



Universidad de Oviedo

Universidad de Oviedo

Grado de Enfermería

**IMPACTO DE LOS FACTORES PREANALÍTICOS EN
LA SEGURIDAD DEL PACIENTE: EFECTO DE LA
HEMÓLISIS IN VITRO EN PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

Trabajo Fin de Grado

Nombre de la Autora

Sofía Larios Orobio

Nombre Tutora

M^a Belén Prieto García

Nombre Cotutora

Alejandra Fdez. Fdez.



Universidad de Oviedo

M^a Belén Prieto García, Doctora en Bioquímica por la Universidad de Oviedo, Facultativo Especialista de área en Bioquímica Clínica del HUCA y profesora Asociada en Ciencias de la Salud, vinculada al departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Alejandra Fernández Fernández, Doctora en Bioquímica por la Universidad de Oviedo, Facultativo Especialista de área en Bioquímica Clínica del HUCA.

CERTIFICAN:

Que el Trabajo Fin de Grado presentado por D/Dña. Sofía Larios Orobio, titulado “IMPACTO DE LOS FACTORES PREANALÍTICOS EN LA SEGURIDAD DEL PACIENTE: EFECTO DE LA HEMÓLISIS IN VITRO EN PRUEBAS BIOQUÍMICAS”, realizado bajo nuestra dirección, reúne a nuestro juicio las condiciones necesarias para ser admitido como Trabajo Fin de Grado de Enfermería.

Y para que así conste donde convenga, firman la presente certificación en Oviedo a 9 de Abril de 2020.

V^o B^o

V^o B^o

Fdo. M^a Belén Prieto García

Fdo. Alejandra Fernández Fernández

Director/Tutor del Proyecto

Cotutor del Proyecto



Universidad de Oviedo

RESUMEN

La interferencia por hemólisis es una de las principales causas de error en el laboratorio clínico, pudiendo causar resultados erróneos en muchas magnitudes bioquímicas y comprometiendo la seguridad del paciente. En la mayoría de los casos, la hemólisis es un efecto preanalítico evitable, producido durante la obtención de la muestra o el transporte de la misma al laboratorio. La técnica de extracción va a desempeñar un papel importante en la calidad de la muestra, de ahí la importancia de la existencia de procedimientos estandarizados y la formación continuada del personal de enfermería.

En el laboratorio clínico, es necesario conocer cómo interfiere la hemólisis de las muestras en las diferentes magnitudes bioquímicas para evitar informar resultados erróneos.

El objetivo de este trabajo es conocer y cuantificar el grado de interferencia por hemólisis en una magnitud bioquímica, la aldolasa.

Mediante la adición de concentraciones crecientes de hemoglobina a las muestras, se comparó el valor medido de aldolasa en ausencia o presencia de interferencia, calculando el porcentaje relativo de desviación de la concentración de aldolasa con respecto a la muestra sin interferente. Se consideró una interferencia analíticamente significativa cuando el porcentaje de desviación es superior al 10%, error máximo permitido por el laboratorio para esta magnitud.

ABSTRACT

Interference by hemolysis is one of the main causes of error in the clinical laboratory. It can cause erroneous results in many biochemical magnitudes and compromise patient safety. In most cases, hemolysis is an avoidable pre-analytical effect, produced during sample collection or transport to the laboratory. The extraction technique will play an important role in



Universidad de Oviedo

the quality of the sample, hence the importance of standardized procedures and continuous training of nursing staff.

In the clinical laboratory, it is necessary to know how the hemolysis of the samples interferes with the different biochemical magnitudes in order to avoid reporting erroneous results.

The objective of this work is to know and quantify the degree of interference by hemolysis in a biochemical magnitude, the aldolase.

By adding increasing concentrations of hemoglobin to the samples, the measured value of aldolase was compared in the absence or presence of interference, calculating the relative percentage of deviation of the aldolase concentration with respect to the sample without interference. An analytically significant interference was considered when the percentage deviation is greater than 10%, which is the maximum error allowed by the laboratory for this magnitude.

Palabras clave: laboratorio, hemólisis, aldolasa, hemoglobina, interferencia analítica, enfermería

Keywords: laboratory, hemolysis, aldolase, hemoglobin, analytical interference, nursing



Universidad de Oviedo

INDICE

Lista de abreviaturas	6
INTRODUCCIÓN	7
Error y seguridad del paciente	7
Fase preanalítica: importancia de la toma de muestra	7
La hemólisis: causas principales, tipos e impacto analítico	8
ALDOLASA: utilidad clínica e impacto de la interferencia por hemólisis	9
OBJETIVO	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Preparación de las muestras	13
➤ <i>Preparación de las disoluciones concentradas de interferente (hemoglobina)</i>	13
➤ <i>Preparación de los pools de suero</i>	14
➤ <i>Preparación de las diluciones con interferente (hemoglobina)</i>	14
Métodos de medida	15
➤ <i>Método para la determinación de ALD</i>	15
➤ <i>Método para la estimación del índice de hemólisis (IH)</i>	16
<i>Procedimiento y análisis de los resultados</i>	17
RESULTADOS	18
❖ <i>Estimación de la concentración de ALD en los pools</i>	18
❖ <i>Estudio de interferencia de la hemólisis sobre valores bajos de ALD</i>	19
❖ <i>Estudio de interferencia de la hemólisis sobre valores altos de ALD</i>	22
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIONES	31
ANEXO. Autorización del CEImPA	32
BIBLIOGRAFÍA	33



Universidad de Oviedo

Lista de abreviaturas

- **ALD:** Aldolasa
- **IH:** Índice de hemólisis
- **SEQC^{ML}:** Sociedad Española de Laboratorio de Medicina
- **CEImPA:** Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Principado de Asturias
- **ET:** Error total
- **ES o sesgo:** Error sistemático
- **EMP:** Error máximo permitido
- **Hb:** Hemoglobina
- **Int:** Porcentaje de interferencia
- **DS:** Desviación estándar
- **CV:** Coeficiente de variación



INTRODUCCIÓN

Error y seguridad del paciente

El médico, en el curso de sus investigaciones diagnósticas, solicita la realización de pruebas con diversas finalidades, muchas de ellas a los laboratorios clínicos. El informe analítico proporciona información para la toma de decisiones médicas, de modo que tiene un impacto directo sobre la seguridad del paciente, por lo que esto ha de ser una prioridad también para los laboratorios clínicos. El error en los resultados del laboratorio se reconoce como un problema grave que requiere un enfoque global, para promover la mejora de la calidad total.¹ En este contexto, el error puede definirse como cualquier fallo producido a lo largo del proceso, desde que se realiza la petición de las magnitudes hasta el momento en que se reciben sus resultados. Cuando los resultados informados están dentro del intervalo de referencia o son absurdos, la repercusión del error es mínima en la decisión médica, pero hasta un 12,5% de resultados erróneos puede tener trascendencia importante. El error preanalítico es el más frecuente, fundamentalmente los que afectan a la calidad de la muestra recibida en el laboratorio: muestra hemolizada, lipémica, insuficiente, incorrecta o coagulada.²

Fase preanalítica: importancia de la toma de muestra

La fase preanalítica es un componente importante en el proceso de laboratorio, ya que incluye una diversidad de variables que pueden afectar directamente al paciente.³ En esta fase pueden diferenciarse dos etapas, una externa y otra dentro del laboratorio.² La etapa externa comienza con la solicitud de pruebas por el médico, e incluye la recogida de muestras y su transporte al laboratorio, donde comienza la siguiente etapa, que consiste en la recepción de muestras, por el personal del laboratorio, y su pretratamiento para poder realizar los análisis.⁴



Universidad de Oviedo

Los errores que se generan en la fase preanalítica tienen distinta relevancia y su medida es difícil, ya que algunos de ellos no se ponen de manifiesto hasta la fase analítica y otros pueden incluso pasar desapercibidos.² La frecuencia de errores en la etapa preanalítica no es en absoluto despreciable. Plebani et al. describieron que los errores en esta etapa representan entre un 46,0% y 68,2% del total de errores producidos en el laboratorio.⁵

Esta etapa constituye, además, el periodo donde el papel de enfermería cobra mayor importancia, ya que deben intervenir en la prevención de estos errores.

La hemólisis: causas principales, tipos e impacto analítico

La hemólisis es la ruptura de los eritrocitos, con la consiguiente liberación al plasma del contenido intracelular. Ocasiona una coloración rojiza en las muestras de suero o plasma (Figura 1) que puede ser detectada visualmente cuando la concentración de hemoglobina excede los 200 mg/L y constituye la causa del 60 % de los rechazos de muestras en el laboratorio.



Figura 1. Muestras de suero mostrando diferentes grados de hemólisis

La hemólisis puede producirse in vivo, por diversas alteraciones en los eritrocitos u otras causas patológicas, o in vitro, en la mayoría de los casos debido a una extracción o manejo de la muestra de sangre inadecuados. Solo la hemólisis in vitro es considerada como interferencia.⁶ Se ha descrito que la hemólisis influye significativamente en los resultados de muchas pruebas de laboratorio, como potasio, sodio, calcio, fósforo, magnesio, bilirrubina, haptoglobina, proteínas totales, aldolasa, amilasa, lactato deshidrogenasa, aspartato



Universidad de Oviedo

aminotransferasa, alanino aminotransferasa, fosfatasa alcalina, fosfatasa ácida, gamma-glutamyltransferasa, folato y hierro.⁷

La detección de la hemólisis en el laboratorio se realiza mediante la medida del índice de hemólisis (IH) en sistemas automatizados que estiman la concentración de hemoglobina en la muestra a partir de la medida de su absorbancia a determinada longitud de onda.

ALDOLASA: utilidad clínica e impacto de la interferencia por hemólisis

La Aldolasa (ALD) (E.C. 4.1.2.13; D-fructosa-1.6-bisfosfato D-Gliceraldehido-3-fosfatoliasa) es una enzima ampliamente distribuida en tejidos, con tres isoenzimas (A, B y C) codificadas por genes distintos que forman parte del DNA repetitivo codificante disperso (Figura 2).

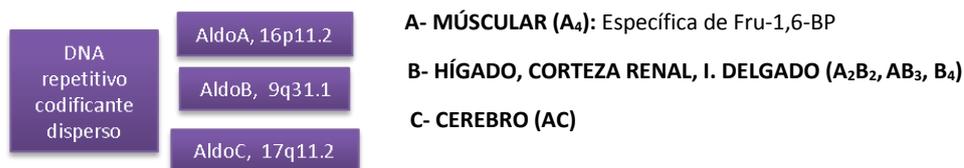


Figura 2. Isoenzimas de la ALD, mostrando la localización de los genes que codifican para cada una de ellas, sus subunidades y el tejido en que se expresan preferencialmente.

Fuente: elaboración propia

Las isoenzimas con interés clínico son la ALD A, que participa en la glucólisis, y la ALD B, que participa en el metabolismo de la fructosa. En la Intolerancia hereditaria a la fructosa sólo está mutado el gen que codifica la ALD B (fructosa1-P aldolasa), de modo que se produce alteración en hígado y riñones, pero no se afecta la glucólisis. Este trastorno, de herencia autosómica recesiva, puede cursar con clínica grave y presenta una incidencia en torno a 1:20000. Su diagnóstico se basa en estudio genético y demostración de ausencia de la actividad enzimática en biopsia hepática. La ALD B sérica también puede elevarse en hepatopatías no metabólicas, como hepatitis aguda, cirrosis, hepatitis crónica e ictericias obstructivas.

Por su parte, la ALD A, objeto del presente trabajo, cataliza la reacción de la segunda etapa de la glucólisis, que escinde la fructosa 1,6-bisfosfato en dos triosas-fosfato, resultando, por



Universidad de Oviedo

tanto, esencial para la obtención de energía a partir de glucosa en el tejido muscular, al ser específica de este tejido. Esta enzima se libera durante el infarto agudo de miocardio, si bien no se utiliza actualmente como marcador cardíaco. Su mayor utilidad clínica es en el diagnóstico y seguimiento de polimiositis o dermatomiositis en un 5-10% de los casos en que los niveles de CK, enzima más específica, permanecen dentro del intervalo de referencia poblacional, mientras que los de ALD se encuentran elevados.⁸ Los eritrocitos y otros elementos formes, como las plaquetas, son ricos en ALD y hay estudios que establecen que la enzima se libera en anemias hemolíticas, lo que justifica la necesidad de evaluar la interferencia por hemólisis in vitro en su determinación.



OBJETIVO

La hemólisis es una causa de interferencia cuyo impacto es necesario evaluar para cada analito potencialmente afectado, con los métodos disponibles en cada laboratorio clínico.

El objetivo del presente trabajo ha sido:

Evaluar el impacto de la hemólisis sobre la medida de la ALD en suero y proponer un valor objetivo de IH para sistematizar el informe de resultados en el servicio de Bioquímica Clínica del HUCA.



MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio de la interferencia por hemólisis se realizó comparando el valor medido de la magnitud (ALD) en una muestra sin interferente (hemoglobina), con los valores obtenidos cuando se adicionan a la muestra concentraciones conocidas del interferente, de acuerdo con protocolos vigentes en los laboratorios clínicos, como se describe a continuación.

Resumidamente, se prepararon dos mezclas de sueros (en adelante, *pool*), uno de ellos con valores de ALD en la zona baja del rango de referencia de la magnitud (*pool* bajo) y otro con una concentración de ALD próxima a los valores de decisión clínica (*pool* alto).

Además de medir las concentraciones de ALD en las muestras con y sin interferente, se realizó una estimación del grado de hemólisis de las muestras mediante la determinación espectrofotométrica del índice de hemólisis (IH), que correlaciona con la concentración de hemoglobina de la muestra.

El diseño experimental utilizado es una modificación de los descritos originalmente por Glick,⁹ y posteriormente por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), en los documentos C56-A¹⁰ y EP7-A2,¹¹ siguiendo el protocolo de la Sociedad Española de Laboratorio de Medicina (SEQC^{ML}) para el estudio de la interferencia por hemólisis.¹²

Las muestras de suero con las que se prepararon los *pools* se seleccionaron entre las recibidas en el laboratorio de Bioquímica Clínica del HUCA, una vez completados todos los análisis solicitados con fines asistenciales y emitido el informe correspondiente. Esta selección de sueros se realizó sin identificación del paciente ni de los resultados obtenidos en dichas muestras, en el momento en que se iban a descartar por haber superado el tiempo establecido de conservación en el laboratorio asistencial. Al tratarse de muestras biológicas de pacientes, se solicitó exención del consentimiento informado, así como la pertinente autorización del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Principado de Asturias (CEImPA) (ANEXO 1).



Universidad de Oviedo

Los criterios de inclusión para la selección de las muestras fueron:

- Índice de hemólisis (IH) inferior a 10
- Volumen de suero superior a 1 mL

Preparación de las muestras

➤ *Preparación de las disoluciones concentradas de interferente (hemoglobina)*

En primer lugar, se preparó un hemolizado con una concentración de hemoglobina de 100 g/L, como se describe a continuación.

Se centrifugaron 4 mL de sangre total anticoagulada con EDTA (tubo BD Vacutainer® EDTA K2), 10 minutos a 1200 g. Tras la centrifugación de la muestra, se eliminó el plasma y se añadieron 10 mL de solución isotónica salina al 0,9% (B Braun®). Tras homogeneización, por inversión del tubo varias veces, se centrifugó 10 minutos a 1200 g. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se repitió el proceso de lavado con la solución salina al 0,9% otras dos veces.

Tras el último lavado, después de retirar el sobrenadante, se resuspendieron las células en 2,5 mL de agua desionizada (B Braun®), invirtiendo el tubo varias veces y congelándolo posteriormente a -20°C un mínimo de 12 horas. Transcurrido este tiempo, se descongeló la muestra, se agitó y se centrifugó 30 minutos a 1500 g para eliminar los estromas celulares. Tras el proceso de centrifugación, se recuperó el sobrenadante, que constituyó el hemolizado de base para la preparación de las muestras con interferente.

Se midió la concentración de hemoglobina en dicho hemolizado mediante el método de Drabkin, en un sistema XN-3000 de Sysmex (Roche Diagnostics®), y se ajustó la concentración de hemoglobina a 100 g/L, diluyendo la muestra con agua desionizada (B Braun®). El hemolizado se conservó a -20°C hasta su utilización.

Para la preparación del hemolizado, se utilizaron muestras del área de hematimetría perteneciente al Laboratorio de Medicina del HUCA, sin necesidad de identificación alguna



Universidad de Oviedo

del paciente ni de sus resultados, en el momento en que iban a ser destruidas por haber finalizado todos los procesos analíticos solicitados asistencialmente, tal como también se ha indicado anteriormente para los pools.

➤ *Preparación de los pools de suero*

Teniendo en cuenta los valores de referencia de la ALD, se prepararon dos pools de suero, uno con una concentración baja de ALD, dentro del intervalo de referencia de la magnitud (pool bajo) y otro con una concentración de ALD cercana al límite de decisión clínico (pool alto). Los pools de muestras se prepararon realizando una mezcla de varios sueros de pacientes, en las que se midieron la concentración de ALD y el IH, siguiendo los criterios de inclusión para evitar incorporar muestras previamente hemolizadas.

➤ *Preparación de las diluciones con interferente (hemoglobina)*

Para cada uno de los pools (bajo y alto) se preparó un suero base sin interferente y otro con interferente, en las siguientes proporciones:

- Suero base sin interferente (hemoglobina): 4,75 mL de pool + 0,25 mL de agua desionizada
- Suero base con interferente (hemoglobina): 4,75 mL de pool + 0,25 mL de hemolizado

A partir de estos sueros base se prepararon 8 diluciones para cada uno de los pools, con las siguientes proporciones y características:

Dilución 1: 1000 μ L de suero base sin interferente

Concentración de Hemoglobina: 0 mg/dL

Dilución 2: 950 μ L de suero base sin interferente + 50 μ L de suero base con interferente

Concentración de Hemoglobina: 25 mg/dL

Dilución 3: 900 μ L de suero base sin interferente + 100 μ L de suero base con interferente

Concentración de Hemoglobina: 50 mg/dL



Universidad de Oviedo

Dilución 4: 800 μ L de suero base sin interferente + 200 μ L de suero base con interferente

Concentración de Hemoglobina: 100 mg/dL

Dilución 5: 600 μ L de suero base sin interferente + 400 μ L de suero base con interferente

Concentración de Hemoglobina: 200 mg/dL

Dilución 6: 400 μ L de suero base sin interferente + 600 μ L de suero base con interferente

Concentración de Hemoglobina: 300 mg/dL

Dilución 7: 200 μ L de suero base sin interferente + 800 μ L de suero base con interferente

Concentración de Hemoglobina: 400 mg/dL

Dilución 8: 1000 μ L de suero base con interferente

Concentración de Hemoglobina: 500 mg/dL

En cada uno de los pools, se midió la concentración de ALD y el IH para cada una de las diluciones, por duplicado y en la misma serie analítica.

Métodos de medida

➤ *Método para la determinación de ALD*

La concentración de ALD se determinó mediante un método enzimático (BEN®) en un módulo c702 de la plataforma analítica Cobas 8000 (Roche Diagnostics®).

Intervalo de medición: 0,9 – 27 U/L.

Límite de detección: 0,9 U/L.

El límite de detección inferior equivale a la menor concentración medible de analito que puede distinguirse de cero.

Rango de referencia: 1,2 y 8,8 U/L.

El control de calidad ha sido realizado con los materiales comerciales PreciControl Clinical Chemistry Multi (Roche Diagnostics), para asegurar las prestaciones analíticas antes de emitir un resultado.



Universidad de Oviedo

Se analizó la fiabilidad en dos niveles: nivel 1 con una concentración más baja de ALD y nivel 2 con concentración superior (Tabla 1). Con esto se verifica que el resultado se mantuvo dentro de los rangos establecidos como correctos. Estos controles se realizaron antes y después de cada serie analítica en el presente estudio. El valor asignado por el fabricante del material de control es el que se establece como objetivo a conseguir, dentro de la variabilidad de medida tolerable para la utilidad clínica que se le vaya a dar al marcador. El valor obtenido es el resultado que se ha medido en cada serie analítica de muestras.

Tabla 1. Resultados del control interno de calidad analítica realizado durante el estudio

	Valor asignado (U/L)	Valor obtenido (U/L)	CV (%)	ES (%)	ET (%)	EMP (%)	
Nivel 1	10,45	10,79	3,87	3,25	9,64	10	OK
Nivel 2	15,09	15,45	3,8	2,39	8,66	10	OK

(ES: error sistemático, ET: error total; EMP: error máximo permitido).

Fuente: elaboración propia

Como se puede observar, en ambos niveles el error total (ET), estimado como suma del error sistemático (ES o sesgo) más el error aleatorio (estimado con el CV, aplicando un 95% de confianza), no superó el error máximo permitido (EMP) que está fijado en un 10%, por lo que se puede asegurar la calidad de los resultados obtenidos durante todo el procedimiento.

➤ *Método para la estimación del índice de hemólisis (IH)*

El IH se determinó en un módulo c702 de la plataforma analítica Cobas 8000 (Roche Diagnostics®). En este sistema, el IH se calcula automáticamente a partir de las medidas de absorbancia a 570 nm y 600 nm (longitudes de onda primaria y secundaria, respectivamente), obtenidas en la muestra diluida con cloruro de sodio al 0,9%.



Universidad de Oviedo

Los valores del IH obtenidos por este sistema analítico se corresponden con una concentración aproximada de hemoglobina en mg/dL.

Intervalo de medición: 5 – 1200.

Límite de detección: 5.

Procedimiento y análisis de los resultados

Para cada una de las diluciones de los pools se calculó la media de los valores obtenidos en medidas repetidas, por duplicado.

El porcentaje de interferencia (Int) para cada dilución (n) se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Int}_n = 100 \times (C_n - C_1)/C_1$$

siendo C_n la media de los valores de concentración obtenidos para cada dilución n (diluciones con interferente, $n = 2, 3, \dots, 8$), y C_1 la media de la concentración obtenida para la muestra dilución 1 (sin interferente).

Se consideró la existencia de interferencia analíticamente significativa cuando el porcentaje de interferencia superaba el límite de error admisible por el laboratorio, fijado en un 10%.



Universidad de Oviedo

RESULTADOS

❖ Estimación de la concentración de ALD en los pooles

Cada uno de los pooles se procesaron 20 veces, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 2: Resultados obtenidos en cada pool (U/L)

POOL BAJO (U/L)	POOL ALTO (U/L)
2,8	8,34
2,84	9,21
2,95	9,56
2,73	9,27
3,46	8,78
2,96	8,48
3,07	8,52
2,34	8,95
2,93	8,3
3,21	8,7
3,09	9,23
3,53	10,1
3,38	10,17
1,96	8,85
3,06	10,28
2,31	9,96
2,96	10,27
3,03	8,8
1,93	9,12
2,87	8,56

Fuente: elaboración propia

A partir de los resultados obtenidos, se calculó la concentración media de cada pool y la desviación estándar (DS), como estimación de la imprecisión de la medida. Dicha imprecisión se expresa, para facilitar las comparaciones, mediante el coeficiente de



Universidad de Oviedo

variación (CV), que es el resultado de dividir la DS entre la media, y multiplicar el resultado de dicho cociente por 100, de modo que se obtenga la imprecisión en porcentaje, independiente, por tanto, de las unidades de medida. El resultado obtenido fue un CV del 15,3%, para el pool bajo, y 7,3% para el pool alto (Tabla 3)

Tabla 3. Resultados obtenidos para ALD (media, DS y CV) e IH (media) en los pools.

Tabla 3	Pool bajo	Pool alto
Media (U/L)	2,87	8,56
DS (U/L)	0,439	0,668
CV (%)	15,3	7,3
IH	6	7

Fuente: elaboración propia

La imprecisión del pool bajo supera el error máximo permitido, ya que el límite de error admisible marcado por el laboratorio está fijado en un 10%. Esto significa que la técnica es más imprecisa en la zona baja (a menor concentración de ALD más imprecisa es su medición). Aunque analíticamente no se cumple el margen de tolerancia de la imprecisión, es irrelevante en la práctica clínica ya que el valor de normalidad está muy lejos para que se interprete incorrectamente como elevado un valor de este nivel.

❖ **Estudio de interferencia de la hemólisis sobre valores bajos de ALD**

Se ensayaron cada una de las 8 diluciones preparadas. Por cada dilución se midieron los resultados dos veces para considerar la imprecisión de la técnica, y a partir de ellos se estimó la media, tanto para los valores obtenidos de ALD como para el IH (Tabla 4).



Universidad de Oviedo

Tabla 4. Estudio de interferencia por hemólisis sobre ALD en el pool bajo.

Dilución	Concentración ALD (U/L)			IH		
	Réplica 1	Réplica 2	Promedio	Réplica 1	Réplica 2	Promedio
1	2,28	3,06	2,67	4	5	5
2	3,45	4,46	3,31	28	29	29
3	4,42	4,12	4,11	50	54	52
4	5,62	4,66	4,71	98	104	101
5	7,53	7,53	6,34	186	202	194
6	9,73	9,13	8,48	298	297	298
7	12,13	11,78	10,69	399	403	401
8	14,16	13,66	12,93	497	493	495

Fuente: elaboración propia

Se puede observar cómo hay una relación directa entre el aumento de la concentración de hemoglobina y la de la ALD, interfiriendo en su resultado (Tabla 5).

En la segunda dilución observamos que, con una concentración de hemoglobina de 25 mg/dL, el porcentaje de interferencia alcanzó un 24% y se incrementaba progresivamente llegando a un porcentaje de interferencia de 384% en la octava dilución (con una concentración de hemoglobina de 500 mg/dL).

Tabla 5. Impacto de la hemólisis sobre la determinación de ALD en valores bajos.

Dilución	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentración Hemoglobina (mg/dL)	0	25	50	100	200	300	400	500
IH	5	29	52	101	194	298	401	495
Concentración Aldolasa (U/L)	2,67	3,31	4,11	4,71	6,34	8,48	10,69	12,93
Interferencia (%)	0,0%	24,0%	53,9%	76,4%	137,5%	217,6%	300,4%	384,3%

Fuente: elaboración propia



Universidad de Oviedo

En la Figura 3, se puede observar gráficamente la relación entre ALD e IH. Dado que el valor basal del pool bajo era de 2,67 U/L, puede observarse que no existe compromiso en cuanto a interpretar como patológico un valor tan bajo, salvo para valores de IH >300.

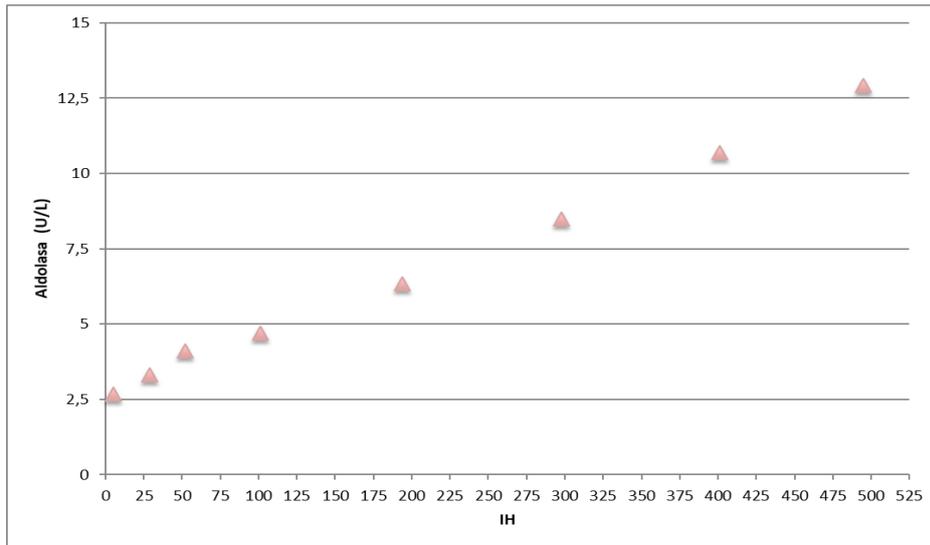


Figura 3. Efecto de la hemólisis sobre la determinación de ALD en valores bajos.

Fuente: elaboración propia

Para una mejor visualización del efecto, en la Figura 4 se muestra el % de interferencia observado en función de la concentración teórica de hemoglobina contenida en cada dilución, presentando los resultados hasta un IH de 200, e indicando con una línea roja el error admisible (marcado en un 10%) a partir del cual la interferencia se considera significativa desde el punto de vista analítico. Se aprecia de forma significativa cómo a partir de la segunda dilución (Hb 25 mg/dL) se supera el porcentaje de interferencia permitido, si bien la implicación clínica del error cometido a este nivel sería escasa.

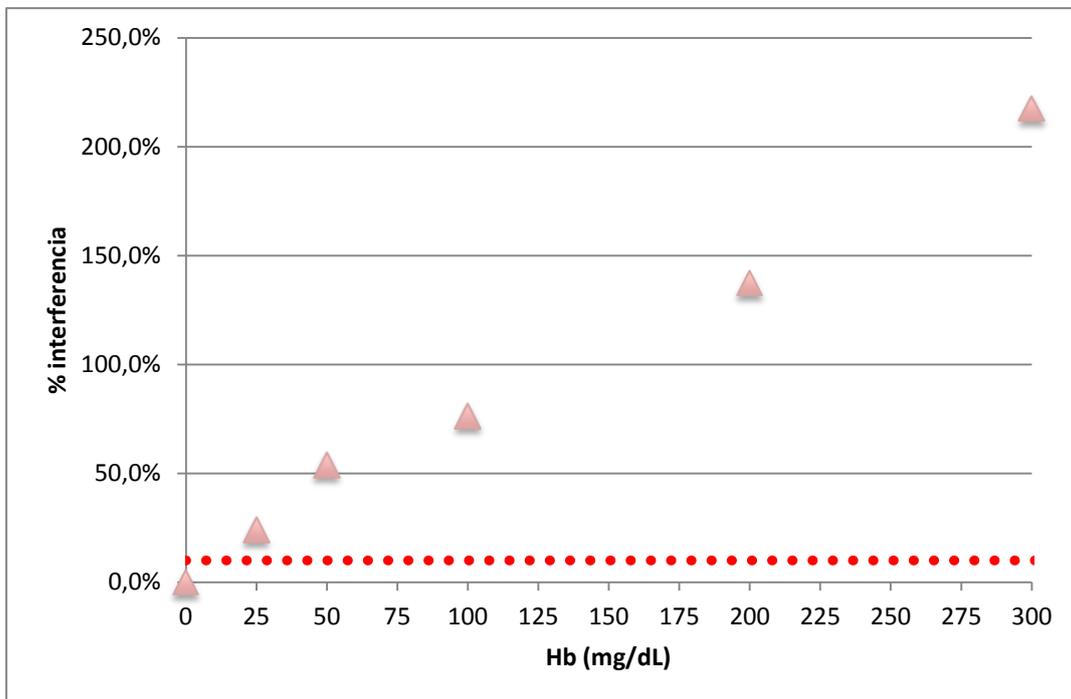


Figura 4. Interferencia (%) en la determinación de ALD en función de la hemólisis.

Fuente: elaboración propia

❖ **Estudio de interferencia de la hemólisis sobre valores altos de ALD**

Se midieron, al igual que para el pool bajo, los resultados de cada una de las 8 diluciones preparadas. Por cada dilución, se recopilaban los resultados de cada réplica, con el fin de estimar la media, tanto para los valores obtenidos de ALD como para el IH (Tabla 6).



Universidad de Oviedo

Tabla 6. Estudio de la interferencia por hemólisis sobre ALD en el pool alto.

Dilución	ALD (U/L)			IH		
	Réplica 1	Réplica 2	Promedio	Réplica 1	Réplica 2	Promedio
1	8,8	8,23	8,52	6	3	5
2	8,9	9,85	9,38	30	30	30
3	9,69	9,28	9,49	57	55	56
4	10,19	11,23	10,71	108	105	107
5	12,76	14,01	13,39	219	221	220
6	14,85	15,51	15,18	302	302	302
7	17,91	18,59	18,25	419	429	424
8	17,92	19,98	18,95	511	510	511

Fuente: elaboración propia

Análogamente al estudio realizado con el pool bajo, se observó un aumento de ALD a medida que aumentaba la concentración de hemoglobina, aunque el porcentaje de interferencia no alcanzó niveles tan elevados como en el caso del pool bajo (Tabla 5). En la segunda dilución se observó que, con una concentración de hemoglobina de 25 mg/dL, el porcentaje de interferencia alcanzaba el 10,1% (Tabla 7), y aumentaba progresivamente, hasta alcanzar un porcentaje de interferencia de 122,4 % en la octava dilución (con una concentración de hemoglobina teórica de 500 mg/dL).

Tabla 7. Impacto de la hemólisis sobre la determinación de ALD en valores altos.

Dilución	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentración Hemoglobina (mg/dL)	0	25	50	100	200	300	400	500
IH	3	30	56	107	220	302	424	511
Concentración ALD (U/L)	8,52	9,38	9,49	10,71	13,39	15,18	18,25	18,95
Interferencia (%)	0,0%	10,1%	11,4%	25,7%	57,2%	78,2%	114,2%	122,4%

Fuente: elaboración propia



Universidad de Oviedo

En la Figura 5 se puede observar gráficamente la relación entre ALD e IH. Dado que el valor basal del pool alto era de 8,23 U/L, un valor bastante próximo al límite considerado como normal, aquí sí puede existir riesgo de interpretar como patológico algún valor, especialmente a partir de valores de IH >25.

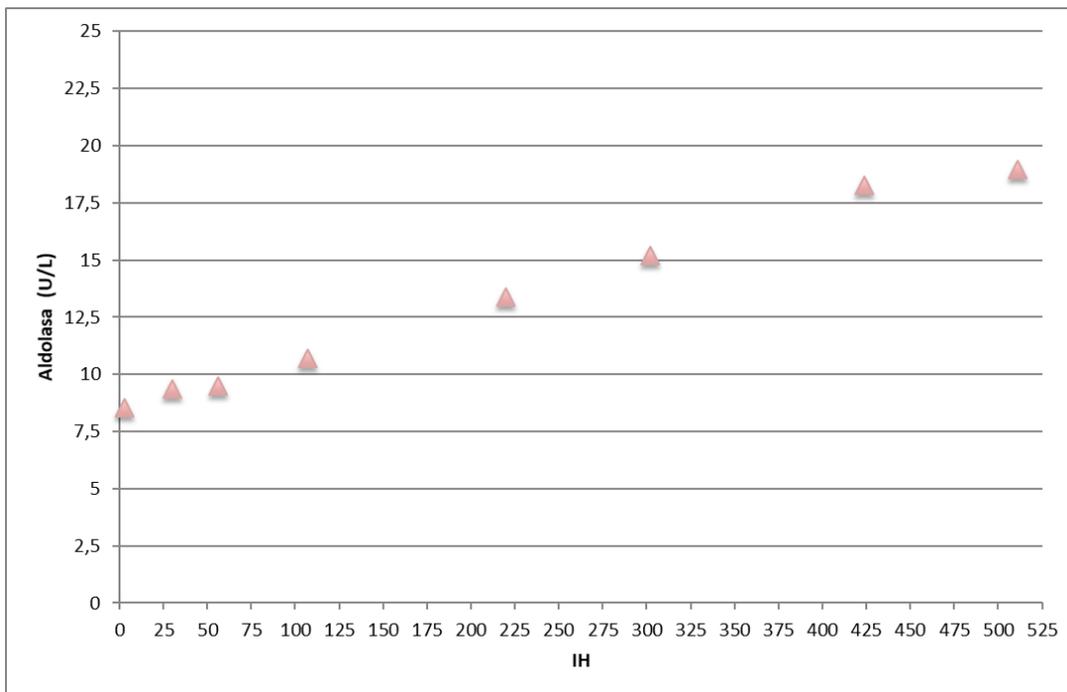


Figura 5. Efecto de la hemólisis sobre la determinación de ALD en valores altos.

Fuente: elaboración propia

De nuevo, para mejor visualización del efecto, en la Figura 6 se representa el % de interferencia relacionado con la concentración teórica de la hemoglobina contenida en cada dilución. Se indica con la línea roja el error admisible (marcado en un 10%) a partir del cual, como se ha explicado anteriormente, la interferencia se considera significativa desde el punto de vista analítico. En este caso se puede observar como la segunda dilución (Hb 25 mg/dL) está justo en el límite de error admisible y que no es hasta la cuarta dilución (Hb 100 mg/dL) cuando se aprecia significativamente cómo se supera el porcentaje de interferencia permitido.

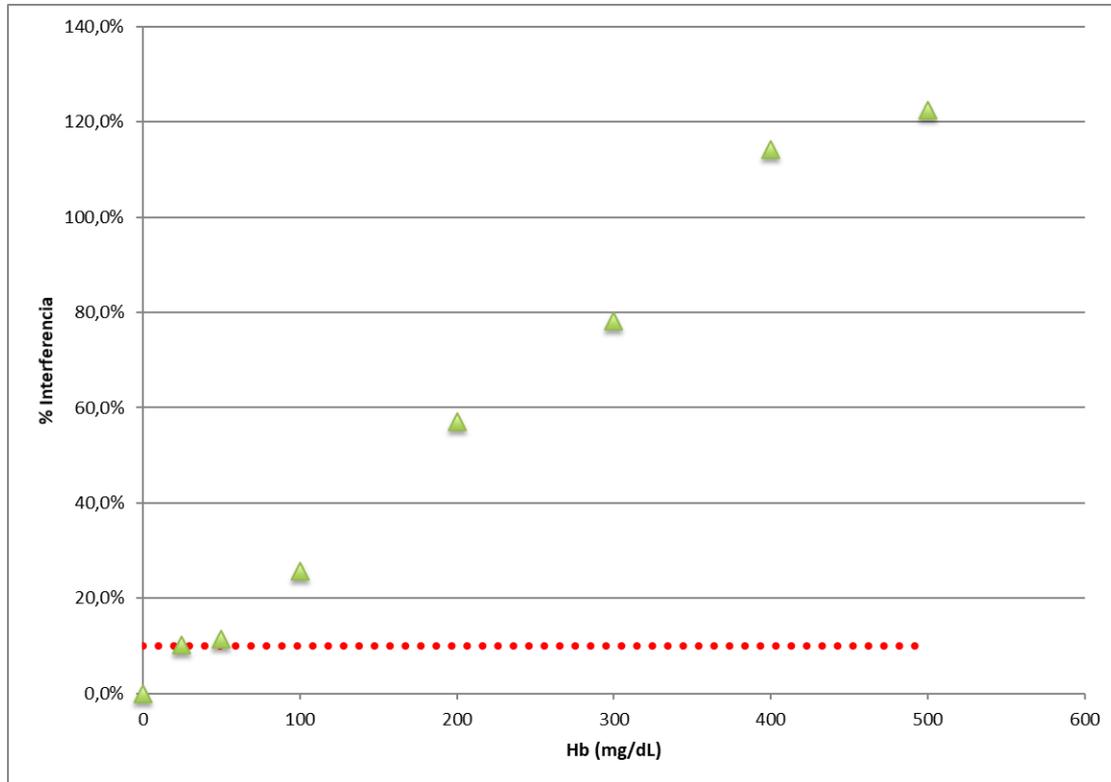


Figura 6. Interferencia (%) en la determinación de ALD en función de la hemólisis.

Fuente: elaboración propia



Universidad de Oviedo

DISCUSIÓN

Los grandes adelantos en la tecnología y el conocimiento desarrollados en las últimas décadas han generado un sistema de salud de enorme complejidad. Esta complejidad entraña numerosos riesgos potenciales inherentes al sistema que, al combinarse con la variabilidad de procedimientos y la actuación humana, pueden provocar que los pacientes finalmente se vean afectados a pesar de los cuidados y dedicación de los profesionales. En lo que se refiere al laboratorio clínico, la calidad analítica está muy preservada por la actual política de acreditación, de amplio grado de implementación según normas específicas (como la UNE-EN ISO 15189). Es por ello que, la oportunidad más grande para la mejora en calidad y la optimización de la seguridad del paciente, desde el punto de vista del laboratorio, se presenta en las fases preanalítica y postanalítica.

El estudio e identificación de interferencias (tanto preanalíticas como analíticas) son un ámbito competencial importante de las especialidades de laboratorio, ya que pueden causar errores sistemáticos clínicamente significativos en los resultados de una magnitud biológica debido al efecto que ejercen sobre algunos componentes de la muestra. Las consecuencias de una interferencia pueden conducir, entre otros, a establecer un diagnóstico equivocado, realizar análisis o exploraciones adicionales inapropiadas o aplicar tratamientos innecesarios o potencialmente desfavorables para el paciente. La hemólisis, la concentración elevada de bilirrubina (ictericia) y la turbidez de las muestras de suero o plasma, constituyen las fuentes de interferencia más frecuentes en el laboratorio clínico.

Como acciones de mejora, resulta conveniente realizar acciones de capacitación, priorizando las áreas o niveles donde se generen con mayor frecuencia los errores y fomentar el diálogo entre el personal del laboratorio para la estandarización de la técnica.

El lugar donde se tiende a cometer más errores, según un estudio experimental, es el área de urgencias, donde se recomienda aumentar el personal conforme a la demanda del centro y, para ello, es necesario realizar estudios que muestren con exactitud las áreas vulnerables



Universidad de Oviedo

a errores preanalíticos con su respectiva frecuencia para así tomar medidas correctivas y mejorar el proceso.¹³

Esta etapa constituye, además, el periodo donde el papel de enfermería cobra mayor importancia, ya que deben intervenir en la prevención de estos problemas evitando las principales causas de error, tales como: tiempo excesivo del torniquete, proporción incorrecta de sangre/anticoagulante, utilizar tubos inadecuados, contaminar muestras, proporcionar una información insuficiente a los pacientes para realizar la extracción,¹⁴ realizar una aspiración intensa, particularmente durante la punción superficial de las venas (la aspiración por medio de agujas con menor calibre suele causar menos hemólisis que con agujas de mayor tamaño, sin embargo, el flujo de corriente es más bajo y la velocidad de fluido, turbulencia y hemólisis se supone que son menores) o la extracción con una jeringa y después repartir alícuotas en varios tubos de ensayo.¹⁵ Además, el personal de enfermería debe asegurar la elección de un sistema de acceso venoso que proporcione una extracción sanguínea segura y unos resultados analíticos fiables para la muestra.

Por tanto, es importante en la fase preanalítica una buena educación del personal de enfermería, con estudios que muestren cómo evitar de la mayor forma posible esta interferencia. Un estudio publicado en 2008, analizó diferentes variables relacionadas con este aspecto: el tipo de venopunción, el tipo de catéter y su diámetro. La muestra se obtuvo de todos los pacientes que precisaron analítica de sangre en el Servicio de Urgencias del Hospital Virgen del Camino durante 34 días, recogidos en 3 periodos distintos, complementando un total de 1933 procedimientos que proporcionaron los siguientes resultados:

- El tipo de venopunción (con aguja y con catéter): Se registró hemólisis positiva, determinada por los técnicos de laboratorio, en un 2% (7/348) de muestras obtenidas con aguja frente al 14% (222/1585) de muestras extraídas del catéter



Universidad de Oviedo

- El tipo de catéter (3 catéteres de 3 materiales diferentes): Se observó un 8% (39/475) de hemólisis en las muestras extraídas mediante catéter Protectiv® de teflón, 18% (77/426) mediante Protectiv plus® de poliuretano y 15% (106/684) mediante BD-Nexiva® de vialón.
- El diámetro del catéter: El IH disminuyó al aumentar el calibre del catéter; así presentaron un 13% (115/867) los de 18G y un 15% (107/708) los de 20G.¹⁶

Otro estudio realizado en centros de atención primaria del área de gestión sanitaria de la serranía de Málaga concluyó que una intervención basada en observación directa e información complementaria a las enfermeras ayuda a reducir la hemólisis en la fase preanalítica, habiendo recogido valores de hemólisis de un 17% antes de la intervención y un 6,1% después. Además, se demostró que el efecto se mantiene a lo largo del tiempo, ya que un año más tarde, bajo las mismas condiciones, el porcentaje de hemólisis fue del 9%.¹⁷ Todo esto esclarece la importancia de asegurar, no solo una formación continua al personal sanitario que asegure una buena técnica, sino también de material que garantice la máxima calidad preanalítica.

El marcador bioquímico que ha sido objeto de estudio en el presente trabajo de fin de grado es la ALD, cuya actividad en suero es bastante estable, permaneciendo inalterada a temperatura ambiente hasta 48 horas, y varios días si se conserva la muestra a 4°C. El intervalo de referencia para la actividad de ALD en adultos es de 1,2 a 8,8 U/L, aunque según la fuente bibliográfica consultada puede ser normal encontrar valores hasta 10 U/L, medido a 37°C.¹⁸ Se aprecia una clara diferencia en función del sexo, mostrando los varones valores más elevados, y de la edad, ya que, si se compara con los valores de referencia de población adulta, la actividad de ALD en neonatos es cuatro veces mayor y el doble en pacientes en edad pediátrica. Se alcanzan los valores adultos cuando el niño alcanza la pubertad.¹⁸



Universidad de Oviedo

El interés de estudiar la interferencia por hemólisis sobre la determinación de ALD, surge del potencial impacto clínico que puede tener una inadecuada gestión del proceso bioquímico sobre la seguridad del paciente. En este sentido, resulta del máximo interés contar con la colaboración interdisciplinaria de todo el personal sanitario, pero fundamentalmente, poner en valor la tarea de la enfermería como parte esencial para garantizar la calidad de los resultados del laboratorio clínico.

Tras analizar los resultados obtenidos con este estudio experimental, se ha podido constatar que la hemólisis tiene un impacto directo e importante sobre la medida de ALD en suero. Se ha observado que, a medida que se añade interferente (hemoglobina) de forma progresiva, va aumentando de la misma manera la concentración de ALD. Al estudiar los resultados en pools con diferentes actividades de ALD, se pudo observar cómo afecta el IH en la medida de las mismas (Figura 3 y Figura 5).

De hecho, en los resultados obtenidos sobre el pool con niveles bajos de ALD (Tabla 5), se observó que, desde la segunda dilución, cuando la concentración teórica de hemoglobina era de 25 mg/dL, el porcentaje de interferencia aumentaba un 24% y así progresivamente llegando a un porcentaje de interferencia de 384,3% en la octava dilución (con una concentración de hemoglobina de 500 mg/dL). Cabe destacar que, aunque los porcentajes de interferencia obtenidos en este experimento fueron muy altos, la seguridad del paciente no habría estado comprometida, ya que los valores de ALD se mantenían en el rango de normalidad hasta que la hemoglobina alcanza 300 mg/dL, con un valor de IH con el que normalmente se descarta completamente la muestra para el análisis de enzimas intraeritrocitarios, como la ALD.

Los resultados obtenidos sobre las mediciones realizadas en el pool con niveles altos de ALD (Tabla 6), mostraron un porcentaje de interferencia de un 10,1%, justo al límite del error admisible, en la segunda dilución (Hb 25 mg/dL). A partir de la cuarta dilución (Hb 100 mg/dL) es cuando comenzó a apreciarse significativamente cómo se superaba el porcentaje



Universidad de Oviedo

de interferencia permitido, con un 25,7%. A partir de una concentración de ALD basal de 8,52 U/L (muy próxima al límite del intervalo de referencia en adultos, que se sitúa en 8,8 U/L), se compromete mayormente la seguridad del paciente, pese a que los porcentajes de interferencia son menores que en el pool bajo.

Tras analizar los datos obtenidos, se propone como valor máximo de hemoglobina permitido el de 50 mg/dL, correspondiente a la tercera dilución en el pool alto, ya que a partir de ahí la concentración de ALD tiene un porcentaje de interferencia superior al permitido por el laboratorio del 10%, que se refleja en una concentración de ALD patológica pudiendo así afectar a la seguridad del paciente. Los resultados serán completamente fiables cuando el IH sea inferior a 25, y no deberían informarse en ningún caso con valores de IH superiores a 200.

Si bien lo óptimo sería solicitar una nueva extracción en caso de que el IH sea superior a 25, pueden valorarse estrategias intermedias para el informe de aquellas situaciones donde sea muy necesario aportar un resultado de ALD sin repetir la toma de muestra, como realizar alguna dilución intermedia, como máximo al 1:4, siempre dentro del rango de linealidad de la técnica, para conseguir reducir el impacto de la interferencia.

No existe bibliografía específica publicada sobre el estudio de la interferencia por hemólisis relacionada con la ALD para establecer un índice de alerta, por lo que no se han podido contrastar los resultados obtenidos. Sin embargo, a pesar de esta limitación, dado que se han seguido protocolos normalizados para la realización del estudio, la ausencia de antecedentes bibliográficos no sólo justifica aún más la relevancia del presente trabajo, que va a permitir seleccionar un valor de IH objetivo que podrá implementarse en la práctica asistencial al laboratorio de Bioquímica Clínica del HUCA, sino que además los resultados obtenidos podrán enviarse para su publicación, tras la defensa del trabajo para el fin de grado de su autora.



Universidad de Oviedo

CONCLUSIONES

El protocolo experimental del presente trabajo de fin de grado ha permitido establecer que la concentración más baja del interferente (hemoglobina) que ocasiona un error significativo en la determinación de ALD en suero es 25 mg/dL.

Con base en estos hallazgos, se derivan las siguientes conclusiones:

- Las muestras de suero con hemólisis franca ($IH > 200$) no son aptas para la determinación de ALD, sea cual sea la actividad obtenida.
- Se pueden informar con seguridad los resultados de ALD siempre que el IH sea inferior a 25.
- Las muestras con IH entre 25 y 50 deben ser valoradas con cautela:
 - o Si la actividad medida es muy baja, podrían informarse, indicando en un comentario la presencia de hemolisis de la muestra.
 - o Si la actividad de ALD está en la zona cercana al límite superior de referencia, se recomienda no informar y solicitar una nueva extracción. Si la repetición de la toma de muestra es dificultosa o puede provocar un retraso diagnóstico indeseable, podría valorarse la realización de una dilución del suero, para tratar de aportar un resultado fiable.



Universidad de Oviedo

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Moreno EE, Mérida FJ, Buño A, et al. Seguridad del paciente. Documento de la SEQC. ISSN212-5750. 2011; 5.
- ² Pedret SV, Rodríguez PC, Vizcaíno IR, et al. Errores relacionados con el laboratorio clínico. *Quim Clin.* 2007; 26:23–8.
- ³ Narayanan S. The preanalytic phase: An important component of laboratory medicine. *Am J Clin Pathol.* 2000;113:429–52.
- ⁴ Stankovic A, DiLauro E. Quality improvements in the preanalytical phase: Focus on urine specimen workflow. *Clin Lab Med.* 2008; 28:339-50.
- ⁵ Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med.* 2006; 44:750-9.
- ⁶ Cook SL, Bruns DE. Persistent hemolysis in a patient with pancreatitis. *Clin Chem.* 2012;58:974–7.
- ⁷ Eik LC, Buscetti MG, Di Camilo MI, et al. Estudio de la interferencia por hemólisis en la determinación de bilirrubina total. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2017;51:7–15. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/535/53550497004.pdf>.
- ⁸ Caracciolo B, Muziatti S, Pandolfo M, et al. Variabilidad biológica de aldolasa sérica: Su utilidad en la interpretación de los resultados. *Acta Bioquím Clín Latinoam.* 2012;46:53–7.
- ⁹ Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. *Clin Chem.* 1986; 32:470-5.
- ¹⁰ Clinical and Laboratory Standards Institute. Hemolysis, icterus and lipemia/turbidity indices as indicators of interference in clinical laboratory analysis. C56, USA 2011.
- ¹¹ Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition. EP7-A2.USA 2010.
- ¹² López R, Alonso N, Serrat N, Gella FJ, Boned B, Canalías F et al. Procedimiento para el estudio de la interferencia por hemólisis, bilirrubina y turbidez y para la verificación de los índices de hemólisis, ictericia y lipemia. Documentos de la SEQC – junio 2014.
- ¹³ Cecilia Donayre PC, Zeballos H E, Sánchez B J. Realidad de la fase pre-analítica en el laboratorio clínico. *Revista Medica Herediana.* 2013; 24: 325.
- ¹⁴ Da Costa VG, Moreli ML. Principais parâmetros biológicos avaliados em erros na fase pré-Analítica de laboratórios clínicos: Revisão sistemática. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* SBPC, SBP, SBC; 2012; 48:163–8.
- ¹⁵ Tho PL. Hemolysis como influencia y factor de interferencia. *EJIFCC.* 2002;13:107–13.
- ¹⁶ Agós MD, Lizarraga R, Gamba D, et al. Factors related to haemolysis in the extraction of blood samples. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra.* Pamplona may/ago.2008; 31(2).
- ¹⁷ Bel-Peña N, Merida de la Torre FJ. Influence of an observer in the haemolysis produced during the extraction of blood samples in primary care. *Rev Calid Asist.* 2015; 30:297-301.
- ¹⁸ Panteghini M, Bais R. Chapter9 Serum Enzymes. En: 6th Ed. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 2019:404-34.