

Hemolisis como influencia y factor de interferencia

Prof. Dr. L. Thomas, Kirschbaumweg 8, 60489 Frankfurt, Deutschland

E-mail: th-books@t-online.de

Introducción

La hemólisis es un importante factor de interferencia para los resultados del laboratorio, por lo que este efecto no debería olvidarse. A causa de la mecanización analítica y al incremento de la automatización de la fase pre-analítica de los laboratorios, el examen de las muestras hemolizadas es a menudo insuficiente. Debido a la concentración de laboratorios las muestras de sangre sufren largos desplazamientos. Como consecuencia se produce un incremento de las muestras hemolizadas, y a pesar de que ésta hemólisis pueda no ser, en muchas ocasiones, apreciada visualmente, puede haberse producido una descarga de los componentes intracelulares al plasma. Si hay muestras de pacientes con síndrome hemolítico (hemolisis in vivo), la separación de la hemólisis in vitro, en general debido a una inapropiada extracción de sangre, rara vez es posible.

Las consecuencias son, a menudo, resultados erróneos en el análisis. Estas variaciones pueden ser muy altas o por el contrario muy bajas o también sorprendentes resultados patológicos, por ejemplo en la medida de las concentraciones de ion potasio, lactato-deshidrogenasa, lactato-deshidrogenasa, aspartato-aminotransferasa, aspartato-aminotransferasa, fosfatasa ácida, g,g-fosfopiruvato-hidratasa (enolasa específica de neurona).

El objetivo de este estudio es precisar el alcance de la interferencia producida por la hemolisis en los resultados de laboratorio y la disminución de extracciones erróneas de sangre.

Hemólisis

La hemólisis es la liberación de los componentes intracelulares de eritrocitos, trombocitos y leucocitos en el líquido extracelular, ej. dentro del plasma o suero /1/. La hemólisis es visible después de la centrifugación de la muestra; plasma o suero, muestran una coloración roja. La especificación, en el estudio, se encuentra en la concentración de hemoglobina libre, la cual viene indicada por una coloración roja en el plasma/suero que varía entre 100 y 300mg/l.

La hemólisis puede dar alteraciones en magnitudes específicas de la muestra a analizar. Es un factor biológico que influye si la liberación de constituyentes de células sanguíneas tuvo lugar in vivo. La hemólisis es un factor de interferencia, si ésta tiene lugar después de la recolección de la muestra, esto puede producir cambios en los resultados./ 2/

La lisis de trombocitos y granulocitos también puede influir en los resultados a pesar de que la hemólisis no sea visible /3/. Si observamos minuciosamente el proceso de coagulación, la trombocitolisis es la responsable de la alta concentración de componentes intracelulares en el suero en oposición a la del plasma. Una degradación intravascular de leucocitos puede conducir, por ej.: concentraciones elevadas de lisozima en leucemias mieloides y monocíticas.

Causas de hemólisis

Si observamos, en la fase preanalítica, el centrifugado de las muestras sanguíneas, la hemólisis representa el 60 % de las causas de rechazo de las muestras. En un estudio /4/ el 3,3 % de las muestras que fueron enviados al laboratorio clínico presentaron hemólisis. Cuando se comprobó la causa, sólo el 3,2% de in vivo hemólisis se produjeron in vivo.

Hemólisis in vitro

Durante la toma de muestras se pueden producir incorrecciones que conduce a hemólisis in vivo (Tabla 1). En la tabla 2 se exponen con detalle nuevas posibilidades de incorrecciones.

Tabla 1: Hemólisis mas frecuente mientras se efectúa la recogida de muestras en sangre

- Aspiración intensa, particularmente durante la punción superficial de las venas. La aspiración por medio de agujas finas suele causar menos hemólisis que con agujas gruesas. Sin embargo el flujo de corriente es más bajo y la velocidad de fluido, turbulencia y hemólisis se supone que son menores. /5/
- la obstrucción parcial de un catéter venoso o arterial. La consecuencia es una aspiración más intensa si la muestra es extraída con una jeringa.
- Extracción con una jeringa y después repartir alicuotas en varios tubos de ensayo.

Tabla 2: Causas de hemólisis después de la recogida de muestras de sangre

- agitación de la sangre vigorosamente
- centrifugación de la sangre antes de la completa coagulación
- centrifugación de muestras parcialmente coaguladas procedentes de pacientes con medicación de anticoagulantes
- presión positiva o negativa en los tubos de muestra
- dilución de la sangre con solución hipotónica
- congelación y descongelación de la sangre
- almacenamiento o transporte de sangre durante varios días a temperatura ambiente

Hemólisis in vivo

La hemólisis in vivo está provocada preferentemente por medio de anticuerpos, bioquímicamente a través de medicamentos, sustancias tóxicas, herencia (por ej.

hemoglobinopatía, defectos enzimáticos, ictericia) o infecciones (por ej. malaria). Si se sospecha una hemólisis in vivo se deberá examinar el plasma para excluir una hemólisis in vitro añadida /1/ causado por un proceso de la coagulación.

Detección de la hemólisis

La hemólisis es visible en muestras no ictericas. Una coloración roja en el suero y en el plasma es apreciada si la concentración de hemoglobina libre esta por encima de 300 mg/l. La medición de la concentración de hemoglobina libre por debajo de este valor se hace por inmunofelometría /7/ o espectrometría usando doble longitud de onda (por.ej. ACA). El límite superior para plasma es 20 mg/l, para suero 50 mg/l.

Cambios en el plasma/suero debidos a la hemólisis

La hemólisis in vivo o in vitro, con la consiguiente liberación de sustancias de las células sanguíneas, donde la concentración intracelular es 10 veces mayor que en el medio extracelular, puede incrementar los resultados de plasma y suero significativamente . Particularmente en lo concerniente a ion potasio, lactato-deshidrogenasa y aspartato-aminotransferasa. Las sustancias cuyas concentraciones son más altas en suero que en plasma proceden de los trombocitos, por.ej. potasio, g,g-fosfopiruvato-hidratasa, fosfatasa ácida. Los indicadores de una hemólisis están expuestos en la tabla 3.

Tabla 3: Indicadores de hemólisis

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">• coloración roja del plasma o suero• imprevisto incremento en potasio, lactato-deshidrogenasa, aspartato-aminotransferasa, fosfatasa ácida, enolasa g,g-fosfopiruvato-hidratasa• disminución de la concentración de haptoglobina• subida de bilirrubina no esterificada• aumento del índice de reticulocitos |
|---|

Diferenciación de la hemólisis in vivo e in vitro

Aún cuando la hemólisis in vitro es más frecuente que la in vivo, ésta última tiene una importancia clínica mayor debido a su origen patológico y porque los parámetros, influidos por hemólisis, son importantes para el diagnóstico, seguimiento y monitorización terapéutica de las enfermedades. En caso de diagnosticar hemólisis in vivo no tiene ningún sentido rechazar una muestra. Por esta razón se ha de efectuar una diferenciación del tipo de hemólisis (in vitro, in vivo).

La hemoglobina liberada in vivo, esta unida a la haptoglobina y transportada preferentemente al bazo hacia el sistema reticuloendotelial. La hemoglobina libre es sólo cuantificable en plasma si la capacidad de transporte esta en su límite. Por ello la haptoglobina no es cuantificable por métodos inmunofelométricos o inmunoturbidimétricos. Pueden cuantificarse concentraciones de haptoglobina dentro del margen de referencia aunque al mismo tiempo haya una respuesta de fase aguda (aumento de CRP) en pacientes con hiperesplenismo. Aumentos de la concentración de haptoglobina y

de hemoglobina libre es constatado en pacientes con plasmocitoma. /8/

En el síndrome de HELLP la concentración haptoglobina del plasma puede ser normal durante el diagnóstico, sin embargo disminuirá en los diez días siguientes./10/

Cuando se sospecha un síndrome hemolítico, el descenso de haptoglobina y el aumento en lactato-deshidrogenasa, bilirrubina indirecta no esterificada e índice de reticulocitos dependerán del grado de hemólisis. Para estados de hemólisis avanzada, cambios en lactato-deshidrogenasa, bilirrubina no esterificada y haptoglobina pueden ocurrir durante las 24 horas siguientes, sin embargo, un aumento del índice de reticulocitos ocurre como muy pronto 2 días más tarde. Un aumento de la bilirrubina no esterificada puede ser cuantificable solo si la tasa de hemólisis que normalmente es 0,8 %, sube por encima del 5 %. Un aumento de lactato-deshidrogenasa en hemólisis intravascular es sólo medida, si el índice de reticulocitos está por debajo del 10 %. En un sujeto con una actividad de lactato-deshidrogenasa de 165 U/l, una hemólisis in vitro de 800 mg de hemoglobina en suero, causa un 58% de aumento en la actividad de lactato-deshidrogenasa./10/. Una hemólisis intravascular masiva con una disminución del hematocrito de más de una cuarta parte en 12 horas, puede causar una hipertrigliceridemia. Las causas pueden ser un reducido metabolismo de triglicéridos causado por una disminución de micro-circulación o movilización de ácidos grasos libres y su re-esterificación a triglicéridos. /11/. En la tabla 4 se exponen los criterios para distinguir la hemólisis in vitro e in vivo.

Tabla 4: Diferentes tipos de hemólisis

Hemólisis in vitro

- Incremento paralelo de las concentraciones de hemoglobina (coloración roja del plasma/suero), ion potasio, lactato-deshidrogenasa, aspartato-aminotransferasa, sin embargo las concentraciones de haptoglobina y de reticulocitos se mantienen dentro de los intervalos fisiológicos.
- Aumento imprevisto de la concentración de ion potasio, pero no se da la coloración roja en el plasma/suero, lactato-deshidrogenasa en el intervalo fisiológico. Ej: si toda la sangre es almacenada varios días.

Hemólisis in vitro

- Incremento paralelo de la concentración de hemoglobina (coloración roja del plasma/suero) y lactato-deshidrogenasa pero no se da un aumento paralelo en la concentración de ion potasio.
- No hay coloración roja del plasma, pero hay un descenso de la concentración de haptoglobina y un incremento potencial de las concentraciones lactato-deshidrogenasa, bilirrubina o de reticulocitos.
- Suero/plasma sin coloración roja, pero incremento en lactato-deshidrogenasa, potasio, fosfatasa ácida. No se da un moderado incremento en las unidades de medida en plasma (esto se ha advertido en el estado de la trombocitosis).

Hemólisis como factor de interferencia

La liberación de sustancias de las células sanguíneas al plasma pueden producir cambios del valor de algunas magnitudes por las siguientes razones:

- Incremento o descenso de las concentraciones obtenidas debido al gradiente de concentración entre los eritrocitos y el plasma.
- Interferencia de la reacción química mientras se produce la liberación de sustancias de las células sanguíneas (la actividad pseudoperoxidásica de la hemoglobina interfiere la medición de la concentración de bilirrubina y la liberación de adenilato-cinasa interfiere la medición de la concentración de creatina-cinasa, por ejemplo).
- La hemoglobina en una muestra puede interferir con la reacción química, porque cambia los coeficientes de absorción molar del substrato o de los productos de reacción que deber ser medidos. La hemoglobina absorbe vigorosamente luz a 415 nm. La hemólisis aumenta la absorción y causa aparentemente un incremento de la concentración medida.

Existen numerosas publicaciones sobre las interferencias causadas por la hemoglobina en los análisis químic-clínicos.. /12-14/. En la tabla 5 se expone una relación de las magnitudes frecuentemente interferidas por la hemólisis.

Tabla 5: Interferencias en las magnitudes y los métodos.

Magnitud, métodos Comentarios Aspartominotransferasa AST

La actividad catalítica de aspartato-aminotransferasa en los eritrocitos es 40 veces mayor que en el plasma.. En sujetos con una concentración de aspartato-aminotransferasa en el intervalo fisiológico, una hemolisis con una concentración de hemoglobina de 1,5 g/l provoca un aumento de la concentración de aspartato-aminotransferasa en el plasma

Bilirrubina

Con el método Jendrassik-Gróf se produce una disminución de la concentración debido a que la actividad pseudoperoxidásica impide la formación del diazo-compuesto coloreado. Esta reacción puede producirse si la concentración de hemoglobina en el plasma es mayor de 0,8 g/l. /12/

Creatina-cinasa

La liberación de la adenilato-cinasa de los eritrocitos incrementa la concentración catalítica de creatina-cinasa y de su isoenzima M. La adenilato-cinasa añadida a la mezcla de la reacción química no puede ser inhibido por el AMP y el diadenosinpetafosfato. El resultado es un incremento de la señal medida.

Hierro

Potencialmente la hemoglobina es un gran fuente de hierro. Sin embargo, el efecto aditivo

del hierro es insuficiente porque la unión hierro-porfirina es más intensa que la unión hierro-transferrina y los métodos de medida de la concentración de hierro sólo miden el hierro procedente de la transferrina.

Proteína

El efecto aditivo de la hemoglobina a la totalidad de proteína es pequeño, pero significativo.

Urato

Sólo las altas concentraciones de hemoglobina causan una disminución de la concentración de urato en el plasma. El método de la uricasa-catalase (reacción Kageyama) es más susceptible a esta interferencia que el método de la peroxidasa.

Ion potasio

La concentración de ion potasio en los eritrocitos es aproximadamente 25 veces mayor que en el plasma. La concentración de ion potasio se eleva, a pesar de que el color rojo propio de la hemólisis in vitro no es visible. Esto puede producirse si una muestra de sangre con una concentración de glucosa baja se almacena varias horas a temperatura ambiente.

Fosfato

Las células sanguíneas tienen una proporción alta de fosfato, del cual la mayor parte es orgánico. La adición de ésteres de fosfato al plasma puede producir una liberación de fosfato inorgánico, y la consecuencia puede ser una concentración muy alta de fosfato, que es errónea. Por esta razón el suero/plasma debería desprenderse de los eritrocitos en dos horas.

Electroforesis de las proteínas séricas

Los complejos hemoglobina-haptoglobina migran entre las fracciones α_2 y β globulinas, la hemoglobina libre se aprecia como una banda difusa en la fracción β .

Inmunoensayos

El estudio de la interferencia por la hemólisis para los procedimientos inmunoquímicos los fabricantes de productos diagnósticos lo realizan de forma comparable al resto de procedimientos de medida químico-clínicos. No obstante, para estos estudios los fabricantes a menudo sólo añaden hemoglobina a las muestras, principalmente se utiliza metahemoglobina humana. Debe diferenciarse la interferencia causada por la hemoglobina de la causada por la hemólisis, ya que las células sanguíneas contienen también otros productos, además de hemoglobina, que pueden afectar el procedimiento inmunoquímico. Por lo tanto es muy importante preguntar al fabricante cómo han sido realizados estos estudios.

Literatura:

1. Guder W. Haemolysis as an influence and interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; 24: 125-6.
2. Guder W. Einflußgrößen und Störfaktoren bei klinisch-chemischen Untersuchungen. *Internist* 1980; 21:533-42
3. Guder W. Fonseca-Wollheim F. Heil W. Schmitt M, Töpfer G. Wisser H.Zawta B. Die hämolytische, ikterische und iipämische probe. Empfehlungen zur Erkennung und Vermeidung klinisch relevanter Störungen. *DG Klinische Chemie- Mitteilungen* 1999; 30: 167-77./
4. Carraro P. Servidio P, Plebani M. Hemolyzed specimens: a reason for rejection or clinical challenge? *Clin Chem* 2000; 46: 306-7.
5. Moss G, Staunton C. Blood flow, needle size and hemolysis. Examining an old wives' tale, *N Engl J Med* 1970, 282, 967
6. Heins M, Hell W. Withold W, Storage of serum or whole blood samples? Effects of time and temperature on 22 serum analytes. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995, 33: 231.8
7. Lammers M. Gressner AM. Immunnephelometric quantification of free hemoglobin. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987, 25:363-7.
8. Lohse A. Schmitz-Reinhard B. Hyperhaptoglobinämie bei Plasmozytom und Hämolyse. *Dtsch Med Wschr* 1985, 110:1433-4.
9. Wilke G, Rath W, Schutz E, Armstrong VW, Kuhn W. Haptoglobin as a sensitive marker of hemolysis in HELLP-syndrome. *Int J Gynecol Obstet* 1992, 39: 29-34
10. Podiasek SJ, McPherson RA. New lactate dehydrogenase-IgM complexes, *Laboratory Medicine* 1989, 20:617-9
11. Druml W, Grimm G, Laggner AN, Schneeweiß B, Lenz K. Hyperllpdemia in acute hemolysis. *Klein Wochenschr* 1991; 69: 426-9.
12. Sonntag O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem* 1986; 24; 127-39
13. Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. *Clin Chem* 1986,32:470-5
14. Grafmeyer D, Bondon M, Machon M, Levillain R, The influence of bilirubin, haemolysis and turbidity on 20 analytical tests performed on automatic analyzers, *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33:31-52