turbidez y tensión superficial. La interferencia entre este analito puede ser alterada porque reacciona de forma inespecífica con el constituyente analizado o se destruye algún producto intermedio de la reacción.

En el caso de la Creatinina la interferencia producida por la hemólisis se da porque la hemoglobina es fácilmente oxidable en medio básico fuerte lo que forma compuestos incoloros con el analito (9). Para el analito de Urea la interferencia producida por la hemólisis es positiva y aumenta su resultado cuando es mayor la hemólisis.

En cada uno de estos casos, la interferencia está dada por la absorción de la hemoglobina en el mismo rango de longitudes de onda utilizados en la lectura de los métodos colorimétricos empleados.

Los insertos que traen los reactivos para usar en el equipo para la ALT y la Creatinina refieren que no hay interferencia con hemólisis en concentraciones de hemoglobina de 10gr/l. Sin embargo, con la ALT la interferencia con hemólisis a partir de 0,10 g/l ya se evidencia. Para la creatinina en hemólisis marcada a partir de 2,51 g/l se encontró interferencia.

El inserto de la Urea refiere que con hemoglobinas >5 g/l se presenta interferencia, sin embargo, nosotros reportamos que a partir de 0,10gr/l ya se encuentra interferencia positiva. Como lo concluido por Rioja (2009) (10) la influencia de la hemólisis en una magnitud, depende de la metodología usada, en este caso la diferencia de resultados con respecto a lo que dice el inserto, son relevantes, ya que aunque el equipo sirve para uso veterinario, no se han validado las interferencias. Por tanto, los resultados que presentamos son importantes en la medida en que difieren de las interferencias validadas para sueros humanos.

Actualmente, según la Resolución ICA 3823 de 2013, se pide que los laboratorios veterinarios tengan implementado un manual que se ajuste a la norma ISO 17025, lo que hace que sea muy importante determinar la calidad de la muestra que se puede recibir (uno de los parámetros de la fase pre analítica). Lo que reporta (3) los errores en las muestras que llegan con mayor frecuencia, son los que se refieren a la calidad de la muestra recibida en el laboratorio: muestra hemolizada, lipémica, insuficiente o coagulada. Por eso, consideramos importante que se realicen este tipo de trabajos de validación e interferencia.

CONCLUSIONES

La hemólisis en cantidad leve o marcada interfiere en la medición de ALT, Creatinina y Urea. Por consiguiente, no deben recibirse sueros con ningún grado de hemólisis para leer estos analitos.

AGRADECIMIENTO

Grupo Biogénesis 2013-2014.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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. *Revista del Laboratorio Clínico* 2010; 3 (1): 25-30.
2. Blank DW, Kroll MH, Ruddel ME, Ellin RJ. Hemoglobin interference from in vivo hemolysis. *Clin Chem* 1985; 31 (9): 1566-1569.
3. Gómez Rioja R, Alsina Kirchner MJ, Álvarez Funes V, Barba Meseguer N, Cortés Rius M, Llopis Díaz MA. et al. Hemólisis en las muestras para diagnóstico. *Revista del Laboratorio Clínico* 2009; 2 (4): 185-195.
4. Geffré A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun JP. Reference values: a review. *Vet Clin Pathol* 2009; 38(3): 288-98
5. Mehmet K, Aysel H, Aysenur A. and Serap C. Effects of hemolysis interference on routine biochemistry parameters. *Biochemia Medica* 2011; 21 (1): 79-85.
6. BioSystems (s.f.). Biolinker. [Internet] Disponible en: http://www.biolinker.com.ar/productos/PDF_BIO/a15.pdf. Consultado Marzo 2013.
7. Simundic AM, Nikolac N. et al. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: Can we rely on a human eye? *Clinical chemistry and laboratory medicine* 2009; 47 (11): 1361-1365.
8. Castano Vidriales JL. Interferencias causadas por la bilirrubina, hemoglobina y hemólisis en la determinación de 15 constituyentes séricos. *Química Clínica* 1989; 8 (1): 47-55.
9. Sánchez Rodríguez RC. Ecuaciones para eliminar la interferencia de sueros hemolisados, ictericos e hiperglucémicos en las determinaciones rutinarias de química clínica. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal* 2002; 27 (2): 46-52.
10. Vidriales M, Clar MD, Lecha HD, Fernández M, Vizcaíno S. Errores relacionados con el laboratorio clínico. *Química Clínica* 2007; 26 (1): 23-28.
11. Morton DB, Abbot D, Barclay R, Close BS, Ewbank R, Gask D. et al. Removal of blood from laboratory mammals and birds. First Report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFA W Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim* 1993; 27 (1): 1-22.