

8



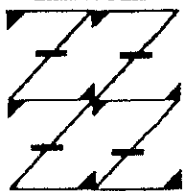
# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

## INTERFERENCIA EN LOS RESULTADOS DE QUIMICA SANGUINEA POR LA PRESENCIA DE: GLUCOSA, BILIRRUBINA Y HEMOGLOBINA.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
COLUNGA REYES ROSA

UNAM  
FES  
ZARAGOZA



LO HUMANO ES  
DE NUESTRA REFLEXION

297263

DIRECTOR: M. en C. MARTHA SANCHEZ RODRIGUEZ  
ASESOR: Q. F. B. MA. DEL PILAR CEDILLO MARTINEZ

MEXICO, D.F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A TI VIRGEN DE GUADALUPE:**

Porque me permitiste llegar a este momento tan importante.

**A MIS PADRES:**

Porque en los momentos buenos y malos, siempre me demostraron su apoyo, guiándome para seguir por el camino correcto y poder concluir mis estudios profesionales.

**A MIS PADRINOS:**

Rosa y Ocotlán por haber contribuido a mi formación profesional en la primera etapa de mi vida y por su comprensión de siempre.

**A MIS HERMANOS:**

Guadalupe, Ramón, Sol, Salvador y Ceci, por haberme impulsado y apoyado en todo momento a la terminación de mis estudios.

**A MIS SOBRINOS:**

Rosario, Jesús, Mary Carmen, Abraham, Juan Carlos, Eduardo, Salvador, Alejandro, Marco Antonio y Samir, por que al igual que yo concluyan sus estudios y lleguen a sentir esta gran satisfacción.

**A MIS ASESORES:**

M. en C. Martha Sánchez Rodríguez y Q.F.B. Pilar Cedillo Martínez mi más sincero agradecimiento, por compartir sus valiosos conocimientos y dedicar su tiempo para la realización de este trabajo.

**A Q.F.B. OSCAR GONZALEZ MORENO:**

Por el apoyo dado a toda la parte de estadística.

**A LAB. GUADALUPE MORENO DOMINGUEZ:**

Por la valiosa ayuda prestada en la recolección de muestras.

**A MIS MAESTROS:**

Por que a través de sus conocimientos impartidos lograron que tenga las bases necesarias para ejercer mi carrera.

**A MI ESCUELA:**

Por haberme dado la oportunidad de forjarme un futuro.

**A RAMÓN, GABY, LETY Y ELIA:**

Por compartir momentos agradables en todo este tiempo y por su ayuda en el momento más oportuno.

## INDICE

I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	2
III. Marco teórico.....	5
a) Interferencias "in vitro" e "in vivo".....	5
b) Automatización.....	12
c) Métodos de determinación para: creatinina, urea, ácido úrico, colesterol y albúmina.....	14
IV. Planteamiento del problema.....	33
V. Hipótesis.....	34
VI. Objetivos.....	35
VII. Material y métodos.....	36
VIII. Resultados.....	49
IX. Discusión de resultados.....	62
X. Conclusiones.....	68
XI. Bibliografía.....	69

## RESUMEN

**Antecedentes:** Los métodos empleados para realizar las determinaciones en Química Clínica están basados en técnicas espectrofotométricas por lo cual se ha reportado que existen interferencias positivas y negativas cuando las muestras están hemolisadas o ictericas; sin embargo, en ocasiones éstas no pueden ser evitadas.

**Objetivo:** Conocer la interferencia "*in vitro*" producida por bilirrubina, hemoglobina y glucosa, en forma aislada o combinada, en las técnicas rutinarias de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina, tanto por procedimientos manuales como automatizados y obtener ecuaciones matemáticas de corrección.

**Metodología:** Se obtuvieron sueros libres de hemólisis, ictericia y/o lipemia hasta conformar 300 mL. Se midieron las concentraciones basales de glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol, albúmina, hemoglobina y bilirrubina total y se añadieron, de forma individual, bilirrubina, hemoglobina y glucosa en las concentraciones tomadas de los autores Castillo y Fonseca<sup>1</sup>. Se realizaron combinaciones de los interferentes siguiendo un diseño 2<sup>3</sup> y se midieron nuevamente las concentraciones de los analitos estudiados por triplicado. Se obtuvieron ecuaciones de regresión en algunos analitos que presentaron coeficiente de correlación mayor a 0.80.

**Resultados:** La bilirrubina produce interferencia tanto positiva como negativa alrededor de una concentración de 3.0 mg/dL generalmente en los analitos afectados excepto para el colesterol, siendo el más importante interferente; la hemoglobina a partir de 1.0 g/dL para ácido úrico y colesterol y 4.5 mg/dL para creatinina aproximadamente, y la glucosa no la produce de manera importante. Cuando se encuentran dos o tres interferentes mezclados la hemoglobina es la que causa mayor error en los resultados. Con concentraciones de 1.0 g/L de hemoglobina y 4.3 mg/dL de bilirrubina se produce una variación ( $p < 0.05$ ) en todos los analitos y por ambos procedimientos; la combinación hemoglobina 1.0 g/L y 290 mg/dL de glucosa produce interferencia en los procedimientos manuales y en algunos automatizados; la presencia de los tres a las mencionadas concentraciones causa desviaciones en los resultados de todos los analitos por ambos procedimientos.

**Conclusión:** La presencia de hemoglobina, bilirrubina y glucosa causa interferencia química y espectral en la mayoría de los analitos estudiados, siendo las más importantes la bilirrubina y hemoglobina.

## INTRODUCCIÓN

La ciencia y el arte del diagnóstico dependieron hasta hace poco tiempo principalmente de la historia clínica aunada al examen físico completo. Sin embargo, en los últimos años a habido un incremento extraordinario en el uso de laboratorio clínico.

Muchos laboratorios informan un incremento del 10 al 15 % anual en los exámenes que realizan. Atendiendo a la proyección de estos datos es de gran importancia pensar en la calidad de los análisis, así mismo de las interferencias que afectan los resultados dando lugar a una información de datos innecesarios y extraños que harían pasar por alto la información útil. Esto, sin embargo no quiere decir que la información que no este de acuerdo con diagnóstico presuntivo del médico sea un error de laboratorio y por tal razón deba ser ignorada.<sup>2</sup> La finalidad del laboratorio Químico Clínico es proporcionar datos analíticos exactos y precisos que ayuden a los médicos al pronóstico, diagnóstico y seguimiento terapéutico de las enfermedades, por lo que es necesario que los resultados sean confiables.

El control de calidad en el laboratorio clínico comienza antes de recogerse la muestra del paciente. La exactitud se inicia al asegurarse que se obtiene la muestra adecuada, se utiliza el recipiente apropiado para su recolección y se consideren las variables pertinentes.

El problema de la recolección y procesamiento de muestras es complejo, ya que no existe un sistema simple que reúna los requerimientos para todas las variables analíticas que mide el laboratorio de Química Clínica.<sup>3</sup>

La variación total de una serie de mediciones de laboratorio consecutivas obtenido del mismo sujeto es el resultado de muchos factores. Éstos incluyen imprecisión analítica, cambios en el estado de salud del sujeto, factores endógenos que influyen sobre el control biológico interno y tensiones exógenas originadas en el ambiente externo realizadas antes de recoger las muestras (ejercicio, dieta previa, tabaquismo, postura del paciente, tiempo desde la aplicación de un torniquete hasta antes de la punción venosa.)

Por lo anterior en el laboratorio se tratan de minimizar los efectos de aquellos factores que no están relacionados con el estado de salud del paciente.<sup>4</sup>

Uno de los problemas más complejos y persistentes en las determinaciones químicas es la presencia de hemólisis, bilirrubina, altas

concentraciones de glucosa y otras sustancias que interfieren en las determinaciones, modificando así cuantitativamente los resultados finales.

En muchas ocasiones cuando se obtiene la muestra sanguínea es muy difícil realizar la punción venosa, esto pasa con niños pequeños, personas obesas, u hospitalizadas que tienen sus venas muy manipuladas por lo que es difícil conseguir una muestra libre de hemólisis y es necesario trabajar así la muestra, haciendo lo posible por corregir la presencia del interferente, ya sea diluyendo el suero para disminuirla o utilizando blancos de suero para cada prueba. Con esto se va incrementando el número de análisis clínicos en forma rutinaria en los centros de trabajo, por lo que se ha hecho evidente la necesidad de adoptar equipos automatizados, con la tendencia de simplificar el trabajo, disminuyendo así el tiempo en que se efectúen las determinaciones, sin olvidar en ningún momento que la calidad de estas determinaciones es lo que debe inquietarnos a los responsables de efectuar dichos estudios ya que, de otro modo, de nada sirve que la capacidad del autoanalizador sea muy elevada en cuanto al número de muestras que puede procesarse diariamente y que se descuide la calidad de las determinaciones.

En la actualidad, los avances en la instrumentación de los laboratorios han constituido un impacto importante en la práctica general de la Química Clínica, tanto en el sentido de mejorar su exactitud como en el de beneficiar su precisión, y como el de obtener los resultados con más rapidez, pero el resultado final no puede ser nunca mejor en calidad a la muestra de que se ha partido para el análisis, con esto se hace hincapié sobre el hecho de que en las condiciones en que se encuentre la muestra va a constituir en la veracidad en toda determinación analítica, así como las técnicas empleadas en la manipulación de la muestra.<sup>5</sup>

Sin embargo, las determinaciones manuales siguen siendo importantes ya que:

- 1) Los procedimientos automatizados se basan en los fundamentos de los métodos manuales.
- 2) Los métodos manuales se usan aún en muchos laboratorios.
- 3) Los métodos manuales continuarán siendo usados para procedimientos de rutina así como de control.<sup>6</sup>

En la literatura se dice que la presencia de interfrentes analíticos potenciales tales como suero icterico, turbidez, hemólisis, lipemia, etc. pueden alterar un procedimiento específico y constituye una base para rechazar la muestra, sin considerar si esta es justificada; como es el caso de cirugías cardiacas o transfusiones sanguíneas, pero en realidad no es



así, puesto que las muestras que se reciben en el laboratorio se analizan tratando de utilizar algún procedimiento que permita minimizar esa interferencia.<sup>7,8</sup>

Por lo anterior se realizó un trabajo de investigación que indica como se afecta la urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina cuando la muestra a analizar presenta: hemólisis y/o bilirrubina y/o glucosa a diferentes concentraciones, siendo realizadas estas determinaciones en el laboratorio de la FES ZARAGOZA utilizando procedimientos manuales, posteriormente las mismas muestras se analizaron en el laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital 20 de Noviembre del ISSSTE utilizando un equipo automatizado, lo que permitió la comparación de resultados en los dos métodos determinándose así la variabilidad existente en los analitos cuando están presentes las sustancias interferentes.

## MARCO TEÓRICO

El laboratorio Químico Clínico utiliza una serie de técnicas, para medir la concentración de sustancias bioquímicas específicas. Todos éstos métodos están sujetos a interferencias provenientes de una variedad de fuentes, sin embargo las interferencias específicas de un procedimiento pueden no ser importantes para otro.

En el análisis de laboratorio existen 4 tipos básicos de interferencia: 1) los originados por limitaciones de los detectores, 2) sustancias que interfieren "*in vitro*" directamente con el método analítico, 3) estados patológicos o agentes exógenos que modifican ciertos procesos fisiológicos, cambiando por ende las concentraciones de una variable analítica "*in vivo*" y 4) los producidos como consecuencia del procesamiento de la muestra.

**Interferente:** Cualquier fenómeno químico o físico que puede desorganizar una reacción o proceso.

**Interferencia "*in vivo*":** Es producida por procesos fisiológicos que tienen lugar en el interior del organismo.

**Interferencia "*in vitro*":** Cambio que no es causado por ningún proceso fisiológico *in situ*.

Las interferencias "*in vitro*" pueden clasificarse en las de naturaleza espectral y las causadas por reacciones químicas competitivas.

**Interferente espectral:** Compuesto que provoca una respuesta en el espectrofotómetro, similar a la de la variable analítica de interés, los interferentes no necesariamente sufren un cambio químico durante la reacción analítica.

**Interferente químico:** Componente que produce un color endógeno o interfiere directamente en la reacción o proceso observado.

### INTERFERENCIAS "*IN VITRO*"

Las interferencias "*in vitro*" se originan del hecho de que los análisis bioquímicos se llevan a cabo en las complejas matrices que constituyen los líquidos biológicos (suero, plasma, orina, etc.) Dichas sustancias contienen cientos de componentes que poseen grupos químicos que pueden reaccionar en cierto grado con los reactivos utilizados, o pueden cambiar

las propiedades físicas o espectrales de la variable analítica estudiada. Esta situación se complica aún más debido a que la composición química de los líquidos orgánicos puede variar según la naturaleza y grado de los procesos patológicos. Esta variabilidad se ve aumentada por la posible presencia de un gran número de medicamentos. Cada uno de estos medicamentos, solos o combinados, pueden producir una interferencia positiva o negativa.<sup>9</sup>

**Hemólisis:** Representa una compleja serie de cambios para la Química Clínica por la natural adulteración de la solución. Ésta puede ser categorizada por la causa, el sitio, el intervalo de tiempo entre el rompimiento de las células y la punción o análisis. Cada una de estas variables modifica cuantitativamente los resultados finales en el laboratorio.

El modelo simple es la hemólisis "*in vitro*", si la sangre no es retornada a la circulación. Si es causada por equipo o técnicas inapropiadas de venodisección o por tratamientos inapropiados de almacenamiento de la sangre, también por el vaciado fuerte de la muestra.

El color característico causado por la hemoglobina extracelular advierte al analista de los probables resultados erróneos del laboratorio.

A causa de la alta absorción molar de la hemoglobina la absorbancia de la muestra mezclada con el reactivo puede contribuir a una imprecisión inaceptable a causa de las limitaciones inherentes a la alta lectura del aparato.

La hemólisis y la bilirrubina en algún momento puede ser minimizada si se evita la región de la luz del espectro donde la absorción de la hemoglobina causa problemas, o reduciendo el volumen de la muestra o el reactivo. Lo anterior es factible únicamente si el cromógeno final absorbe a longitudes de onda suficientemente alejadas del espectro de la hemoglobina actualmente se requiere el uso de substratos cromogénicos altamente selectivos que reaccionen con el analito de interés.

La hemólisis intra vascular es incluso más problemática porque es indistinguible inicialmente de la hemólisis "*in vitro*" ya que con el paso del tiempo fisiológicamente el mecanismo homeostático modifica el plasma hemolizado.<sup>10</sup>

Además de la alteración de la concentración de sustancias por la hemólisis, la hemoglobina por si misma puede causar interferencias metodológicas debido a que comienza a absorber alrededor de 340 nm por

lo que de esta manera afecta los métodos basados en la propiedad de absorción de NADH a NADPH.

Además cuando la hemoglobina llega a ser oxidada para formar metahemoglobina la absorción a 340 nm decrece, por tal razón la hemólisis inutiliza ciertas determinaciones especialmente en mediciones fotométricas cuando se emplean longitudes de onda más cortas del espectro visible (400 a 500 nm).<sup>11</sup>

### **Interferencias espectrales**

**Absorbancia:** El efecto más común es el efecto de la hemoglobina sobre numerosos procedimientos analíticos. Cuando se esta midiendo la reacción de un procedimiento colorimétrico en la banda de 500 a 600 nm del espectro visible existe una interferencia positiva si la muestra está contaminada con hemoglobina, la bilirrubina causa una interferencia similar. De este modo la mayoría de las interferencias espectrales dan resultados falsamente elevados.<sup>9</sup>

**Turbidez:** Es un tipo de interferencia espectral. Cuando se analiza una muestra turbia empleando una reacción colorimétrica, las lipoproteínas hacen dispersar la luz incidente en gran parte.

En el laboratorio es frecuente encontrar suero o plasma en estas condiciones en muestras que se obtienen de una a dos horas después de una comida rica en grasa o en pacientes con ciertas enfermedades metabólicas esto interfiere con las determinaciones espectrofotométricas, porque las partículas hacen dispersar la luz incidente y también hay un desplazamiento de volumen.

Aquí los blancos de muestra operan deficientemente debido a las absorciones muy altas encontradas con frecuencia. El mejor método para eliminar la interferencia causada por turbidez es diluir la muestra.

El grado de dilución de la muestra para reducir la interferencia está limitada por la capacidad del procedimiento para medir la variable analítica diluida por lo que se deben analizar simultáneamente varias diluciones para determinar la mejor respuesta.<sup>12</sup>

### **Interferencia química:**

Los tipos de interferentes inespecíficos que reaccionan químicamente pueden variar en gran medida. El ácido úrico, creatinina, proteínas y los compuestos que contienen grupos sulfhidrilos, reaccionan en la mayoría de los métodos reductores utilizados para la determinación de glucosa.

La reacción del picrato alcalino para la determinación de creatinina presenta interferentes negativos y positivos. (Cuadro 1,

Variable Analítica	Método	Interferencias
Glucosa	Azúcar reductor	Ácido úrico (+)
	Glucosa oxidasa	Ácido úrico (+)
	Peroxidasa de Rábano	Bilirrubina (-)
Creatinina	Picrato alcalino	Glucosa (+)
		Proteínas (+)

(+) interferencia positiva; (-) Interferencia negativa

**Cuadro 1. Compuestos químicamente interferentes.**

**Fuente: Kaplan y Pesce, 1991**

## INTERFERENCIAS "IN VIVO"

Existen "*in vivo*" numerosos factores que pueden jugar un papel significativo en la interpretación correcta de los resultados obtenidos que realizan los médicos. Esto merece especial consideración para aquellas pruebas en las que el intervalo de referencia es estrecho y un resultado puede considerarse incorrectamente anormal cuando en realidad puede ser normal para un paciente determinado.

Se destaca mucho la veracidad y la precisión de las técnicas analíticas modernas, pero es de igual importancia que se preste la misma atención a la fase pre-analítica y que las muestras analizadas sean de alta calidad uniforme.

La preparación, cuidados del paciente, toma y manejo adecuado de la muestra son los primeros pasos que garantizan resultados válidos aunque frecuentemente se descuidan.

Existen muchas variables pre-analíticas al preparar el paciente o al manejar la muestra que influirán en el resultado y afectarán la calidad del

servicio que se ofrece.<sup>13</sup> Los factores relacionados con el paciente que puede afectar los resultados se pueden dividir en aquellos que no se pueden modificar y los que pueden ser controlados por el paciente y/o por el personal del laboratorio el primer tipo de factores incluye:

- a) Edad y sexo
- b) Origen étnico
- c) Embarazo y menstruación
- d) Estado patológico
- e) Estrés físico y psicológico.

- a) Edad y sexo: Algunas pruebas como la fosfatasa alcalina pueden depender de la edad y el sexo. Los intervalos de referencia para todas las pruebas de laboratorio deben reflejar ambas variables.
- b) Origen étnico: Los resultados de laboratorio son variables en individuos de diferentes nacionalidades o grupos étnicos.
- c) Embarazo y menstruación: El embarazo ejerce profundos efectos sobre la interpretación de las pruebas de laboratorio de la madre, debido a los cambios hormonales y a la alteración del metabolismo.
- d) Estado patológico: Utilizar un suero hemolizado puede ser inevitable, especialmente durante cirugías cardíacas, desviaciones coronarias, cuando hay transfusiones, circulación extracorporeal o enfermedad de hemólisis del recién nacido. Así también la turbidez provocada por una concentración alta de triglicéridos en el suero provocará resultados aparentemente altos.<sup>8</sup>

Otra fuente de interferencia "*in vivo*" es la bilirrubina, parte de su interferencia surge de las propiedades espectrales así como de la habilidad para reaccionar químicamente con los reactivos.

La bilirrubina reacciona con la peroxidasa catalizando reacciones que son usadas en los sistemas de detección de glucosa, colesterol y ácido úrico. Así también la bilirrubina causa interferencia negativa en el método de creatinina-Jaffé, medido con los analizadores: Paramex (Baxter), The Dimension (Du Pont) y Chem-1 (Baxter-Technicon.)

Además la bilirrubina tiene la habilidad de reaccionar con reactivos electrofilicos como el ácido sulfanilico diazotizado pero puede también reaccionar con reacciones intermediarias catalizadas por peróxido de hidrógeno y causar interferencia negativa.<sup>14</sup>

- e) Estrés físico y psicológico: Este factor afecta los resultados del laboratorio al igual que las transfusiones sanguíneas y otras manipulaciones diagnósticas tales como: Cirugías, infusiones intravenosas e inyecciones intramusculares.

Todas las variables producen siempre un efecto, ello depende a menudo de la persona, de la duración del efecto, el tiempo entre el estrés inicial y la recolección de la muestra.

Existen otros factores modificables como son: <sup>4, 15</sup>

- a) Documentación correcta.
- b) Estasis venosa
- c) Dieta
- d) Ejercicio
- e) Postura
- f) Alcohol, tabaco y medicamentos.

a) Documentación correcta: Para evitar confusiones en los resultados, algunas muestras no son aceptables por el laboratorio para el análisis. Cada laboratorio determina la información del paciente que debe ser incluida en la tarjeta y en la muestra. Esta información incluye: Nombre, dirección, habitación, número de identificación, sexo y edad. El tubo y la tarjeta de laboratorio deben verificarse su identidad luego de recibidos. Las diferencias entre el nombre de la tarjeta de laboratorio y el envase de la muestra, es causa de rechazo de ésta.

b) Estasis venosa: El uso prolongado de un torniquete eleva un cierto número de resultados como proteínas y sustancias fijadas a proteínas como la bilirrubina y colesterol. Ciertas elevaciones pueden ocurrir con aplicaciones de torniquete de tan solo 3 minutos. Se conoce que el efecto combinado de la presión intravenosa elevada y la anoxia por la oclusión mantenida provoca el paso de agua y constituyentes de pequeño tamaño molecular desde la luz de una vena al líquido extracelular circundante, ya que los eritrocitos y proteínas del plasma, así como otras moléculas grandes no pueden pasar a través de la pared de una vena y por lo tanto su concentración aumenta.

c) Dieta: Ciertos alimentos o regímenes dietéticos especiales pueden afectar determinados constituyentes del suero. Una dieta rica en proteínas da como resultado un aumento de urea y de ácido úrico. Una alta proporción de ácidos grasos no saturados en relación con los

saturados da lugar a una disminución de los niveles de colesterol en suero.

- d) Ejercicio o trabajo muscular: Diversos ejercicios físicos aeróbicos y la natación han producido la elevación de resultados enzimáticos incluyendo los niveles de glucosa. En pacientes ambulatorios la sangre debe colectarse después de que el sujeto haya permanecido sentado quince minutos pero sus resultados no son comparables con los de pacientes hospitalizados cuya sangre a menudo se colecta después de permanecer acostados durante un periodo largo de tiempo. Procedimientos médicos como el masaje y la palpación pueden afectar los niveles de analitos circulantes a corto plazo y es importante dejar que pase suficiente tiempo después de tales procedimientos para tomar una muestra. Por tal motivo es importante tener un mayor conocimiento sobre los numerosos factores, que existen fuera de laboratorio y alrededor del paciente, que pueden afectar el resultado de la prueba antes de que la muestra llegue al laboratorio.
- e) Postura. La posición del paciente en el momento de la recolección puede tener un importante efecto sobre las proteínas y las sustancias unidas a proteínas séricas. Algunos de los componentes del suero que han demostrado variaciones posturales son las siguientes: proteínas totales, albúmina, enzimas, calcio y colesterol. Cuando un paciente pasa de la postura supina a la de pie estos componentes aumentan. Esto se debe atribuir al movimiento del agua dentro del compartimiento intravascular en la posición de pie.
- f) Alcohol, tabaco y medicamentos. Virtualmente todo medicamento afecta algún procedimiento de laboratorio. La interferencia puede aparecer *"in vivo"* o *"in vitro"*. El alcohol puede alterar los niveles de glucosa y ácido úrico en plasma. El tabaco puede falsear los resultados de gases sanguíneos.<sup>16</sup>
- Los problemas de interferencia *"in vivo"* se eliminan un poco cuando el médico confecciona una buena historia clínica y existe comunicación entre él y el laboratorio.



## AUTOMATIZACION.

Es un hecho que cada año se están llevando a cabo más pruebas en los laboratorios. Esto ha surgido por varias razones: ha aumentado el repertorio de pruebas disponibles, gracias a los avances en las ciencias médicas que ha hecho que más pacientes sobrevivan a enfermedades y traumatismos que hubiesen sido mortales hasta hace poco. En consecuencia se a creado una necesidad continua de pruebas de laboratorio para vigilar a este tipo de pacientes. Además, en la actualidad se dispone de más pruebas y el médico necesita los resultados de las mismas para considerarlos en el proceso de toma de decisiones médicas.

Junto con el aumento de la carga de trabajo sobrevino una demanda de mayor productividad entre los químicos del laboratorio. Como resultados se desarrollaron instrumentos automatizados complicados y altamente eficientes.<sup>17</sup>

La automatización se define como el automovimiento o transferencia mecánica de una muestra dentro de un sistema complejo que constituye una sucesión de máquinas auto activas, cada una de las cuales completa una etapa específica en el proceso analítico total, desde la muestra en bruto hasta el resultado analítico.

Una de las ventajas de la automatización es hacer posible el procesamiento de un gran número de muestras, y la realización de múltiples pruebas con una única muestra y con el mismo periodo de tiempo, así como con la misma cantidad de personal; esto tiene el beneficio de eliminar tareas repetitivas que pueden producir aburrimiento y falta de atención propiciando errores en el análisis.

Además el personal menos especializado puede practicar el manejo, quedando libres los técnicos con mayor preparación para problemas que requieren más experiencia.

La utilización de instrumentos electrónicos complejos se impone cada vez más en todas las ramas de Química Clínica, aunque los instrumentos son más seguros, están sujetos a repentinas averías y a medida que aumenta la complejidad de los componentes, alguno de éstos puede fallar o funcionar mal.

Los métodos analíticos automatizados dan mayor precisión que los métodos manuales y las determinaciones se realizan de forma mucho más reproducible si se procura que el instrumento funcione bien.<sup>18</sup>

Por otra parte el aumento de precisión es particularmente evidente cuando se analiza un gran número de muestras.

Sin embargo por cambio de las condiciones o alteración de los reactivos se puede causar un desplazamiento sistemático de los resultados cuando se procesa en series muy numerosos de análisis por un método dado, estos factores se compensan con la introducción de estándares y sueros de control a intervalos regulares

En los procedimientos normales existe una gran tendencia a omitir o colocar esos controles hacia el fin de la serie debido a los factores antes mencionados, mientras que los métodos automatizados de interposición de controles extra precisa solo de un esfuerzo adicional pequeño; también la corrección por desplazamiento puede precisar de cálculos adicionales de consideración en los métodos manuales; en un sistema automático esas correcciones se pueden realizar fácilmente si el procedimiento automatizado da una lectura directa de los resultados en una gráfica o numéricamente, así los errores en los cálculos y en la transcripción de resultados se reducen en gran manera. La desventaja es que cuando en un laboratorio se realizan operaciones altamente automatizadas y computarizadas los fallos en el sistema altamente complejo pueden dar como resultado una parada completa de laboratorio.

El personal del laboratorio debe estar alerta para el caso de obtener un resultado anormal. Con frecuencia la presencia de una interferencia puede sospecharse a partir de un color anormal u otra apariencia de la disolución final utilizada en las lecturas colorimétricas.

Con métodos manuales el personal de laboratorio tiene una idea adecuada de cual deberá ser la apariencia de la disolución final, y no deberá aceptar las lecturas sin crítica sobre las disoluciones que tienen un aspecto altamente anormal tales como el exceso de turbidez o una diferencia de matiz en el color. En forma automatizada no es posible detectar una interferencia química directamente.<sup>19</sup>

Para comprender mejor el papel de los interferentes en las determinaciones de Química Clínica de cinco elementos básicos (urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina) se procederá a hablar de los diferentes métodos de determinación para cada uno de ellos.

## MÉTODOS DE DETERMINACIÓN PARA CREATININA

La creatinina es el anhídrido de la creatina. Sus valores se usan en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades renales, en el monitoreo de diálisis renal, insuficiencia cardiaca, hipertensión arterial, acromegalia, deshidratación y como base de cálculo para medir otros analitos de la orina.<sup>20</sup>

La mayoría de los métodos para la determinación de creatinina se basan en la reacción de Jaffé, descrita en el año de 1886 que se distingue por ser el método de Química Clínica más antiguo aún vigente. La creatinina (I) en esta reacción forma un complejo con picrato alcalino (II) para formar un compuesto de color anaranjado llamado Janowsky (III) que se mide fotométricamente. (Figura 1)

Desgraciadamente este método tan simple, no es específico para la creatinina, existiendo muchas sustancias en la sangre que también reaccionan con el picrato alcalino.

La absorción del complejo Janowsky se mide entre (510 y 520 nm), teniendo su máximo de absorción a 485 nm. El ion picrato (presente en exceso en la solución de reacción), absorbe significativamente a longitudes de onda por debajo de 500 nm.

Las principales desventajas de la reacción original de Jaffé se relacionan con su falta de especificidad. Entre las sustancias que causan interferencia positiva están: ácido ascórbico, piruvato, acetona, ácido acético, glucosa, ácido úrico, proteínas y antibióticos. Estos interferentes son capaces de reducir el picrato a picramato con un máximo de absorción a 485 nm, lo que produce una sobre estimación de la creatinina. Las temperaturas elevadas (más de 30° C) y los prolongados tiempos de reacción (más de 5 minutos) aumentan la interferencia. Cualquier compuesto con un grupo metilo o metileno activo introducen errores en virtud de su acoplamiento con el picrato por un mecanismo análogo al de la creatinina. Todos estos compuestos pueden producir sustancias coloreadas, que aumenta entonces la absorción en la región del complejo creatinina-picrato.

La bilirrubina u otros productos de degradación de la hemoglobina causan una interferencia negativa, probablemente por su oxidación en medio básico fuerte a un compuesto incoloro. La disminución resultante hace descender la absorción medida lo cual se interpreta como menor concentración de creatinina. Esta interferencia negativa se observa con frecuencia en el análisis cinético de creatinina.<sup>21</sup>

Los interferentes causan diferencias en las condiciones de reacción que alteran la reactividad de los diversos compuestos no creatinínicos hacia el picrato. Sin modificaciones en la reacción de Jaffé se podría esperar que aproximadamente el 20% de la medición de creatinina en suero o plasma sea causada por materiales no creatinínicos.

Estos porcentajes dependen de las concentraciones de los interferentes y podrían aumentar considerablemente en muestras de pacientes con diversos procesos patológicos. Una desventaja menor de la técnica Jaffé es la necesidad de trabajar con bases fuertes.<sup>10, 16,22</sup>

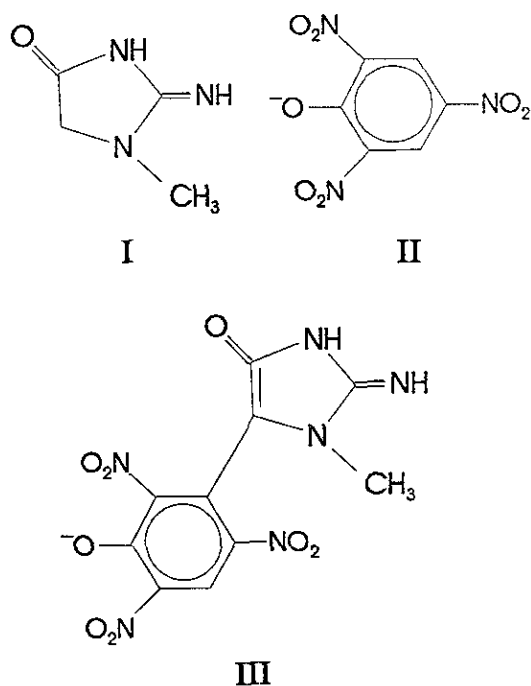
Con todas estas desventajas, es sorprendente que esta metodología haya sido tan ampliamente utilizada por tan largo tiempo, siendo su ventaja solo su adaptabilidad a la automatización y su bajo costo.

La determinación de creatinina por este método puede ser llevada a cabo de tres formas: como método de punto final, cinético o con blanco de suero, aunque existen otros métodos utilizados menos frecuentemente.

### **Método de punto final.**

Cuando se analiza suero o plasma en una reacción de punto final, se utiliza un filtrado libre de proteínas, dado que los grupos alfa-cetometilo o alfa-cetometileno de las proteínas son reactivos con el picrato alcalino y los complejos resultantes son altamente coloreados.

La reacción se realiza a temperatura constante de menos de 30°C a mayores temperaturas, la glucosa, el ácido úrico y el ácido ascórbico pueden tener una reacción reductiva inaceptablemente elevada con el picrato, formando picramato con absorción máxima a 482 nm, produciéndose una sobre estimación de creatinina. Es importante mantener la temperatura constante porque la absorción del ion picrato y el producto de la reacción creatinina-picrato aumentan al elevar la temperatura. No suele estabilizarse el pH de la reacción pero se lleva a cabo en una solución de NaOH al 0.1 mol/L, generalmente.<sup>21</sup>



**Figura 1. Reacción de creatinina con picrato alcalino para formar el complejo de Janowski.**

**Fuente: Kaplan y Pesce, 1991**

### **Método cinético:**

Este método ha ganado popularidad con la disponibilidad de instrumentos capaces de efectuar lecturas exactas de absorción a intervalos precisos altamente reproducibles. Se realizan lecturas secuenciales en puntos precisos de la cinética de reacción y se comparan con estándares. Existe una diversidad de equipos automatizados que utilizan este método como: el ACA Du Pont y el analizador Beckman.

En la modificación cinética, la formación del complejo picrato-creatinina es monitoreada luego de 10 a 60 segundos de retardo tras la mezcla de los reactivos; esto permite que los interferentes de reacción rápida como el aceto acetato sean eliminados en gran medida antes de efectuar la lectura inicial de absorción. Se realizan mediciones adicionales durante o al final de un período de 16 a 120 segundos, antes de que se haya completado la reacción de la creatinina y que los interferentes de

reacción más lenta como la glucosa pueda reaccionar significativamente. No es necesaria la desproteinización, dado que la reacción entre el picrato alcalino y la proteína es lenta y no se produce significativamente durante el intervalo habitual de la reacción cinética. No se hace ninguna corrección por los reactantes no creatinínicos cuyas velocidades de reacción son comparables a la de la creatinina, como es el caso del piruvato, el alfa-cetoglutarato y el oxalacetato. Las principales ventajas de los métodos cinéticos son el pequeño volumen de muestra requerida, la velocidad de análisis y la adaptabilidad a la automatización.<sup>21,23</sup>

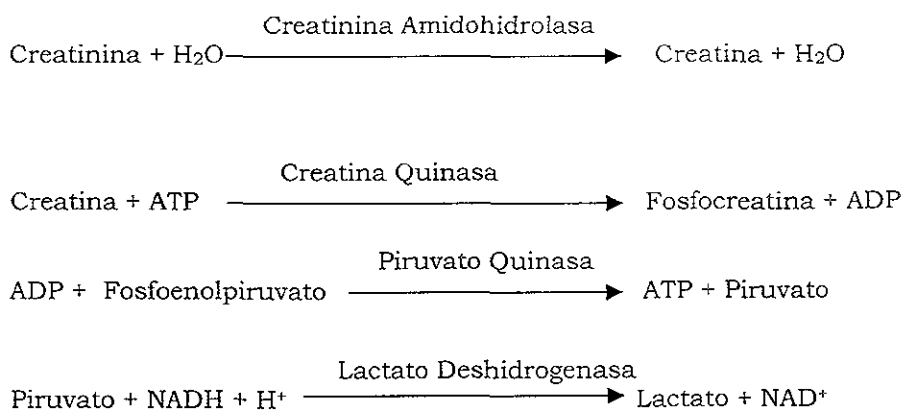
### **Método usando un blanco de suero.**

Se ha descrito que el uso de un blanco de suero a pH de 9.65 elimina interferencias causadas por proteínas y otros interferentes distintos de creatinina. Se emplean amortiguadores de fosfato (136 a 173 mmol/L) para producir pH de reacción de 9.65 a 11.5.

Por otra parte, las condiciones de reacción son comparables a la reacción manual de Jaffé. El intervalo de reacción es de 45 minutos a una temperatura de 37°C. En estas condiciones los cromógenos pseudocreatinínicos comúnmente hallados se describen como no reactivos y la interferencia causada por la reacción de proteínas a pH 11.50 es reducida por el blanco de pH 9.65.<sup>12,21,24</sup>

### **Método enzimático:**

Se han investigado dos enzimas degradadoras de creatinina para uso en su análisis. Desarrollado por primera vez en 1937, el método enzimático se ha vuelto solo recientemente disponible para uso clínico de rutina. El principal problema ha sido el requerimiento de enzima pura, y sólo en años recientes ha sido posible obtener enzima suficientemente pura de calidad constante. La creatinina amidohidrolasa (EC 3.5.3.10), también denominada creatinasa o creatina hidrolasa, ha sido utilizada para convertir creatinina en creatina, acoplada a una reacción indicadora, ésto permite el seguimiento continuo de la desaparición del NADH. (Figura 2)



**Figura 2. Serie de reacciones enzimáticas que emplean creatinina amidohidrolasa para la cuantificación de creatinina.**

**Fuente: Kaplan y Pesce, 1991**

El segundo sistema enzimático empleado para cuantificación de creatinina es la creatina desaminasa (EC 3.5.4.21), conocido también como creatinina iminohidrolasa.

Esta enzima es responsable de la conversión de creatinina en N-metilhidantoina y amoníaco. En este método el amoníaco se cuantifica colorimétricamente luego de esta reacción, con alfacetaglutarato, monitoreando la desaparición de NADPH, o mediante el uso de un electrodo de amoníaco, en cualquiera de estos dos procedimientos, la mezcla de reacción debe estar libre de materiales productores y consumidores de amoníaco. Además se debe efectuar una corrección de amoníaco endógeno.

Si bien la concentración de amoníaco fisiológicamente producido es relativamente bajo, pueden aparecer cantidades sustanciales de amoníaco por desaminación proteica si la sangre se deja a temperatura ambiente.<sup>21</sup>

Lo más importante de la determinación de creatinina es la exactitud, especialmente para muestra de pacientes con disfunción renal, en las que es probable la presencia de interferentes potenciales. Además dado que el análisis se utiliza como el indicador más confiable de función renal, debe estar disponible con un mínimo de tiempo y en particular cuando se solicita en pacientes pediátricos y en pacientes sometidos a diálisis en

donde el volumen de la muestra es mínimo. El método que actualmente satisface estos criterios es la reacción de Jaffé, con pretratamiento mediante tierra de Fuller. Este método es adaptable a un instrumental común, su resistencia a la interferencia ha sido totalmente comprobada durante muchos años y tiene un elevado nivel de exactitud y precisión. Solo el piruvato y oxoglutarato siguen siendo fuentes potenciales de error cuando están presentes en elevadas concentraciones. Las ventajas de este procedimiento son que la introducción de tierra Fuller implica necesariamente un procedimiento manual, y el requerimiento de muestra es mayor que en métodos totalmente automatizados.

El método enzimático no se recomienda, y no es por la falta de especificidad o sensibilidad, sino debido a la relativa ausencia de disponibilidad de reactivos y a la hasta ahora no probada susceptibilidad hacia los materiales interferentes. La reciente disponibilidad de reactivos enzimáticos puros a permitido adaptar los métodos enzimáticos al análisis automatizado. Estas técnicas prometen reemplazar los ensayos químicos de creatinina, ahora en uso común. <sup>25, 26, 27, 28</sup>

#### **METODOS DE DETERMINACION PARA UREA:**

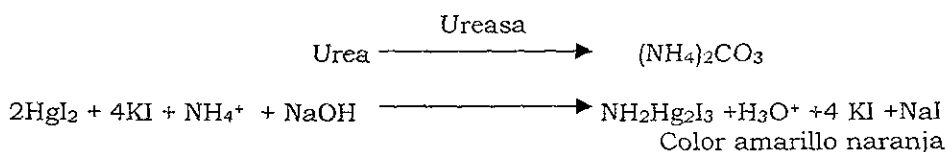
La urea, principal producto final del metabolismo de las proteínas en el hombre, se deriva fundamentalmente a partir de los grupos amino de los aminoácidos. Los valores de urea se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de ciertas enfermedades renales y metabólicas. Ha sido tradicionalmente cuantificada por análisis químico, directo o indirectamente por conversión previa a amoniaco. La mayoría de los métodos históricos implican la medición del nitrógeno del amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) luego de tratar las muestras mediante temperaturas elevadas o por acción de la enzima ureasa. La especificidad de la ureasa por la urea hace de la reacción enzimática el método preferido para la conversión de urea en amoniaco.<sup>29</sup>

Se han desarrollado varios métodos para la determinación de este analito.



### Método de Nessler:

Es un método antiguo para cuantificar el amoníaco liberado de la urea utilizando una titulación ácida. El amoníaco gaseoso liberado se titula con ácido sulfúrico diluido en presencia de un indicador de pH coloreado en la solución. (Figura 3)



**Figura 3. Reacción de Nessler formando un quelato amarillo.**

**Fuente: Kaplan y Pesce, 1991**

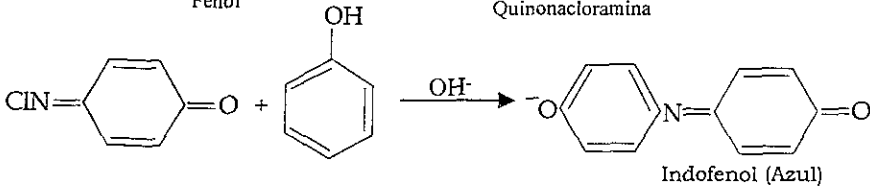
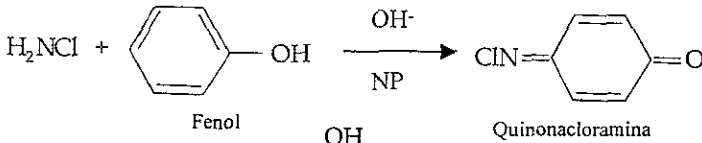
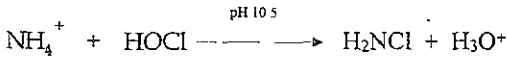
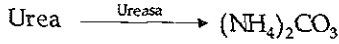
La reacción de Nessler implica formación de un quelato complejo amarillo (cuya composición real no es conocida) entre el amoníaco y el  $\text{HgI}_2$  en medio alcalino. El cromógeno tiene un máximo de absorción a 410 nm. Este método es cuantitativo, de punto final y espectrofotométrico. Es infrecuente y sólo tiene interés histórico, es inespecífico y sus tiempos de reacción son prolongados.

La reacción de Nesslerización ha demostrado mayores dificultades, primero, es susceptible a los niveles de acetona presente en pacientes con cetoacidosis diabética y después la dificultad para automatizarlo (semejante a la reacción de Berthelot.) La formación de turbidez a medida que avanza la reacción también constituye un problema importante. Se ha intentado reducir la turbidez mediante el agregado de agentes oxidantes o el empleo de filtrados libres de proteínas.

Cuando la concentración de urea se aproxima al límite superior normal, registran coeficientes de variación más elevados que los laboratorios que emplean la reacción de Berthelot y Nesslerización en técnicas no automatizadas, que los otros laboratorios que emplean métodos automatizados.<sup>30</sup>

### Método de Berthelot:

La reacción de Berthelot entre amoníaco y fenol-NaOCl, produce un complejo de azul de indofenol cuya absorción máxima es a 630 nm. Este método se realiza a menudo con nitroprusiuro de sodio (nitroprusiuro),  $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}$ , como catalizador. (Figura 4)



(NP, nitroprusiato, usado como catalizador)

**Figura 4** Reacción de Berthelot en la formación de indofenol (azul).

**Fuente:** Kaplan y Pesce, 1991

En este método se hidroliza la urea con ureasa y el amonio liberado se mide como indofenol. La reacción de indofenol puede llevarse a cabo tanto en soluciones desproteinizadas como en soluciones que contengan proteínas. Se pueden utilizar sustancias para catalizar la reacción del indofenol pero la más efectiva de todas ellas es el nitroprusiato, el cual incrementa la velocidad de transformación del amonio a indofenol.<sup>31</sup>

En la actualidad los métodos para la determinación cuantitativa de urea por reacción de Berthelot no son usados en automatización debido principalmente a la dificultad para adaptarlos y a sus complicaciones técnicas inherente (tales como la especificidad.) La reacción de Berthelot se realiza como procedimiento de punto final, lo cual la hace susceptible a una conversión incompleta de urea a amoníaco. Este método requiere

tiempo en incubación relativamente prolongado. Sin embargo es el método que más se utiliza en las determinaciones manuales en la mayoría de los laboratorios que carecen de la automatización.

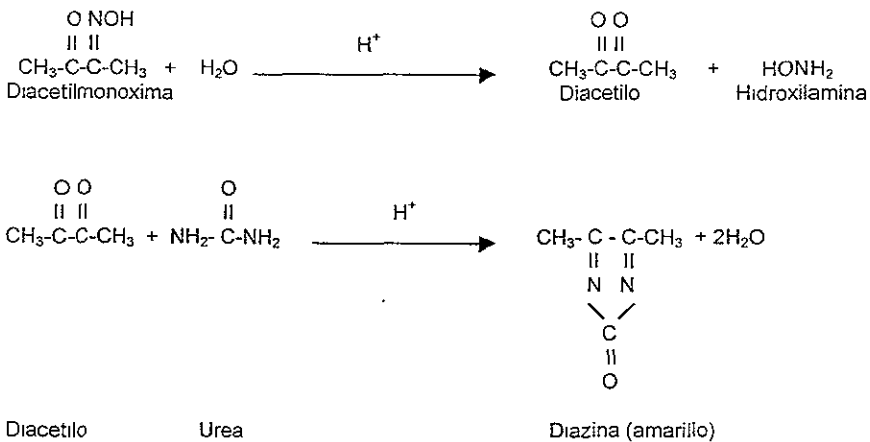
Los glóbulos rojos y el plasma contienen cantidades similares de urea de modo que la hemólisis no debería tener efectos sobre los resultados, sin embargo se ha descrito gran influencia de la hemólisis debida a interferencia analítica para los métodos que usan esta reacción.

Tanto los procedimientos de titulación como los de Nesslerización han sido, cuando menos en gran parte, desplazados por la reacción de indofenol de Berthelot, lo cual es, aproximadamente 10 veces más sensible para el ion amonio que la Nesslerización.<sup>30</sup>

### **Método de diacetilmonoxima:**

Es el único análisis químico directo para urea. Fearon observó inicialmente que la diacetilmonoxima reacciona con varias aminas primarias y secundarias. Muchos otros compuestos contienen residuos de urea en su estructura, como citrulina, aloxano y alantoína produciendo también un producto coloreado, sin embargo, las bajas concentraciones de estos compuestos en el suero rara vez causan una interferencia significativa. Otros compuestos presentes en el suero a niveles significativos, como creatinina y proteínas, producen cromógenos con diferentes máximos de absorción, de modo que no producen interferencias significativas. La diacetilmonoxima no reacciona directamente con la urea, sino que es primero hidrolizada formando diacetilo e hidroxilamina, el diacetilo se condensa con la urea en solución ácida para formar una diazina coloreada; este cromógeno se mide a 550 nm y también por fluorescencia a 415 nm. Se han empleado varios compuestos para intensificar y estabilizar el color producido en la reacción de la diacetilmonoxima, ya sea directamente (como tiosemicarbazida, iones férricos o glucurolactona) o indirectamente por la eliminación de la hidroxilamina formada en la hidrólisis inicial (por compuestos como persulfato de potasio.)

Este método es cuantitativo, de punto final y colorimétrico. Entre los inconvenientes más importantes de este método cabe citar los siguientes: el color se desarrolla con rapidez y una vez alcanzado el máximo disminuye también rápidamente; el método obedece deficientemente la ley de Beer; la reacción produce un olor desagradable y humos irritantes por lo que es aconsejable llevarla a cabo en una campana de humos. El tiempo de calentamiento necesario para lograr un desarrollo máximo de color con la diacetil monoxima depende de la concentración de urea.<sup>30, 32</sup> (Figura 5)



**Figura 5 Reacción de diacetil monoxima para la medición de urea.**

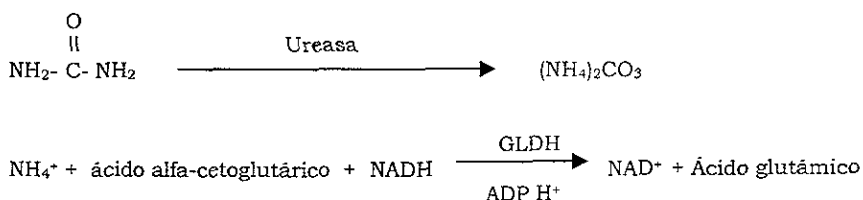
**Fuente: Henry, 1980.**

**Método enzimático acoplado (ureasa/glutamato deshidrogenasa) (GLDH):**

El método para medir concentraciones de urea en suero mediante la cuantificación de  $\text{NH}_3$  formado por la reacción de ureasa, emplea un sistema enzimático acoplado que consiste en una reacción indicadora NAD/NADH. Estas reacciones se miden a 340 nm, existen otras enzimas endógenas que pueden competir con la reacción indicadora (GLDH) para oxidar el NADH disminuyendo la exactitud del sistema enzimático acoplado. Además, el amoníaco exógeno proveniente de los reactivos puede dar valores falsamente elevados. La reacción acoplada ureasa/GLDH llevada a cabo cinéticamente es también útil como medida de la urea en la orina en niveles normales de amoníaco endógeno, dicho amoníaco es rápidamente consumido en los segundos iniciales de la reacción y los cambios posteriores de absorción a 340 nm son esencialmente causados por el amoníaco generado por la reacción de la ureasa sobre la urea. La Asociación Americana de Química Clínica ha recomendado el método enzimático acoplado de punto final como candidato a método de referencia para urea en suero. Este es un método manual que emplea un sobrenadante libre de proteínas obtenidas por la técnica de Somogy para

la determinación de urea. Tiene una buena comparación con el método de indofenol de Berthelot.<sup>32</sup>

Un método de elección para el laboratorio automatizado moderno es el de ureasa/GLDH en su forma cinética dado que son los de mayor especificidad, rapidez y precisión de todos los métodos actualmente en uso. El procedimiento ureasa/GLDH es el que se adapta más fácilmente a una amplia gama de instrumentos.<sup>29</sup> (Figura 6)



**Figura 6. Reacción enzimática utilizando ureasa en la medición de urea.**

**Fuente: Kaplan y Pesce, 1991**

## MÉTODOS DE DETERMINACIÓN PARA ÁCIDO ÚRICO:

El ácido úrico es el producto final de la degradación de las nucleoproteínas, también es sintetizado a partir de moléculas más simples tales como: glicina, amoniaco y anhídrido carbónico.

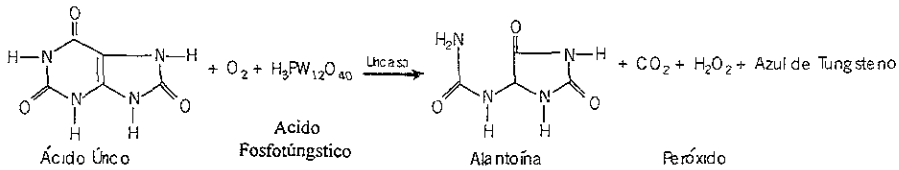
Los valores de ácido úrico se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de numerosas enfermedades renales y metabólicas, incluyendo insuficiencia renal, gota, hepatopatías y leucemia. Estos son algunos de los métodos que se emplean para su determinación: Con ácido fosfotúngstico, enzimático y por cromatografía.<sup>33</sup>

### Método con ácido fosfotúngstico:

La mayoría de los métodos se basan en la oxidación del ácido úrico a alantoina por medios químicos o enzimáticos. Los métodos antiguos son principalmente procedimientos fotométricos relacionados con la reducción del tungstato a un complejo de color azul. El agente oxidante utilizado es el fosfotungstato alcalino, cuyo producto de reducción es el azul de

tungsteno que puede medirse fotométricamente a 700 nm. Sin embargo este método presenta varias dificultades inherentes, que incluyen la coprecipitación del ácido úrico con las proteínas del plasma o suero, la formación de turbidez durante el desarrollo de color y la presencia de sustancias endógenas potencialmente interferentes, tales como glucosa en concentraciones muy altas.

El uso de un filtrado libre de proteínas para la formación del color elimina la mayoría de las interferencias, como el glutatión y ergotioneína de los eritrocitos. El carbonato sódico inicialmente utilizado como reactivo para conseguir un medio alcalino ha sido sustituido por cianuro sódico para incrementar la sensibilidad del ensayo.<sup>29, 34, 35</sup> (Figura 7)



**Figura 7. Reacción en la medición de ácido úrico utilizando ácido fosfotúngstico.**

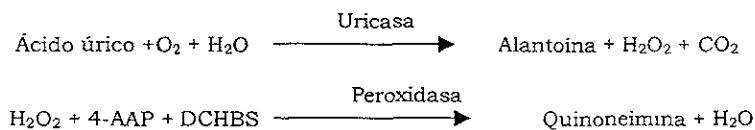
**Fuente: Anderson y Cockayne, 1995**

### Método empleando la enzima uricasa:

La uricasa se emplea para aumentar la especificidad del ensayo de ácido úrico. Los métodos de uricasa se basan en la especificidad de la reacción del ácido úrico catalizada por la uricasa, a alantoína y peróxido de hidrógeno. La alantoína a diferencia del ácido úrico no posee un pico de absorción en la región de 290 nm a 293 nm del espectro ultravioleta. Se han empleado mediciones de absorción a estas longitudes de onda antes y después de la incubación del ácido úrico con uricasa, para cuantificar ácido úrico en suero o plasma. Actualmente también se emplea como reactivo revelador de la acción del peróxido a la 4-aminoantipirina (4-AAP) y el sulfonato de 3,5-dicloro-2-hidroxibenceno (DCHBS) en una reacción catalizada por peroxidasa para producir un producto coloreado.

Se ha estudiado la interferencia de unas 20 sustancias entre estas están: anticoagulantes, conservadores y solamente la xantina ejerce una

interferencia significativa, otras sustancias como EDTA y fluoruro de sodio presentan una interferencia que no es significativa.<sup>34</sup> (Figura 8)



**Figura 8. Reacción en la medición de ácido úrico utilizando la enzima uricasa.**

**Fuente: Anderson y Cockayne, 1995**

## **MÉTODOS DE DETERMINACION PARA COLESTEROL.**

El colesterol es un esteroide que se encuentra en todos los tejidos animales y cumple muchas funciones fisiológicas importantes, incluyendo la síntesis de ácidos biliares, hormonas, esteroides y membranas celulares.

Los valores de colesterol se usan en el diagnóstico y tratamiento de enfermedad coronaria aterosclerótica y en el diagnóstico de trastornos relacionados con el metabolismo de lípidos y lipoproteínas.

La determinación de colesterol total incluye la forma libre y esterificada del esteroide. En el suero o plasma dos tercios del colesterol total se encuentran en forma esterificada y el resto en forma libre. Esto tiene ciertas implicaciones analíticas ya que en algunas reacciones el desarrollo de color es más intenso con los ésteres de colesterol que con las formas libres, esto a su vez, puede conducir a una gran desviación positiva, por tal razón el conocimiento de la química en los diversos métodos de análisis del colesterol y el reconocimiento de sus limitaciones resulta de fundamental importancia en la selección del método a emplear en el laboratorio. Con mucha frecuencia las consideraciones giran en torno a factores como simplicidad, velocidad, conveniencia y por otro lado exactitud y precisión. Por ello, para este analito existe una gran variedad de métodos de determinación, los cuales se clasifican de acuerdo al número de etapas en que se llevan a cabo.

**Métodos de una sola etapa:** En estos ensayos directos no hay aislamiento ni purificación del esteroide o de los esteroides, por lo tanto los procedimientos directos se llevan a cabo en muestras de suero o plasma sin etapas de previa extracción con solventes. En este caso, la ventaja reside en la rapidez y simplicidad del análisis, dado que sólo suele requerirse un reactivo, hay escasa manipulación de la muestra y por lo tanto el método es adecuado para su automatización. Los ensayos colorimétricos y fluorométricos suelen ser rápidos y convenientes, sin

embargo según la reacción química, estas técnicas son factibles de exhibir errores positivos y negativos debido a la presencia de proteínas, bilirrubina, vitaminas A, C, y D, hormonas esteroides, ácido úrico, turbidez y diferencias de cromogenicidad del colesterol libre y los ésteres de colesterol.

**Métodos de dos etapas:** En este tipo de ensayos se introduce una etapa de extracción en fase orgánica antes de medir el colesterol y esteroides químicamente afines, este pretratamiento elimina muchos cromógenos inespecíficos que podrían interferir en el ensayo; la respuesta cromogénica relativa de cada sustancia interferente depende de la química involucrada.

Dado que estos métodos no incluyen una etapa de saponificación, sigue en pie el efecto de error de la respuesta de color diferencial entre colesterol libre y esterificado, especialmente en las reacciones de Liebermann y Burchard, sin embargo, para la mayor parte del trabajo clínico de rutina, este procedimiento de dos etapas ha tenido buena aceptación, los valores obtenidos coinciden estrechamente con los del método de Abell y cols. La correlación es aún más estrecha cuando se añade un factor de calibración para corregir el desarrollo de color diferencial por la presencia de colesterol libre y esterificado.

**Métodos de tres etapas:** Estos procedimientos incluyen, además de la extracción del colesterol, una etapa de saponificación que hidroliza la porción ácido graso de los ésteres del colesterol. En consecuencia se mide sólo el colesterol libre. El método Abell y cols pertenece a esta clasificación y actualmente se considera el método de referencia.

**Métodos de cuatro etapas:** Estos métodos incluyen, además de la extracción, la saponificación y desarrollo de color de los procedimientos de tres etapas, la purificación de los esteroides totales y extraíbles para determinar el colesterol, mediante la adición de una saponina, la digitonina. El sitio reactivo de la posición C-3 del anillo de ciclopentanoperhidrofenantreno del colesterol es el grupo hidroxilo que esterificado por la digitonina produce la precipitación del complejo. La adición de la etapa de precipitación con digitonina elimina también el efecto de los cromógenos inespecíficos interferentes. Empíricamente, los procedimientos de cuatro etapas deben ser más exactos y precisos que los otros, con la posible excepción de las determinaciones enzimáticas del colesterol, sin embargo a menos que se tomen precauciones extremas, mayor cantidad de etapas significa también mayor cantidad de errores. Por ejemplo, mientras que la precipitación con la digitonina incrementa la exactitud del método, el reactivo debe descomponerse totalmente y ser



eliminando, ya que de lo contrario se produce desarrollo de color adicional y por ende error positivo.

Literalmente se han publicado cientos de métodos de análisis de colesterol, en general como modificaciones de las siguientes reacciones.<sup>36, 37</sup>

- 1) Libermann-Burchard.
- 2) Ácido-sal férrica.
- 3) Ácido p-toluensulfónico
- 4) Punto final enzimático.

#### **Reacción de Liebermann-Burchard:**

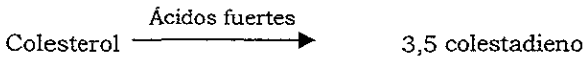
Entre las numerosas reacciones colorimétricas no enzimáticas para colesterol, la de Liebermann-Burchard es quizá la más ampliamente utilizada. Se lleva a cabo generalmente en un medio que contiene ácidos fuertes (ácido sulfúrico, ácido acético y anhídrido acético.) En la reacción química, el colesterol sufre una oxidación gradual en cada una de cuyas etapas se produce una molécula de colestapolieneo con un doble enlace más que el compuesto del cual deriva.

La etapa inicial de la reacción de Libermann-Burchard consiste en la protonación del grupo OH del colesterol, con posterior pérdida de agua, para formar un ion carbonio, 3,5 colestadieno, primer paso en la reacción de color. La oxidación secuencial de este ion carbonio alílico por el  $\text{SO}_2$  produce un compuesto cromóforo colestá-hexaeno-ácido sulfónico, con un máximo de absorción a 410 nm. Esta reacción química para las determinaciones de colesterol ha sufrido numerosas modificaciones a través de los años, habiendo incluido la medición de colesterol libre y esterificado.

Numerosos investigadores han inventado aplicar la reacción de Liebermann-Burchard directamente al suero sin una extracción previa del colesterol con un solvente orgánico. Richard y cols han descrito métodos directos simples, rápidos para colesterol sérico. Estos investigadores sostienen que los resultados de su procedimiento coinciden con los de Abell y cols. Debe señalarse que la reacción de Liebermann-Burchard tiene una desviación positiva considerable si la saponificación y purificación no se realizan con el cuidado necesario. Así también niveles de bilirrubina

superiores a 25 mg/L provocan elevación falsa de los resultados.<sup>17</sup> (Figura 9)

Pasos de deshidratación.



Dos pasos de oxidación.



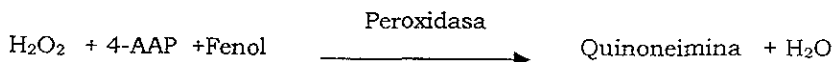
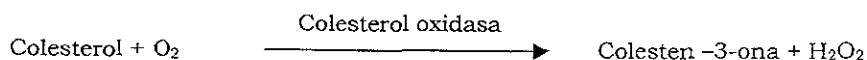
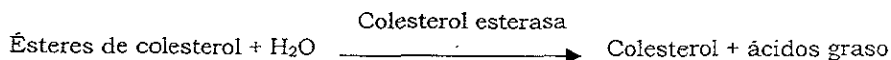
**Figura 9. Reacción de Liebermann- Burchard en la medición de colesterol.**

**Fuente: Anderson y Cockayne, 1995.**

#### **Método de punto final enzimático:**

Recientemente han aparecido técnicas enzimáticas que compiten con la reacción de Liebermann-Burchard, el método original utilizaba la saponificación química preliminar de la muestra para producirse sólo colesterol libre, en el siguiente paso se agregaba colesterol oxidasa, una enzima casi totalmente específica para el colesterol, que produce su degradación a coles-4-eno-3-ona y peróxido de hidrógeno, luego se emplean diferentes sistemas de reacción para producir un cromógeno final.

El procedimiento enzimático actual utiliza la enzima colesterol esterasa para reemplazar la saponificación química. La colesterol esterasa es específica para los ésteres de colesterol, a los cuales disocia en colesterol libre y ácidos grasos. (Figura 10)



### Reacción 10. Reacción enzimática de colesterol

Fuente: Kaplan y Pesce, 1991

La reacción de Trinder que forma la quinoneimina coloreada con un máximo de absorción 500 - 525 nm es la base de la mayoría de los equipos actualmente comerciales.<sup>36, 37</sup>

### MÉTODOS DE DETERMINACIÓN PARA ALBÚMINA.

La albúmina es la más pequeña y abundante de las proteínas del plasma, constituyendo normalmente algo más de la mitad de las proteínas totales. La medición de albúmina se utiliza en el diagnóstico y tratamiento de numerosas enfermedades que afectan el hígado y los riñones.

También juega un papel importante en la regulación osmótica y define el comportamiento intravascular, su segundo papel en importancia es que sirve como molécula de transporte.

Los métodos más ampliamente empleados para el análisis de albúmina son los de fijación de colorantes, ya que la albúmina tiene la capacidad de fijar una amplia variedad de aniones orgánicos incluyendo moléculas de colorantes complejos.

Las técnicas de fijación de colorantes están basadas en un desplazamiento del máximo de absorción del colorante cuando se fija la albúmina. Dicho desplazamiento permite que el color formado pueda medirse en presencia de exceso de colorante, el cual, con la elevada afinidad de unión con la albúmina permite que todas las moléculas de albúmina tomen parte en la reacción. Se ha utilizado una amplia variedad de colorantes para la medición de albúmina, incluyendo naranja de metilo, verde de bromocresol y púrpura de bromocresol.

Los radicales de las proteínas a los que se une el colorante son capaces de unirse también, reversiblemente a otras sustancias tales como bilirrubina, ácidos grasos libres y medicamentos.<sup>38, 39</sup>

### **Verde de bromocresol:**

Introducida por Rodkey en 1965, esta reacción se suele llevar a cabo a un pH de 4.2 a 4.5 y es seguida a 620-630 nm. La absorción del verde de bromocresol fijado por la albúmina se mide a 628 nm en amortiguador succinato 0.075 M a pH de 4.20, a las soluciones de amortiguador y verde de bromocresol se les añade Brij-35, un detergente no iónico, a fin de reducir la absorción del blanco, prevenir la turbidez y proveer linealidad. La técnica de verde de bromocresol es específica y muy sensible para la cuantificación de albúmina, es menos afectado por la lipemia y por cifras altas de hemoglobina y bilirrubina. El empleo de blancos no corrige esta interferencia y la tendencia negativa está causada en consecuencia por interferencia con la fijación al colorante y no por el color de la hemoglobina.

El verde de bromocresol no se conjuga con otras proteínas séricas, como la hace el anaranjado de metilo. El procedimiento con verde de bromocresol es el ensayo por fijación de colorante más usado; según una encuesta realizada sobre eficiencia de laboratorio.<sup>39</sup> (Figura 11)



**Figura 11. Reacción con colorante de verde de bromocresol para la medición de albúmina**

**Fuente: Kaplan y Pesce, 1991**

### **Púrpura de bromocresol:**

Es un colorante similar al verde de bromocresol, esta técnica es interferida por la presencia de salicilatos, bilirrubina y lípidos.

La púrpura de bromocresol reacciona con la albúmina a pH 5.2 y su desplazamiento de color se mide a 603 nm, es posible medir estas reacciones de punto final o con blancos, como reacciones rápidas (60 segundos).

La bilirrubina unida a la albúmina interfiere en las mediciones de la concentración de albúmina utilizando el colorante de púrpura de bromocresol probablemente por competir por el sitio de la albúmina. Esta interferencia no se ve con bilirrubina no conjugada la cual es fácilmente desplazada de la albúmina por exceso de púrpura de bromocresol.<sup>40, 41</sup> (Figura 12)

Albúmina + púrpura de bromocresol  $\longrightarrow$  Complejo albúmina-púrpura  
bromocresol

**Figura 12. Reacción con colorante de púrpura de bromocresol para la medición de albúmina.**

**Fuente: Kaplan y Pesce, 1991**

Por lo tanto para realizar la parte experimental se empleó en el desarrollo de técnicas manuales: reactivo de Merck método cinético para creatinina, Ecoline-Biotrol para glucosa basados en la reacción GOD-PAP, Ecoline- Biotrol para colesterol que utiliza la reacción de Chod-PAP , de Merck para albúmina que emplea el colorante de verde de bromocresol, Lakeside para urea que emplea el método colorimétrico enzimático en la reacción de Berthelot, Bioxón para ácido úrico con fosfotungstato, de Merck colorimétrico de punto final para bilirrubina total y reactivo de Merck para la determinación de hemoglobina reacción de punto final.

Y para las determinaciones automatizadas, el equipo SINCHRON CX7 Delta Beckman trabajó con reactivos de la casa comercial Beckman en el análisis de: urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se reporta en la literatura que existen sustancias de interferencia en las diversas determinaciones de Química Clínica y que en ocasiones no es posible eliminar como es la presencia de: glucosa, hemoglobina, bilirrubina y medicamentos, ya que los pacientes son diabéticos, otros pueden estar hemolizando, y algunos presentan suero icterico y no es factible suspender el tratamiento médico. Estos estudios se han realizado específicamente en equipos automatizados y muy escasamente con métodos manuales.

En las condiciones económicas que se encuentra el país es posible darse cuenta que lo que prevalece en el medio de los laboratorios clínicos son las determinaciones manuales, de aquí el interés por realizar un estudio que evalúe el efecto de interferencia de la bilirrubina, glucosa y hemoglobina a diferentes concentraciones e interrelacionarlas entre sí, como sucede normalmente en las determinaciones rutinarias dentro de un laboratorio clínico.

Los analitos a medir estando presentes las sustancias de interferencia son: urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina; por ser las reacciones rutinarias en cualquier laboratorio clínico, empleando para ello métodos manuales y automatizados. Así mismo se elaborará una matriz de sustancias de interferencia siguiendo un modelo  $2^3$  para obtener ecuaciones matemáticas que nos permitan corregir los resultados de las diferentes determinaciones y así eliminar la interferencia que causó la hemoglobina, bilirrubina y/o glucosa para obtener un resultado más cercano al real.

## HIPÓTESIS

En la bibliografía se reporta que la glucosa, hemoglobina y la bilirrubina son importantes interferentes tanto positivos como negativos, en las determinaciones rutinarias del laboratorio clínico realizados con equipos automatizados, pero para métodos manuales esto es desconocido, considerando que los métodos automatizados tienen el mismo fundamento que los manuales, esperamos que los interferentes se comporten de la misma manera en ambas formas de análisis.

Considerando que las muestras sanguíneas recibidas en el laboratorio de Química Clínica no siempre se encuentran en condiciones aceptables mostrando la presencia de hemólisis, ictericia, lipemia, etc., debido a una gran variedad de factores, suponemos que es conveniente cuantificar esa interferencia y si es posible obtener ecuaciones de corrección que nos permitan eliminarlas por medio de cálculos matemáticos tanto en los métodos manuales como en procedimientos automatizados.

## OBJETIVOS

- Observar la variabilidad que presentan la determinación de urea, creatinina, colesterol, ácido úrico y albúmina al ser analizados de dos formas manual y automatizada.

- Observar cuanto puede cambiar el resultado final en una determinación de Química Clínica al contener diferentes concentraciones de hemoglobina, bilirrubina y glucosa, que actúan como interferentes ya sea en forma individual o utilizando distintas combinaciones de éstos.

- Determinar cuales son las concentraciones máximas y mínimas de bilirrubina, hemoglobina y glucosa que causan desviaciones en las determinaciones de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina.

- Obtener las ecuaciones de regresión que nos permitan corregir resultados analíticos y eliminar así mismo las interferencias causadas "in vivo" o "in vitro".



## MATERIAL Y METODOS

### Diseño de la investigación:

Se llevó a cabo un estudio experimental, prospectivo, transversal y comparativo conforme a la clasificación de Méndez<sup>51</sup> en un pool de suero humano de aproximadamente 300 mL libre de hemólisis, lipemia o ictericia.

### VARIABLES DEPENDIENTES.

Concentraciones de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina.

### VARIABLES INDEPENDIENTES.

Concentración de interferentes: bilirrubina, hemoglobina y glucosa.

### MATERIAL.

#### a) Biológico:

300 mL de una mezcla de sueros de individuos aparentemente sanos, con un ayuno mínimo de doce horas.

10 mL de eritrocitos lisados concentrados.

#### b) De vidrio y diversos.

Tubos Vacutainer de 13 x 100 mm. sin anticoagulante

Agujas estériles para tubo Vacutainer

Paquete de algodón de 250 g

Alcohol al 70 %

Matraz erlenmeyer de 250 mL

Matraz erlenmeyer de 100 mL

Aplicadores de madera

Pipetas graduadas de las siguientes medidas: 0.1 mL 0.2 mL, 1.0 mL, 2.0 mL, 5.0 mL y 10.0 mL

Pipetas Pasteur.

Mechero Fisher.

Frascos de color ámbar de 10 mL

Gradilla metálica para tubos de 13x 100 mm.  
Celdas para espectrofotómetro Spectrónico 20.  
Termómetro de menos 10 a 150 °C.  
Pipeta de Sahli de 0.02 mL

c) Equipo

Baño María a 37°C.  
Espectrofotómetro Spectronic 20.  
Centrífuga Clínica Solbat.  
Equipo automatizado sistema Sinchron CX7 Delta Beckman.  
Balanza analítica.  
Refrigerador con congelador.

**Reactivos utilizados en la metodología manual.**

1.-Urea Lakeside.

Método colorimétrico enzimático.  
Los reactivos están compuestos por:  
Amortiguador/ureasa. (Amortiguador de fosfato 50 mmol/L pH 6.5).  
Solución estándar (3.0 mg de urea/dL).  
Fenol (fenol 0.106 mol/L; nitroprusiato-Na 0.170mmol/L).  
Hipoclorito:(hipoclorito sódico 11 mmol/L ;hidróxido de sodio 0.125 N).

2.-Creatinina. Diagnostica Merck.

Método colorimétrico cinético.  
Los reactivos están compuestos por:  
Solución amortiguada (NaOH 313 mmol/L, fosfato 12.5 mmol/L).  
Solución de ácido pícrico: (ácido pícrico 8.73 mmol /L).  
Solución estándar: (1.0 mg de creatinina/dL).

3.-Ácido úrico. Bioxón.

Método colorimétrico, reacción de oxido-reducción.  
Los reactivos están compuestos por:  
Reactivo desproteinizante: (ácido tungstico estabilizado.)  
Carbonato de sodio (estable a temperatura ambiente.)  
Reactivo de color: (ácido fosfotungstico.)  
Solución estándar: 10 mg de ácido úrico /dL

4.- Colesterol: Ecoline- 50 Biotrol Merck.

Método colorimétrico enzimático.

Reactivo de color (amortiguador de fosfatos pH 6.5 100 mmol/L, fenol 16 mmol/L, 4-aminoantipirina 0.25 mmol/L, peroxidasa >1010 U/L >colesterol oxidasa > 71 U/L, colesterol esterasa >152U/L.  
Solución estándar :100 mg de colesterol /dL

5.-Albúmina: Diagnóstica Merck.

Método colorimétrico de punto final.

Reactivo de color (ácido láctico 806 mmol/L, verde de bromocresol 1.432mmol/L: hidróxido de sodio 5000 mmol/L "tween 20" 20 mmol/L.  
Solución estándar: (4.0 g de albúmina /dL)

6.- Bilirrubina total. Diagnóstica Merck.

Método colorimétrico de punto final.

Los reactivos están compuestos por.

Ácido sulfanílico: (29 mmol/L en HCl 170 mmol/L) .

Nitrito de sodio: (29 mmol/L).

Acelerador: (cafeína 130 mmol/L, benzoato de sodio 156 mmol/L y acetato de sodio 460 mmol/L).

Solución II de Fehling: ( tartrato de sodio y potasio 930 mmol/L; hidróxido de sodio 1.9 mol/L).

Calibrador para bilirrubina Baxter 20 mg/dL.

7.-Glucosa. Ecoline 250 -Biotrol.

Método colorimétrico enzimático.

Reactivo de color: ( amortiguador de fosfatos, pH. 7.3 100 mmol /L; fenol 16 mmol/L; 4 aminoantipirina 0.25mmol/L; glucosa oxidasa 20 U/L ;peroxidasa 1 U/L.

Solución estándar: (100 mg de glucosa/dL).

8.-Solución de Drabkin.Diagnóstica Merck.

Método colorimétrico de punto final.

El reactivo está compuesto por: ferricianuro de potasio 0.20 g; cianuro de potasio 0.05 g. Bicarbonato de sodio 1.0 g c.b.p. 1000 mL.

Solución estándar: (cianometahemoglobina de 20 g/dL).

9.-Sueros de control patológico y normal de Merck, para todas las determinaciones.

10.-Glucosa en polvo. Para preparar pool de sueros con diferentes concentraciones de glucosa.

11.-Estándar de bilirrubina pediátrico de 20 mg/dL BAXTER.

### **Reactivos utilizados en la metodología automatizada.**

1.-Urea Beckman.

Método cinético enzimático.

El reactivo esta compuesto por: (alfa-cetoglutarato 2.90 mmol/L: NADH 0.35 mmol/L: >ureasa>24 KIU/L: glutamato deshidrogenasa>1.3 KIU/L.) Además otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema.

2.- Creatinina. Beckman.

Método cinético de Jaffé modificado.

El reactivo esta compuesto por:(ácido pícrico 8.1 mmol/L; amortiguado a pH 13.3).Además ,otras sustancias no reactivas para el funcionamiento óptimo del sistema.

3.- Ácido úrico Beckman

Método de punto final periódico.

El reactivo esta compuesto por: (4 aminoantipirina 0.85 mmol/L, sulfonato de 3,5 dicloro-2-hidroxibenceno 3.40 mmol/L; uricasa 240 IU/L; peroxidasa de rábano 961 IU/L). Además, otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema.

4.-Colesterol.Beckman.

Método de punto final.

El reactivo está compuesto por: (4-aminoantipirina 0.28 mmol/L: fenol 7.80 mmol/L; colesterol esterasa 211mmol/L: colesterol oxidasa 1100 IU/L y peroxidasa 5000 IU/L). Además, otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema.

5.-Albúmina. Beckman.

Método de punto final periódico.

El reactivo está compuesto por: (púrpura de bromocresol 0.28 mmol /L. Además, otras sustancias no reactivas necesarias para el funcionamiento óptimo del sistema.

6.-Para todas las determinaciones realizadas por el método automatizado se utilizó:

Calibrador CX MULTI.

Solución salina 0.9 % P/V.

Sueros de Beckman patológicos y normales.

## MÉTODOS

Para el estudio se recolectaron aproximadamente 300 mL de suero libre de hemólisis, lipemia o ictericia, provenientes de sujetos humanos aparentemente sanos. Éste se envasó en viales de 5 mL en condiciones estériles y se conservó en congelación a  $-4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Posteriormente se cuantificó la concentración original de: glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol, albúmina, bilirrubina total y hemoglobina de la mezcla de sueros para tomar los valores como referencia y realizar la comparación de concentraciones en ausencia y presencia de los interferentes.

Para estudiar el efecto de hemólisis "*in vitro*" se preparó un hemolizado de la siguiente manera.

Se centrifugaron 6 mL de una muestra de sangre total tratada con EDTA al 10% P/V a 1500 r.p.m. por 5 minutos, posteriormente se desechó el plasma procurando no remover los elementos celulares. A continuación se mezcló el paquete eritrocitario con solución salina al 0.9% P/V por inversión, se centrifugó nuevamente a 1500 r.p.m. por 5 minutos y se repitió el procedimiento tres veces. En el último lavado se desechó el sobrenadante y al paquete eritrocitario se le adicionaron 3mL de agua agitando vigorosamente por una hora, posteriormente centrifugando a 4000 r.p.m. por 10 minutos; pasado este tiempo se obtiene un sobrenadante que contiene hemoglobina libre. Se cuantificó la concentración de hemoglobina libre del sobrenadante utilizando el método manual de Cianometahemoglobina.<sup>42</sup> A continuación se prepararon 7 diferentes concentraciones de hemoglobina utilizando como disolvente el combinado de sueros en varias alícuotas. Las concentraciones utilizadas fueron: 0.3, 0.7, 1.7, 2.5, 4.6, 6.9, y 9.2 g/L.

Para analizar el efecto de la glucosa en la determinación de los analitos estudiados se utilizó glucosa en polvo para preparar diferentes concentraciones: 70, 114, 208, 290 y 418 mg/dL. Y para analizar la interferencia de la bilirrubina se utilizó un estándar pediátrico de marca Baxter que contenía 20 mg/dL de bilirrubina a partir de este control se prepararon las siguientes concentraciones: 1.0, 3.0, 4.0, 8.5, 15.0 y 18.0 mg/dL.

Las concentraciones utilizadas de: bilirrubina, hemoglobina y glucosa fueron propuestas por Castillo y Fonseca.<sup>1</sup> Posteriormente se realizaron las determinaciones de: urea, creatinina, colesterol, ácido úrico y albúmina por triplicado a las alícuotas que contenían las diferentes concentraciones de los interferentes analizándolos en el equipo automatizado SYNCHRON CX y empleando técnicas manuales.

A continuación se realizaron combinaciones de los interferentes ocupando un diseño de  $2^3$  para lo cual se utilizaron las concentraciones en las que de forma individual mostraron el inicio de algún tipo de desviación lo cual se observó gráficamente. Las concentraciones empleadas fueron: para bilirrubina fue 4.3 mg/dL, hemoglobina 1.0 g/L y glucosa 290 mg/dL. Nuevamente se analizaron las muestras por triplicado para verificar algún cambio en la concentración de cada analito realizadas por técnicas manuales y en el equipo automatizado.

### Técnicas:

#### A) Procedimientos manuales.

##### 1) Urea.

Fundamento: La ureasa hidroliza la urea en amoníaco y anhídrido carbónico; el amoníaco liberado reacciona con fenol e hipoclorito para formar p-quinonacloramina; ésta con una segunda molécula de fenol produce un compuesto indofenólico de color azul, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de urea presente. La reacción se activa en presencia de nitroprusiato de sodio.

#### Procedimiento:

	Blanco	Estándar	Problema
	mL	mL	mL
Suspensión de Ureasa	0.20	0.20	0.20
Solución estándar	~	0.02	~
Suero	~	~	0.02

Mezclar, tapar y dejar en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adiciona:

	Blanco	Estándar	Problema
	mL	mL	mL
Reactivo de fenol	5	5	5
Reactivo de hipoclorito	5	5	5

Mezclar, dejar en reposo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Medir las extinciones de los problemas y el estándar frente al blanco a 620 nm.

Cálculos:

$$\text{Concentración de urea mg/dL} = \frac{\text{Abs. Problema}}{\text{Abs. estándar}} \times 30$$

2) Creatinina.

Fundamento: La creatinina forma en solución alcalina con ácido pícrico un compuesto de color naranja amarillento. La concentración del complejo colorido producido en un determinado tiempo de reacción corresponde a la concentración de creatinina.

Procedimiento.

Preparación de solución reactiva: se mezclan por partes iguales la solución amortiguadora y ácido pícrico. La solución es estable hasta dos semanas conservada a temperatura ambiente, entre 15 y 25°C.

	Problema mL	Estándar mL
Suero	0.20	~
Estándar	~	0.20
Solución Reactiva	1.00	1.00

Mezclar y después de un minuto medir la extinción del problema y el estándar. Exactamente 5 minutos después de la primera medición leer nuevamente el problema y el estándar a 500 nm.

Cálculos.

$$\text{Concentración de creatinina en mg/dL} = \frac{\text{Abs.}_2 \text{ Problema} - \text{Abs.}_1 \text{ Problema}}{\text{Abs.}_2 \text{ Estándar} - \text{Abs.}_1 \text{ Estándar}}$$



### 3) Ácido úrico.

Fundamento: En medio alcalino el ácido úrico reduce al reactivo fosfotúngstico, el cual es determinado fotométricamente a 700 nm.

#### Procedimiento.

Antes de llevar a cabo la reacción, se desproteíniza la muestra; para lo cual se realizaron los siguientes pasos:

	<b>VOLUMEN mL</b>
Agua destilada	4.00
Ácido túngstico estabilizado	0.50
Suero	0.50

Agitar vigorosamente y centrifugar durante 5 minutos a 2500 r.p.m.

	<b>Blanco</b>	<b>Problema</b>	<b>Estándar</b>
	<b>mL</b>	<b>mL</b>	<b>mL</b>
Suero Desproteínizado	~	2.50	~
Agua destilada	2.50	~	2.50
Estándar	~	~	0.05
Carbonato de Sodio	0.50	0.50	0.50
Mezclar, dejar en reposo 10 minutos, agregar			
Ácido Fosfotúngstico	0.50	0.50	0.50

Agitar y reposar 20 minutos. Determinar la absorción a 700 nm. Ajustar a cero con el blanco.

#### Cálculos.

Concentración de ácido úrico en mg/dL =  $\frac{\text{Abs. Problema} \times 10}{\text{Abs. Estándar}}$

#### 4) Colesterol.

Fundamento: El colesterol y sus ésteres son separados de las lipoproteínas por detergentes. Los ésteres son hidrolizados por colesterol esterasa. El colesterol producido junto con el colesterol libre, son oxidados por medio de colesterol oxidasa, formando peróxido de hidrógeno.

Este último reacciona con 4-aminoantipirina coloreada, cuya concentración y absorción a 500 nm, es directamente proporcional a la concentración de colesterol en la muestra.

Procedimiento.

	<b>Estándar</b>	<b>Problema</b>
	<b>mL</b>	<b>mL</b>
Suero	~	0.01
Estándar	0.01	~
Solución Reactiva	1.00	1.00

Nota: la solución reactiva se prepara mezclando el contenido del frasco 1 (mezcla de reactivos) dentro del vial 2 (solución amortiguadora.)

Mezclar bien. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Medir las absorciones de la muestra y el estándar a 500 nm frente al blanco de reactivo.

Cálculos

$$\text{Concentración del colesterol en mg/dL} = \frac{\text{Abs. Problema}}{\text{Abs. Estándar}} \times 100$$

#### 5) Albúmina.

Fundamento: Cuando la albúmina se encuentra en un medio amortiguado a un pH adecuado puede unirse por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals al verde de bromocresol, formando un complejo colorido cuya intensidad es proporcional a la concentración de albúmina presente en la muestra.

Procedimiento.

	Blanco	Estándar	Problema
	mL	mL	mL
Suero	~	~	0.02
Estándar	~	0.02	~
Verde de Bromocresol	5.00	5.00	5.00

Mezclar suavemente y dejar en reposo a temperatura ambiente 15 minutos. Medir la extinción del problema y el estándar contra el blanco a 620 nm.

Cálculo.

Concentración de albúmina en g/dL =  $\frac{\text{Abs. Problema}}{\text{Abs. Estándar}} \times 4$

Control de calidad:

Para cada técnica antes mencionada introducir una muestra de suero control normal y patológico cada vez que se efectúe una corrida con el fin de comprobar que las variaciones en los resultados de las muestras sean debidas a las sustancias interferentes y no de errores técnicos o analíticos.

## B) Procedimientos automatizados.

### 6) Urea

Fundamento: La urea se determina mediante un método cinético enzimático. En la reacción, la ureasa hidroliza la urea a amoníaco y dióxido de carbono. La glutamato deshidrogenasa (GLDH) cataliza la condensación del amoníaco y el alfa-ceto glutarato a glutamato, con la oxidación concomitante de beta-dinucleótido de adenina nicotinamina reducida (NADH) a beta-dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD).

Procedimiento

El sistema SYNCHRON dispensa automáticamente los volúmenes apropiados de muestra y reactivo en la cubeta. La proporción usada es una parte de muestra a 100 partes de reactivo. El sistema controla el

proporcional a la concentración de urea en la muestra y es usado por el sistema SYNCHRON CX para calcular la concentración de urea.

## 7) Creatinina

Fundamento: El reactivo se usa para medir la concentración de creatinina mediante el método cinético de Jaffé modificado en la reacción, la creatinina se combina con picrato en una solución alcalina para formar un complejo creatinina-picrato.

Procedimiento.

El sistema SYNCHRON CX dispensa automáticamente los volúmenes apropiados de muestras y reactivo en la cubeta. La proporción usada es una parte de muestra a 11 partes de reactivo (para suero.) El sistema controla el cambio de absorción a 520 nm. Este cambio es directamente proporcional a la concentración de la creatinina en la muestra y es usado por el sistema SYNCHRON CX para calcular y expresar la concentración de creatinina.

## 8) Ácido úrico.

Fundamento: El reactivo ácido úrico se usa para medir la concentración de ácido úrico mediante un método de punto final periódico, el ácido úrico es oxidado por la uricasa para producir alantoina y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminoantipirina (4AAP) y el sulfonato de 3,5-dicloro-2-hidroxibenceno (DCHBS), reacción catalizada por peroxidasa para producir un producto coloreado.

Procedimiento.

El sistema SYNCHRON CX dispensa automáticamente los volúmenes apropiados de muestra y reactivos en una cubeta. La proporción usada es una parte de muestra a 25 partes de reactivo. El sistema controla el cambio de absorción a 520 nm. Este cambio es directamente proporcional a la concentración de ácido úrico.

## 9) Colesterol.

Fundamento: El reactivo colesterol se usa para medir la concentración de colesterol mediante un método de punto final. En la reacción la colesterol esterasa (CE) hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre se oxida a colestén-3-ona y peróxido de hidrógeno mediante la colesterol oxidasa (CO). La peroxidasa cataliza

reacción de peróxido de hidrógeno con 4-amino antipirina (4AAP) y fenol para producir un producto coloreado, la quinoneimina.

*Procedimiento.*

El sistema SINCHRON CX dispensa automáticamente los volúmenes apropiados de muestra y reactivo en la cubeta. La proporción usada es una parte de muestra a 100 partes de reactivo. El sistema controla el cambio de absorción a 520 nm. Este cambio es directamente proporcional a la actividad de colesterol en la muestra y es usado por el sistema SYNCHRON CX para calcular y expresar la concentración de colesterol.

#### 10) Albúmina

**Fundamento:** El reactivo de púrpura de bromocresol se usa para medir la concentración de albúmina mediante un método de punto final periódico. En la reacción, la albúmina se combina con púrpura de bromocresol (PBC) para formar un producto coloreado.

*Procedimiento.*

El sistema SYNCHRON CX dispensa automáticamente los volúmenes adecuados de muestra y reactivo en la cubeta. La proporción usada es una parte de muestra por 100 partes de reactivo. El sistema controla el cambio de absorción a 600 nm. Este cambio es directamente proporcional a la concentración de albúmina en la muestra y es usado por el sistema SYNCHRON CX para calcular y expresar la concentración de albúmina.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se obtuvieron las estadísticas descriptivas de todas las variables calculando las medias y desviaciones estándar.

Se realizaron gráficas de analitos contra interferente para ambos métodos y así observar el comportamiento y la tendencia de los datos.

Para determinar el efecto de la combinación de los interferentes se calculó la t-Student entre el resultado basal y el obtenido con los interferentes.

También se calculó el análisis de regresión lineal con un interferente para mostrar la interferencia causada por la bilirrubina, hemoglobina y glucosa; partiendo de esto se obtuvieron las ecuaciones de la regresión para predecir la concentración del analito sin el interferente

## RESULTADOS

La primer tabla muestra los valores de las medias y la desviación estándar de cada uno de los analitos de la muestra basal sin interferentes por procedimientos manuales y automatizados.

PROCEDIMIENTO	UREA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)	ACIDO URICO (mg/dL)	COLESTEROL (mg/dL)	ALBUMINA (g/dL)
Manual	26.00 ± 1.1	0.80 ± 0.11	6.10 ± 0.35	193.00 ± 5.2	4.90 ± 0.15
Automatizado	28.00 ± 1.0	0.90 ± 0.11	6.10 ± 0.05	176.00 ± 1.1	4.20 ± 0.05

**Tabla 1. Concentraciones basales del pool de sueros.**

En la Tabla 2 se observa como la bilirrubina afecta a diferentes concentraciones a los analitos, para urea produce desviación en 3.0 mg/dL aproximadamente, en creatinina a partir de 4.0 mg/dL y para colesterol y ácido úrico en 1.0 mg/dL en los procedimientos manuales.

BILIRRUBINA mg/dL	UREA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)	ACIDO URICO (mg/dL)	COLESTEROL (mg/dL)	ALBUMINA (g/dL)
1.00	26.00 ± 1.1	0.70 ± 0.11	6.10 ± 0.20	176.00 ± 0.0	4.90 ± 0.05
3.00	26.00 ± 1.1	0.70 ± 0.10	7.00 ± 0.23	172.00 ± 0.0	4.90 ± 0.05
4.00	24.00 ± 1.1	0.70 ± 0.005	7.40 ± 0.17	171.00 ± 0.0	5.00 ± 0.11
8.50	23.00 ± 0.0	0.66 ± 0.11	7.40 ± 0.10	155.00 ± 5.7	5.10 ± 0.11
15.00	21.00 ± 1.1	0.60 ± 0.11	7.40 ± 0.34	151.00 ± 1.1	5.10 ± 0.10
18.00	20.00 ± 1.0	0.58 ± 0.11	7.40 ± 0.26	147.00 ± 2.8	5.10 ± 0.10

**Tabla 2. Media y desviación estándar de concentraciones de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina determinados por procedimientos manuales de un pool de sueros con diferentes concentraciones de bilirrubina.**

La hemoglobina con una concentración de 4.6 g/L interfiere negativamente con creatinina, con ácido úrico y colesterol a una concentración de 0.7 mg/dL realizadas con métodos manuales. (Tabla 3)

HEMOGLOBINA g/L	UREA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)	ACIDO URICO (mg/dL)	COLESTEROL (mg/dL)	ALBUMINA (g/dL)
0.30	28.00 ± 1.70	0.60 ± 0.09	6.00 ± 0.36	193.00 ± 5.7	5.00 ± 0.23
0.70	27.00 ± 0.57	0.60 ± 0.05	6.00 ± 0.25	193.00 ± 5.0	4.90 ± 0.05
1.70	27.00 ± 0.00	0.60 ± 0.00	6.30 ± 0.11	191.00 ± 7.6	4.90 ± 0.05
2.50	27.40 ± 1.27	0.60 ± 0.02	6.50 ± 0.11	191.00 ± 5.1	5.00 ± 0.05
4.60	27.00 ± 0.57	0.60 ± 0.00	6.50 ± 0.05	190.00 ± 3.0	4.80 ± 0.10
6.90	27.00 ± 0.46	0.50 ± 0.05	6.60 ± 0.05	186.00 ± 2.8	4.90 ± 0.10
9.20	27.30 ± 1.45	0.40 ± 0.05	6.60 ± 0.28	178.00 ± 2.8	5.00 ± 0.20

**Tabla 3. Media y desviación estándar de concentraciones de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina determinados por procedimientos manuales de un pool de sueros con diferentes concentraciones de hemoglobina.**

En las determinaciones automatizadas los analitos afectados por bilirrubina a una concentración de 3.5 mg/dL aproximadamente fueron creatinina, ácido úrico y colesterol. (Tabla 4)

BILIRRUBINA mg/dL	UREA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)	ACIDO URICO (mg/dL)	COLESTEROL (mg/dL)	ALBUMINA (g/dL)
1.00	28.00 ± 0.57	1.00 ± 0.00	6.10 ± 0.05	173.00 ± 1.10	4.20 ± 0.23
3.00	29.00 ± 0.57	1.00 ± 0.05	6.10 ± 0.05	173.00 ± 0.57	4.30 ± 0.05
4.00	29.00 ± 1.10	0.80 ± 0.05	6.10 ± 0.20	171.00 ± 3.00	4.30 ± 0.11
8.50	29.00 ± 0.57	0.80 ± 0.00	5.60 ± 0.10	162.00 ± 1.10	4.30 ± 0.05
15.00	28.00 ± 0.00	0.70 ± 0.00	5.60 ± 0.00	162.00 ± 2.00	4.30 ± 0.30
18.00	28.00 ± 1.10	0.60 ± 0.05	5.60 ± 0.00	158.00 ± 1.00	4.30 ± 0.30

**Tabla 4. Media y desviación estándar de concentraciones de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina determinados por procedimientos automatizados de un pool de sueros con diferentes concentraciones de bilirrubina.**

Por hemoglobina únicamente ácido úrico y colesterol fueron afectados con una concentración del interferente de 1.0 g/L aproximadamente. (Tabla 5)

HEMOGLOBINA g/L	UREA (mg/dL)	CREATININA (mg/dL)	ACIDO URICO (mg/dL)	COLESTEROL (mg/dL)	ALBUMINA (g/dL)
0.30	26.00 ± 0.00	0.80 ± 0.00	6.00 ± 0.05	172.00 ± 1.50	4.30 ± 0.05
0.70	26.00 ± 1.10	0.80 ± 0.00	6.20 ± 0.05	171.00 ± 1.50	4.20 ± 0.05
1.70	26.00 ± 0.57	0.80 ± 0.05	6.50 ± 0.05	167.00 ± 0.57	4.20 ± 0.05
2.50	26.00 ± 0.00	0.80 ± 0.05	6.80 ± 0.10	163.00 ± 0.57	4.20 ± 0.05
4.60	26.00 ± 0.57	0.80 ± 0.00	6.90 ± 0.11	162.00 ± 1.70	4.20 ± 0.05
6.90	26.00 ± 0.57	0.80 ± 0.05	7.30 ± 0.10	158.00 ± 3.78	4.10 ± 0.05
9.20	26.00 ± 0.57	0.80 ± 0.05	7.90 ± 0.11	153.00 ± 2.30	4.10 ± 0.05

**Tabla 5. Media y desviación estándar de concentraciones de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina determinados por procedimientos automatizados de un pool de sueros con diferentes concentraciones de hemoglobina.**

Con la glucosa no se observaron cambios importantes en la concentración de los analitos en ambos procedimientos. (Tablas 6 y 7)

GLUCOSA mg/dL	UREA mg/dL	CREATININA mg/dL	ACIDO URICO mg/dL	COLESTEROL mg/dL	ALBUMINA g/dL
114.00	26.00 ± 0.0	0.80 ± 0.05	6.50 ± 0.11	189.00 ± 4.00	4.70 ± 0.10
208.00	26.00 ± 1.5	0.90 ± 0.10	6.40 ± 0.11	187.00 ± 2.50	4.90 ± 0.30
290.00	26.00 ± 2.0	1.00 ± 0.20	6.50 ± 0.00	187.00 ± 2.00	5.00 ± 0.15
418.00	26.00 ± 1.5	1.10 ± 0.32	6.40 ± 0.11	188.00 ± 2.50	4.80 ± 0.15

**Tabla 6. Media y desviación estándar de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina por procedimientos manuales de un pool de sueros con distintas concentraciones de glucosa.**



GLUCOSA mg/dL	UREA mg/dL	CREATININA mg/dL	ACIDO URICO mg/dL	COLESTEROL mg/dL	ALBUMINA g/dL
114.00	28.00 ± 0.0	0.90 ± 0.05	6.10 ± 0.00	176.00 ± 1.50	4.20 ± 0.00
208.00	28.00 ± 0.0	0.90 ± 0.04	6.10 ± 0.05	174.00 ± 0.57	4.20 ± 0.17
290.00	28.00 ± 1.1	1.00 ± 0.00	6.10 ± 0.05	175.00 ± 1.50	4.30 ± 0.10
418.00	28.00 ± 0.0	0.90 ± 0.05	6.20 ± 0.00	175.00 ± 0.57	4.20 ± 0.15

**Tabla 7. Media y desviación estándar de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina determinadas por procedimientos automatizados de un pool de sueros con distintas concentraciones de glucosa.**

Se realizaron gráficas comparativas para ambos procedimientos, con cada analito y para cada interferente. Las gráficas que se presentan son de los analitos que se vieron afectados por los interferentes.

En la gráfica 1 se puede observar como la bilirrubina en concentración de 3.0 mg/dL produce disminución de los valores de urea por el procedimiento manual.

La gráfica 2 nos permite observar que la bilirrubina a partir de una concentración de 3.0 mg/dL provoca una disminución de creatinina por ambos procedimientos, siendo más notorio en el automatizado.

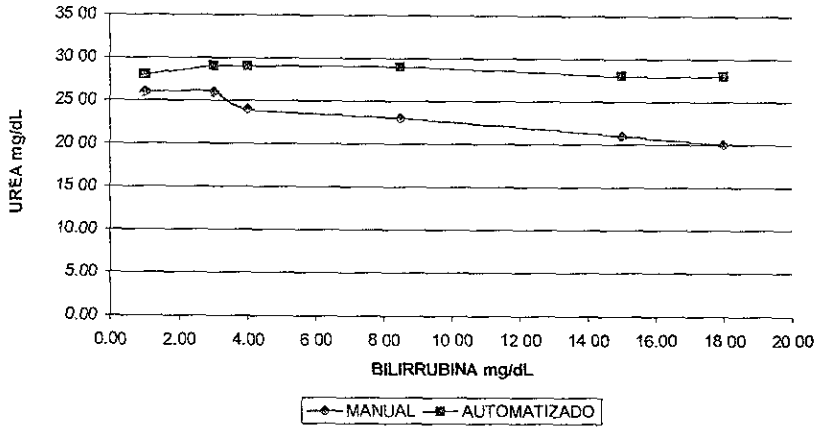
La gráfica 3 muestra como a una concentración de 1.0 mg/dL de bilirrubina por el procedimiento manual incrementa los valores de ácido úrico y por el automatizado los disminuye a partir de 4.0 mg/dL.

En la gráfica 4 se aprecia la importante interferencia negativa de la bilirrubina a partir de 3.0 mg/dL para los valores de colesterol por ambos procedimientos.

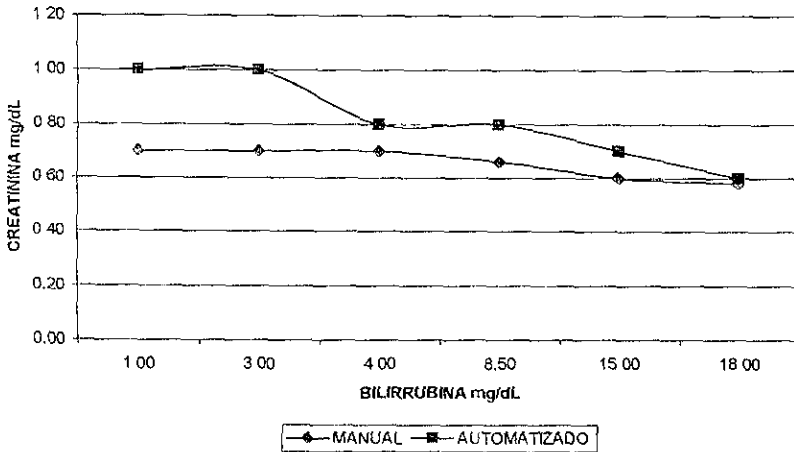
En la gráfica 5 se observa que la hemoglobina con una concentración de 4.6 g/L produce una caída en los valores de creatinina por el procedimiento manual y por el automatizado no se observa ningún cambio.

La hemoglobina interfiere positivamente con los valores de ácido úrico con una concentración de 1.7g/L por ambos procedimientos, pero más marcadamente con el automatizado. (Gráfica 6)

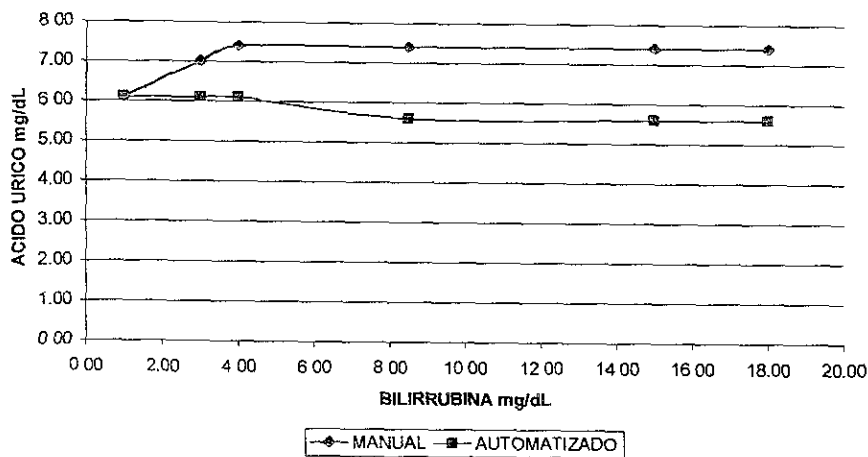
Para el colesterol, la hemoglobina interfiere ligeramente con desviación negativa, sobre todo en el procedimiento automatizado. (Gráfica 7)



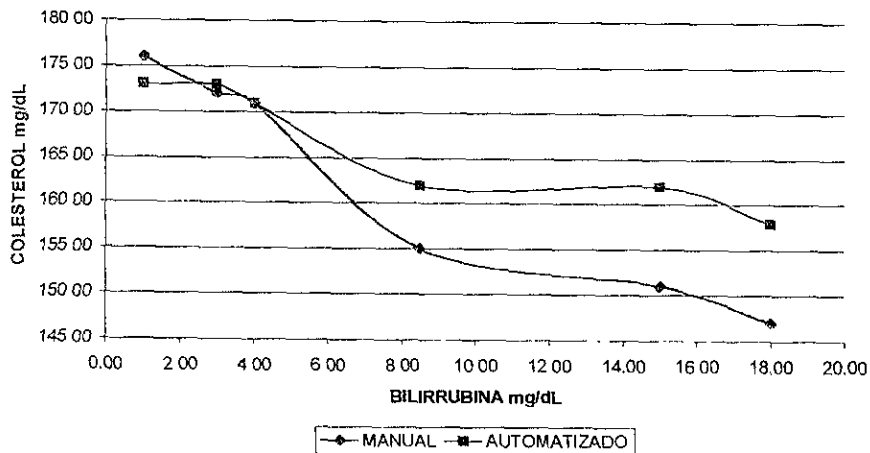
**Gráfica 1. Determinación de urea, interferente bilirrubina; procedimiento manual y automatizado.**



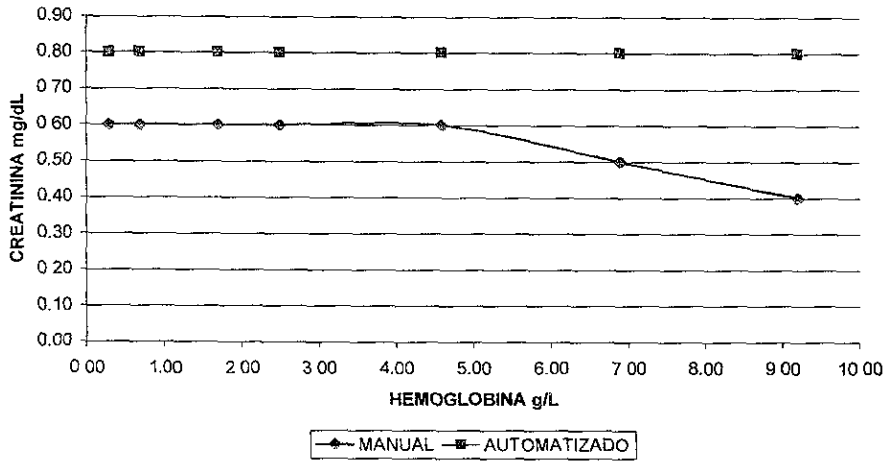
**Gráfica 2. Determinación de creatinina, interferente bilirrubina; procedimiento manual y automatizado.**



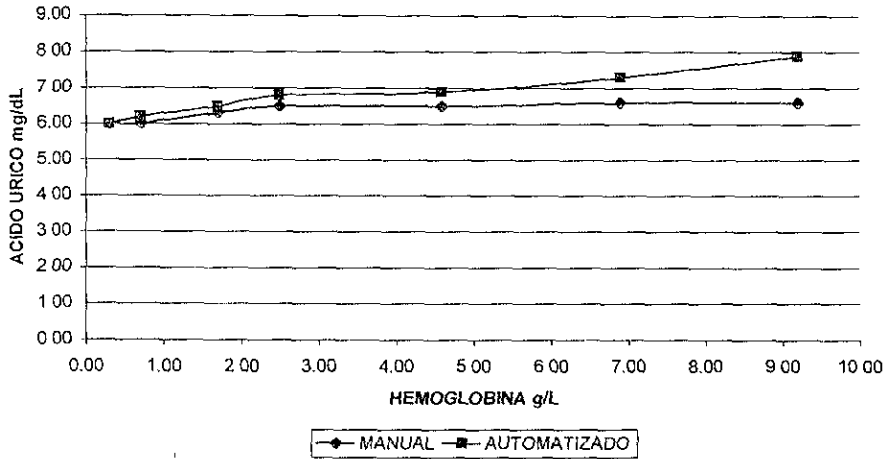
**Gráfica 3. Determinación de ácido úrico, interferente bilirrubina, procedimiento manual y automatizado.**



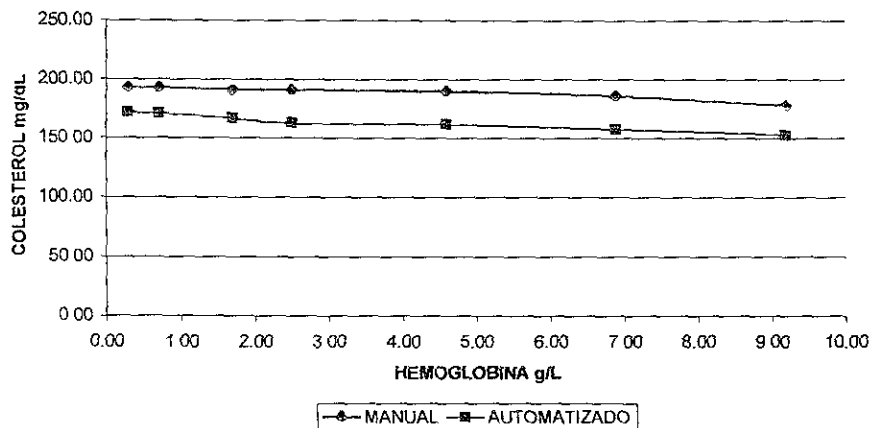
**Gráfica 4. Determinación de colesterol, interferente bilirrubina, procedimiento manual y automatizado.**



**Gráfica 5. Determinación de creatinina, interferente hemoglobina, procedimiento manual y automatizado.**



**Gráfica 6. Determinación de ácido úrico, interferente hemoglobina, procedimiento manual y automatizado.**



**Gráfica 7. Determinación de colesterol, interferente hemoglobina, procedimiento manual y automatizado**

De acuerdo a las gráficas se seleccionaron como concentraciones de interferencia 4.3 mg/dL de bilirrubina, 1.0 g/L de hemoglobina y 290 ng/dL de glucosa, con esas concentraciones se prepararon las mezclas de interferencia.

La combinación hemoglobina-bilirrubina produce interferencia negativa para la mayoría de los analitos probados por ambos procedimientos. (Tabla 8)

La combinación hemoglobina-glucosa provoca interferencia negativa para la mayoría de los analitos por los procedimientos manual y automatizado y solo positiva para urea por el manual. (Tabla 9)

mg/dL	BASAL MANUAL	MANUAL	BASAL AUTOMATIZADO	AUTOMATIZADO
UREA	26.00 ± 1.10	29.60 ± 1.10	28.00 ± 1.00	25.60 <sup>†</sup> ± 1.10
CREATININA	0.80 ± 0.11	0.26 <sup>†</sup> ± 0.10	0.90 ± 0.11	0.43 <sup>†</sup> ± 0.05
ACIDO URICO	6.10 ± 0.35	4.70 <sup>†</sup> ± 0.20	6.10 ± 0.05	5.46 <sup>†</sup> ± 0.00
COLESTEROL	193.00 ± 5.20	153.00 <sup>†</sup> ± 2.90	176.00 ± 1.10	161.00 <sup>†</sup> ± 2.00
ALBÚMINA	4.90 ± 0.15	4.40 <sup>†</sup> ± 0.05	4.20 ± 0.05	3.80 <sup>†</sup> ± 0.20

Interpretación: (\*) Interferencia positiva con una diferencia significativa de acuerdo a la prueba t-Student. ( p < 0.05 ) (†) Interferencia negativa con una diferencia significativa de acuerdo a la prueba t-Student ( p < 0.05 )

**Tabla 8. Comparación manual y automatizada de 5 analitos en un pool de sueros con una combinación de dos sustancias interferentes, hemoglobina (1.0 g/L) y bilirrubina (4.3 mg/dL).**

mg/dL	BASAL MANUAL	MANUAL	BASAL AUTOMATIZADO	AUTOMATIZADO
UREA	26.00 ± 1.10	33.00 ± 0.00	28.00 ± 1.00	27.33 ± 0.10
CREATININA	0.80 ± 0.11	0.60 <sup>†</sup> ± 0.10	0.90 ± 0.11	0.76 ± 0.30
ACIDO URICO	6.10 ± 0.35	5.10 <sup>†</sup> ± 0.10	6.10 ± 0.05	5.80 <sup>†</sup> ± 0.00
COLESTEROL	193.00 ± 5.20	153.00 <sup>†</sup> ± 2.00	176.00 ± 1.10	158.30 <sup>†</sup> ± 0.00
ALBÚMINA	4.90 ± 0.15	4.40 <sup>†</sup> ± 0.10	4.20 ± 0.05	3.76 <sup>†</sup> ± 0.00

Interpretación: (\*) Interferencia positiva con una diferencia significativa de acuerdo a la prueba t-Student ( p < 0.05 ) (†) Interferencia negativa con una diferencia significativa de acuerdo a la prueba t-Student ( p < 0.05 )

**Tabla 9. Comparación manual y automatizada de 5 analitos en un pool de sueros con una combinación de dos sustancias interferentes, hemoglobina (1.0 g/L) y glucosa (290 mg/dL).**

Con respecto a la combinación glucosa bilirrubina se puede apreciar que hay interferencia únicamente en creatinina y colesterol por ambos procedimientos. (Tabla 10)

La presencia de los tres interferentes produce interferencia en todos los analitos, principalmente negativa, tanto para procedimientos manuales como automatizados. (Tabla 11)

De aquí que las interferencias se encuentran resumidas en la tabla 12 para los procedimientos manuales y automatizados.

Al calcular la regresión lineal a los analitos que fueron afectados por un solo interferente se obtuvieron los modelos matemáticos para ambos procedimientos. (Tablas 13 y 14)

mg/dL	BASAL MANUAL	MANUAL	BASAL AUTOMATIZADO	AUTOMATIZADO
UREA	26.00 ± 1.10	28.00 ± 1.10	28.00 ± 1.00	26.60 ± 0.00
CREATININA	0.80 ± 0.11	0.60 <sup>†</sup> ± 0.05	0.90 ± 0.11	0.76 <sup>†</sup> ± 1.10
ACIDO URICO	6.10 ± 0.35	6.00 ± 1.00	6.10 ± 0.05	6.00 ± 0.00
COLESTEROL	193.00 ± 5.20	169.00 <sup>†</sup> ± 1.00	176.00 ± 1.10	189.60 <sup>*</sup> ± 2.00
ALBÚMINA	4.90 ± 0.15	4.80 ± 0.00	4.20 ± 0.05	4.10 ± 0.00

Interpretación. (\*) Interferencia positiva con una diferencia significativa de acuerdo a la prueba t-Student ( p < 0.05 ) (†) Interferencia negativa con una diferencia significativa de acuerdo a la prueba t-Student. ( p < 0.05 )

**Tabla 10. Comparación manual y automatizada de 5 analitos en un pool de sueros con una combinación de dos sustancias interferentes, glucosa (290 mg/dL) y bilirrubina (4.3 mg/dL).**



mg/dL	BASAL MANUAL	MANUAL	BASAL AUTOMATIZADO	AUTOMATIZADO
UREA	26.00 ± 1.10	31.30 ± 1.00	28.00 ± 1.00	25.60 ± 1.10
CREATININA	0.80 ± 0.11	0.26 <sup>†</sup> ± 0.05	0.90 ± 0.11	0.36 <sup>†</sup> ± 1.20
ACIDO URICO	6.10 ± 0.35	4.50 <sup>†</sup> ± 1.10	6.10 ± 0.05	5.50 <sup>†</sup> ± 0.05
COLESTEROL	193.00 ± 5.20	160.30 <sup>†</sup> ± 2.00	176.00 ± 1.10	157.00 <sup>†</sup> ± 3.00
ALBÚMINA	4.90 ± 0.15	4.53 <sup>†</sup> ± 0.05	4.20 ± 0.05	3.76 <sup>†</sup> ± 0.00

Interpretación. (\*) Interferencia positiva con una diferencia significativa de acuerdo a la prueba t-Student. (p < 0.05) (†) Interferencia negativa con una diferencia significativa de acuerdo a la prueba t-Student (p < 0.05)

**Tabla 11. Comparación manual y automatizado de cinco analitos en un pool de sueros con una combinación de tres sustancias interferentes, glucosa (290 mg/dL), bilirrubina (4.3 mg/dL) y hemoglobina (1.0 g/L).**

MANUAL	BILIRRUBIN	HEMOGLOB	GLUCOSA	HEMOGLOB BILIRRUBIN	HEMOGLOB GLUCOSA	GLUCOSA BILIRRUBIN	HEMOGLOB BILIRRUBIN GLUCOSA
UREA	↓	~	~	↑	↑	~	↑
CREATININA	↓	↓	~	↓	↓	↓	↓
ACIDO URICO	↑	↑	↑	↓	↓	~	↓
COLESTEROL	↓	↓	~	↓	↓	↓	↓
ALBUMINA	~	~	~	↓	↓	~	↓

AUTOMATIZA DO	BILIRRUBIN	HEMOGLOB	GLUCOSA	HEMOGLOB BILIRRUBIN	HEMOGLOB GLUCOSA	GLUCOSA BILIRRUBIN	HEMOGLOB BILIRRUBIN GLUCOSA
UREA	~	~	~	↓	~	~	↓
CREATININA	↓	~	~	↓	~	↓	↓
ACIDO URICO	↓	↑	~	↓	↓	~	↓
COLESTEROL	↓	↓	~	↓	↓	↑	↓
ALBUMINA	~	~	~	↓	↓	~	↓

HEMOGLOB = Hemoglobina, BILIRRUBIN = Bilirrubina, ↓ = Disminución, ~ = Sin cambio  
↑ = Incremento.

**Tabla 12. Comparación del efecto de los interferentes en los procedimientos manual y automatizado en las determinaciones de: urea, creatinina, ácido úrico, colesterol, y albúmina.**

ANALITO	INTERFERENTE	MODELO	COEFICIENTE DE CORRELACION
Urea	Bilirrubina	$Y = 26.252 - 0.3540X$	-0.976
Creatinina	Bilirrubina	$Y = 0.720 - 0.0077X$	-0.998
	Hemoglobina	$Y = 0.635 - 0.0210X$	-0.898
	Glucosa	$Y = 0.693 + 0.0010X$	0.995
Ác. Úrico	Hemoglobina	$Y = 6.111 + 0.0660X$	0.844
Colesterol	Bilirrubina	$Y = 176.315 - 1.7350X$	-0.965
	Hemoglobina	$Y = 194.420 - 0.5040X$	-0.944

**La Tabla 13. Modelos matemáticos y coeficientes de correlación para los analitos afectados por los interferentes bilirrubina, hemoglobina y glucosa por procedimientos manuales.**

ANALITO	INTERFERENTE	MODELO	COEFICIENTE DE CORRELACION
Creatinina	Bilirrubina	$Y = 0.991 - 0.021X$	-0.864
Ac. Úrico	Bilirrubina	$Y = 6.139 - 0.035X$	-0.885
	Hemoglobina	$Y = 6.093 + 0.191X$	0.980
Colesterol	Bilirrubina	$Y = 173.916 - 0.899X$	-0.942
	Hemoglobina	$Y = 171.108 - 1.998X$	-0.974

**Tabla 14. Modelos matemáticos y coeficientes de correlación para los analitos afectados por los interferentes bilirrubina, hemoglobina y glucosa por procedimientos automatizados.**

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Los interferentes son de importancia sustancial en el laboratorio clínico por el efecto que tienen en los resultados de los analitos, tales efectos pueden ser " *in vivo* " o " *in vitro* " siendo necesario conocer, identificar y resolver el problema de la interferencia, que varía ampliamente de método a método. Actualmente se han introducido nuevos métodos enzimáticos, cinéticos, ecuaciones matemáticas o diversos pasos en las técnicas para evitar la formación de complejos no específicos que se forman en algunas reacciones, sin embargo en la práctica clínica aún no se han logrado eliminar completamente.

Se pudo observar una diferencia del alrededor del 10% en la concentración basal de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina del *pool* de sueros por ambos procedimientos, debido a las diferentes condiciones de trabajo de cada método y reactivos (Tabla 1).

Las concentraciones de los interferentes a la cual empezaron a influir en las determinaciones fueron cercanas a 4.3 mg/dL para bilirrubina, 1.0 g/L para hemoglobina y 290 mg/dL para glucosa, aproximadamente obtenidos gráficamente; sin embargo cabe mencionar que la glucosa no mostró desviación alguna en la mayoría de las determinaciones en ambos procedimientos, por lo que se escogió el valor de 290 mg/dL para conformar las combinaciones de interferentes por considerarse un valor elevado promedio de las concentraciones anormales que se propusieron. En la literatura se reportan diferentes concentraciones de interferentes, por ejemplo para la bilirrubina se indica que la produce a partir de 0.5 a 2.9 mg/dL en la determinación de creatinina que utiliza la reacción de Jaffé punto final así como en algunos procedimientos enzimáticos detectando considerables diferencias de creatinina realizadas en diversos equipos automatizados<sup>42</sup> Otros autores reportan que concentraciones de bilirrubina mayores de 5.8 mg/dL son los que interfieren en la determinación de creatinina disminuyendo la concentración al ser analizada en el HITACHI 737.<sup>43,44</sup> Así también, en la determinación de ácido úrico, concentraciones mayores de 8.5 mg/dL de bilirrubina producen interferencia utilizando el reactivo de ácido fosfotúngstico.<sup>45</sup>

Por otro lado, se menciona que en la determinación de colesterol, la bilirrubina parece ser significativa sólo en concentraciones superiores a 5.0 mg/dL, nivel en el que parece disminuyen los niveles de colesterol del 5 al 15%.<sup>46</sup>

En este trabajo se observó que la presencia de bilirrubina en la determinación de urea interfiere en el procedimiento manual pero no en el automatizado. El método manual utilizado fue colorimétrico enzimático con base en la reacción de Berthelot, en el cual los resultados mostraron desviarse negativamente. Se puede observar también que la desviación negativa de la urea es proporcional al aumento de la concentración de bilirrubina, lo que hace pensar en una posible interferencia química que enmascara a la urea. Esto es un tanto controversial, ya que Giorgio ha reportado que la bilirrubina no causa interferencia significativa en esta prueba.<sup>32</sup>

Para creatinina, la interferencia de la bilirrubina causó desviación negativa como lo muestra la grafica 2, empleando reacciones cinéticas en ambos procedimientos. Esta desviación se creé que surge de la habilidad que tiene la bilirrubina para reaccionar con los reactivos. Walkin<sup>26</sup> demostró que una base fuerte oxida la bilirrubina a un cromógeno no identificado acompañado de un decremento en la absorción en la región de 400 a 500 nm y por consecuencia, la disminución en la concentración de creatinina.<sup>14, 47</sup>

Para la determinación de ácido úrico, la bilirrubina causó desviación positiva determinada manualmente, y negativa analizada en el equipo automatizado como se muestra en la grafica 3. Para éste último procedimiento se empleó el método enzimático directo de uricasa-peroxidasa, aquí la bilirrubina pudo interferir químicamente en la reacción acoplada de peróxido de hidrógeno y la peroxidasa en la reacción de oxidación o también alterando la reacción por la destrucción de la bilirrubina en una reacción intermedia ocasionando que el ácido úrico no se cuantifique completamente obteniendo valores disminuidos.<sup>11, 48, 49</sup> Para la determinación manual se utilizó reactivo de ácido fosfotúngstico, y aunque las concentraciones basales son semejantes en ambos procedimientos ( Tabla 1 ), al ir aumentando las concentraciones de bilirrubina los valores de ácido úrico comenzaron a desviarse positivamente.

Los investigadores Feitchmeir y Wrenn proponen que existe una correlación muy pobre entre los resultados obtenidos con el método de fosfotungstato alcalino y los que se logran con las técnicas espectrofotométricas diferenciales con uricasa, de esta manera el método de carbonato fosfotungstato da habitualmente resultados más altos que la técnica de uricasa, además, la bilirrubina causa interferencia positiva en el método de fosfotungstato alcalino a concentraciones de bilirrubina mayores a 8.5 mg/dL, sin embargo en la determinación de ácido úrico en este trabajo, la interferencia fue entre 3.0 y 4.0 mg/dL aproximadamente<sup>35</sup>.

En la determinación de colesterol se empleó el método colorimétrico enzimático en los dos procedimientos, observándose con la presencia de bilirrubina una desviación negativa en ambos, ( grafica 4 ). Se piensa que los métodos enzimáticos se ven menos sujetos a posibles interferencias, no obstante, no hay absoluta especificidad para el colesterol, porque la bilirrubina, así como cualquier otra sustancia reductora, puede interferir químicamente con la prueba consumiendo el peróxido de hidrógeno evitando que éste se cuantifique completamente, provocando una reducción falsa de los niveles de colesterol.<sup>11</sup>

En el caso de albúmina se utilizó reactivo verde de bromocresol en el procedimiento manual y púrpura de bromocresol en el automatizado, mostrando aparentemente que la bilirrubina no influyó en las determinaciones, sin embargo la t- Student indicó que si existe diferencia estadística en la determinación de albúmina con el método de púrpura de bromocresol, lo que concuerda con un reporte realizado por Bush y Reed<sup>41</sup> quienes indican que la bilirrubina afecta a la albúmina cuando se determina con este colorante sugiriendo que existe un metabolito no identificado o que tal vez la albúmina se modifica bloqueando el enlace con púrpura de bromocresol ocasionando disminución en la concentración del analito, a diferencia del colorante verde de bromocresol que mostró ser más específico en la determinación por no unirse a la albúmina en el mismo sitio que la bilirrubina.<sup>38</sup>

Para la hemoglobina se reporta que provoca interferencia a concentraciones mayores de 2.0 g/L, valor cercano al reportado en este trabajo, mostrando así que el grado de interferencia depende también de la metodología y de la instrumentación empleada. <sup>35</sup> Como la hemoglobina es fácilmente oxidable en medio básico fuerte, en la determinación de creatinina causa desviación negativa formando compuestos incoloros, descendiendo la absorción interpretándose como menos concentración de creatinina,<sup>10</sup> sin embargo esta determinación en el equipo automatizado no se ve afectada por hemoglobina, posiblemente porque el equipo tiene la capacidad de indicar si es necesario utilizar un blanco de muestra o directamente el equipo lleva a cabo la dilución correspondiente. (Gráfica 5)

Para la cuantificación de ácido úrico por el procedimiento manual, la hemoglobina causó desviación positiva (Gráfica 6), utilizando reactivo de ácido fosfotúngstico para la reacción. La interferencia causada en este analito tal vez no sea por la hemoglobina en sí, ya que se utilizó un filtrado libre de proteínas sino más bien otras sustancias reductoras presentes en el hemolisado, como son la ergotioneína, glutatión, glucosa y cisteína por mencionar algunas, dado que la mayoría de éstas se encuentran en el interior de los glóbulos rojos.<sup>35</sup> Además en el equipo automatizado también se originó desviación positiva utilizando reactivo enzimático con un

sistema cromógeno formado por peróxido de hidrógeno/peroxidasa/fenol y 4-amino antipirina a una longitud de onda de 520 nm, por lo que posiblemente la interferencia sea de tipo espectral puesto que la hemoglobina exhibe una absorción significativa en la banda de 500 a 600 nm del espectro visible, ocasionando aumento en la concentración de ácido úrico.<sup>10</sup>

Con respecto al colesterol, la hemoglobina causó desviación negativa en ambos métodos. En esta determinación se emplea el mismo sistema cromógeno que el utilizado en la determinación de ácido úrico con procedimiento automatizado, por lo que se esperaba el mismo tipo de reacción, pero ocurrió lo contrario. Se creó que esta desviación negativa es provocada por la descomposición prematura del peróxido de hidrógeno por la hemoglobina, evitando que el colesterol se cuantifique completamente. Con este interferente, las determinaciones de urea y albúmina no fueron afectadas en ninguno de los dos procedimientos.

Gráficamente y aplicando el análisis estadístico t-Student como en todas las determinaciones anteriores, se demostró que la glucosa como sustancia interferente no causó modificación en la mayoría de los metabolitos analizados tanto en el proceso manual como en el automatizado. Sin embargo, Cook y otros investigadores mencionan que la glucosa es considerada como una sustancia no proteica que en altas concentraciones (1000 mg/dL) afecta la medición de la creatinina significativamente, por reducir lentamente el picrato alcalino a picramato (interferente reductivo).<sup>14</sup> Por lo tanto, la causa de que en este trabajo la glucosa no haya provocado ningún efecto probablemente sea porque la concentración máxima de glucosa que se utilizó no es significativa para interferir; además en la determinación se empleó un método cinético con dos lecturas de absorción, eliminando las lecturas de los productos que se forman más tarde reduciendo así los interferentes.<sup>14</sup> El único analito que se vió ligeramente modificado fue el ácido úrico, tal vez porque este interferente tiene la propiedad de reducir al ácido fosfotúngstico provocando desviación positiva en los resultados, debido a la carencia de especificidad, aún cuando se utilizó filtrado libre de proteínas.<sup>34</sup>

En la mezcla de interferentes la combinación entre bilirrubina-glucosa (Tabla 10) fue la que presentó menos interferencia en: urea, ácido úrico y albúmina analizadas en forma manual y automatizada, afectándose únicamente creatinina y colesterol en ambos procedimientos. En esta combinación prácticamente fue la bilirrubina la que interfirió, porque en la determinación de creatinina en ambos procedimientos la concentración disminuye, semejante a los resultados obtenidos con bilirrubina como único interferente así también para colesterol realizado manualmente. Para el procedimiento automatizado en el colesterol se

observó un aumento significativo  $p < 0.05$  con respecto al basal probablemente por la capacidad que tiene la bilirrubina para absorber a 500 nm, lo que puede inducir a un incremento de los valores de colesterol.<sup>46</sup> Schlebusch menciona que la bilirrubina y la hemoglobina pueden causar desviación negativa la primera y desviación positiva la segunda en la misma determinación, así también puede esperarse que la magnitud de los efectos dependa de las concentraciones de cada interferente. Por otro lado se señala que dos o más interferentes parecen interactuar entre sí distorsionando aún más los resultados.<sup>54</sup>

En la combinación entre hemoglobina-bilirrubina y hemoglobina-bilirrubina-glucosa todos los analitos mostraron desviarse negativamente en ambos procedimientos, a excepción de la urea determinada por técnicas manuales, la cual mostró desviación positiva. Estas dos mezclas afectaron de forma semejante a los analitos, obteniendo así concentraciones parecidas lo que hace suponer que la glucosa no intervino en el sistema analítico. Los analitos principalmente afectados fueron creatinina, ácido úrico y colesterol, mostrando que la desviación en la creatinina se duplicó debido, tal vez, a que los dos interferentes causan tendencia negativa, así también para colesterol se aprecia interferencia química por la posible competencia entre los interferentes y los constituyentes de los reactivos semejante a la determinación de ácido úrico con la técnica de uricasa. Para el método de fosfotungstato la alteración probablemente se debe a que en el momento de realizar el filtrado desproteinizante el ácido úrico se recuperó incompletamente.

Como se puede apreciar es importante saber que, aunque hay métodos cinéticos o enzimáticos específicos para un determinado analito, la presencia de hemoglobina y/o bilirrubina afecta las determinaciones.

La Tabla 12 es una forma práctica en forma cualitativa que muestra las desviaciones que pueden presentarse en una determinación cuando en el suero a analizar presenta hemoglobina, bilirrubina o glucosa.

Para corregir las desviaciones causadas en los analitos afectados por bilirrubina, hemoglobina o glucosa se aplicó regresión lineal simple a los resultados lo que permitió proponer un modelo lineal para urea, creatinina, ácido úrico y colesterol cuyas determinaciones mostraron una relación lineal obteniendo coeficiente de correlación mayores de 0.84 para la mayoría de las determinaciones, considerándose aceptables de acuerdo al criterio de Saunders.<sup>51</sup>

La utilización de estos modelos consiste en sustituir el valor del interferente (  $x$  ) para obtener el valor real del analito (  $y$  ). Jay y Provasck<sup>10</sup> proponen que las fórmulas de corrección están limitadas para cada

analizador, métodos, reactivos y condiciones de laboratorio de donde se obtienen, pero dado el tipo de experimentos llevado a cabo en este trabajo, las ecuaciones pueden ser aplicables a los resultados obtenidos por los métodos aquí señalados.

Para las determinaciones con dos o tres interferentes no se obtuvieron ecuaciones de regresión lineal debido a que se analizó solamente una concentración de cada interferente obteniéndose únicamente un punto gráficamente. Sin embargo, a través de la t-Student se pudo apreciar que existe diferencia significativa en las concentraciones de los analitos con respecto a los valores basales.

Finalmente, comparando los valores obtenidos con lo reportado por algunos autores es posible notar que cuando se encuentran más de un interferente en el suero, el error en la determinación es mayor, debido a que estas sustancias pueden interaccionar entre sí o competir con el analito a determinar en alguna etapa de las reacciones que se llevan a cabo o también reaccionar con algún constituyente del reactivo provocando interferencia química. Así también, se demostró que para un determinado método, la interferencia para cada analito está en función del interferente provocando desviación positiva, negativa o no causándola.



## CONCLUSIONES

La bilirrubina afecta la determinación de urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y albúmina, cuando se encuentra como interferente, provocando una interferencia positiva con ácido úrico y negativa con urea, creatinina y colesterol para procedimientos manuales. Para los automatizados produce interferencia positiva con albúmina y negativa con creatinina, ácido úrico y colesterol.

La hemoglobina es causante principal de interferencia cuando se encuentra con glucosa y/o bilirrubina para todos los analitos probados tanto para procedimientos manuales como automatizados.

Los analitos determinados en el equipo automatizado mostraron menor cambio en la concentración que los determinados por técnicas manuales.

Fue posible calcular ecuaciones matemáticas para ajustar los valores de los analitos cuando se encuentran en las muestras de los pacientes alguno de los interferentes trabajados tales como: bilirrubina, hemoglobina o glucosa, excepto para la combinación de interferentes los cuales requieren otro modelo matemático que se adapte a su comportamiento químico.

## RECOMENDACIONES

Obtener las ecuaciones lineales múltiples para corregir el efecto de la combinación de los interferentes.

## BIBLIOGRAFIA

1. Castillo de Sánchez ML, Fonseca-Yerena ME. Mejoría continua de la calidad. Guía para los laboratorios clínicos de América Latina. México: Editorial Panamericana; 1995. p. 27-28.
2. Koepke AJ. Análisis de laboratorio clínico para diagnósticos, México: Editorial Limusa; 1983. p. 9-11.
3. Valderrama EL. Evaluación del primer plasma control mexicano de química clínica. México: Facultad de Química UNAM; 1987. p. 1-5
4. Henry BJ. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9ª ed. España: Editorial Salvat; 1993. p. 69-81.
5. Alper C. Obtención de las muestras y su conservación. En: Henry JH, Cannon CD, Winkelman WJ. Química clínica. Principios y técnicas. España: Editorial JIMS; 1980. p. 367-382.
6. Openheim AI. Manual para técnicos de laboratorio. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1988. p. 148-155.
7. Pickard AN. Recolección y manipuleo de las muestras del paciente. En: Kaplan AL, Pesce JA. Química clínica, técnicas de laboratorio fisiopatología, métodos de análisis, teoría, análisis y correlación. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1988. p. 50-55.
8. Yusel D, Dalva K. Effect of in vitro hemolysis on 25 common biochemical tests. Clin Chem 1992; 38: 575-577.
9. Kaplan AL, Pesce JA. Interferencias en el análisis espectral. En: Kaplan AL, Pesce JA. Química clínica, técnicas de laboratorio, fisiopatología, métodos de análisis, teoría, análisis y correlación. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1988. p. 1163-1176.
10. Glick RM, Ryder WK. Double trouble: hemolysis and stabilized hemoglobins (so, you, think, you seeing red now ?) Clin Chem 1993; 39: 1761-1763.
11. Kroll HM, Ellin JR. Interference with clinical laboratory analyses. Clin Chem 1994; 40: 1996-2005.
12. Hortin LG, Goolsby K. Lipemia interference with a rate-blanked creatinina method. Clin Chem 1997;43:408-410.
13. Nickard N. Interferencias in vivo. En: Kaplan AL, Pesce JA. Química clínica, técnicas de laboratorio, fisiopatología, métodos de análisis, teoría, análisis y correlación. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1988. p. 1173-1175.

14. Bowers DL, Wong TE. Kinetic serum creatinina assays. II. A critical evaluation and review. *Clin Chem* 1980; 26: 555-561.
15. Ladenson HJ. Fuentes no analíticas de variación en los resultados de química clínica. En: Sonnenwirth CA, Jarett L. *Métodos y diagnósticos del laboratorio clínico*. 8ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1986. p. 135-164.
16. Siest G, Galteau MM, Schiele F, Henry J. Análisis clínicos y medicamentos. España: Editorial Doyma; 1987. p. 55-63.
17. Modenese A, Carobence A, Ferrera Carlo. Reference method for serum total cholesterol measurement: does substituting enzymatic step for Liebermann-Burchard reaction improve specificity? *Clin Chem* 1996;42:475-477.
18. Davis EJ. Automatización. En: Kaplan AL, Pesce JA. *Química clínica, técnicas de laboratorio, fisiopatología métodos de análisis, teoría, análisis y correlación*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1988. p. 303-307.
19. Bayer AJ. Análisis clínicos métodos e interpretación. España: Editorial Reverte; 1986. p. 506-508.
20. Beckman Sistemas Synchron CX. Creatinina. Copyright Beckman instruments, inc. 1995. p. 1-12.
21. Murray LR. Creatinina. En: Pesce JA, Kaplan AL. *Química clínica métodos de análisis*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1990. p. 1474-1481.
22. Ryder WK, Troundle SD, Bode AM, Cole ER. Effects of hemolysis, icterus and lipemia on automated immunoassays. *Clin Chem* 1991;37: 1134-1135.
23. Bowers DL. Kinetic serum creatinina assays I. The role of various factors in determining specificity. *Clin Chem* 1980;26:551-554.
24. Osselaer CJ, Lievens MM. More on interference of bilirubin in creatinina determination by Hitachi analyzers. *Clin Chem* 1991;37:1460-1461.
25. Brown DN, Sing CH, Neely EW, Koetitz ES. Determination of "true" serum creatinina by high-performance liquid chromatography combined with a continuous flow microanalyzer. *Clin Chem* 1977;23:1281-1283.
26. Soldin JS, Hill GJ. Micromethod for determination of creatinina in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *Clin Chem* 1978;24:747-750.
27. Haeckel R, Gadsden HR, Sherwin EJ, Spare DP. Assay of creatinina in serum, with use of Fuller's earth to remove interferents. *Clin Chem* 1981;27:179-183.
28. Gennaro CM, Abrigo C, Marengo E. Determination of creatinina in human serum. Statistical intercalibration of methods. *Analyst* 1995;120:47-50.

29. Davidsohn I, Henry BJ. Diagnóstico clínico por el laboratorio. Barcelona: Editorial Salvat; 1978. p. 604-612.
30. Kaplan AL. Urea. En: Pesce JA, Kaplan AL. Química clínica métodos de análisis. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1990. p. 40-45.
31. Lynch JM, Raphael SS, Mellor DL, Spare DP. Métodos de laboratorio. 2ª ed. México: Editorial Interamericana; 1977. p.118-120.
32. Giorgio DJ. Sustancias nitrogenadas no proteicas. En: Henry JH, Cannon CD, Winkelman WJ. Química clínica principios y técnicas. España: Editorial JIMS; 1980. p. 513-515.
33. Treseler MK. Laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico. México: Editorial El Manual Moderno; 1998. p. 37-40.
34. Schultz LA. Ácido úrico. En: Pesce JA, Kaplan AL. Química clínica métodos de análisis. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1990. p. 46-53.
35. Henry JH, Cannon CD, Winkelman WJ. Química clínica principios y técnicas. España: Editorial JIMS; 1980. p. 531-537.
36. Naito KH. Colesterol. En: Pesce JA, Kaplan AL. Química clínica métodos de análisis. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1990. p. 1164-1185.
37. Wybenga RD, Inkpen AJ. Lípidos. En: Henry JR, Cannon CD, Winkelman WJ. Química clínica. Principios y técnicas. Barcelona: Editorial JIMS; 1980. p. 1442-1454.
38. Cannon CD, Olitzky I, Inkpen AJ. Proteínas. En: Henry JH, Cannon CD, Winkelman WJ. Química clínica principios y técnicas. España: Editorial JIMS; 1980. p. 447-449.
39. Gendler MS. Albúmina. En: Pesce JA, Kaplan AL. Química clínica métodos de análisis. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1990. p. 1075-1083.
40. Reed GR, Trefil L. Bilirubin covalently bound to albumin does not interfere with measurement of hepatic enzymes by dry chemistry methods (Kodak Ektachem.) Clin Chem 1992; 38: 1164-1165.
41. Bush U, Reed GR. Bromocresol purple dye-binding methods underestimate albumin that is carrying covalently bound bilirubin. Clin Chem 1987; 33: 821-823.
42. Weber AJ, Zanten PA. Interferences in current methods for measurements of creatinina. Clin Chem 1991; 37: 695-700.
43. Guy MJ, Legg FE. Bilirubin interference in determinations of creatinina with the Hitachi 737 analyzer. Clin Chem 1990; 36: 1851-1852.
44. Sant VP, Kreutzer HJ. Artificial icteric plasmas: unreliable indicators for interference with creatinina assay on Beckman CX3. Clin Chem 1995; 41: 1773-1774.

45. Davidsohn I, Henry BJ. Diagnóstico clínico por el laboratorio. 6ª ed. España: Editorial Salvat; 1978. p. 535-538.
46. Henry BJ. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9ª ed. España: Editorial Salvat; 1994. p. 202-203.
47. Ihara H, Nakamura H, Yoshida M, Wu TW. Effect of bilirubin covalently attached to albumin on measurement of serum creatinine. *Clin Chem* 1992; 38: 321-322.
48. Beyne P, Letteron P, Herve C, Delacoux E. Bilirubin interference with determination of creatinina, lactate, phosphorus, and uric acid on Beckman Synchron CX7. *Clin Chem* 1996; 42: 988-989.
49. Aoki Y, Ihara H, Nakamura H, Aoki T, Yoshida M. Effects of serum bilirubin on determination of uric acid by the uricase-peroxidase coupled reaction. *Clin Chem* 1992; 38: 1350-1352.
50. Harrison PS, Levine J. Interference in coupled-enzyme assay of urea nitrogen by excess endogenous enzyme. *Clin Chem* 1993; 39: 911
51. Saunders BD, Trapp RG. Bioestadística médica. México: Editorial El Manual Moderno; 1993. p. 62-64, 187-214.
52. Méndez IR, Namihira DG, Moreno LA, Sosa CM. El protocolo de investigación. 2ª ed. México: Editorial Trillas; 1990. p. 11-27.
53. Knoll E, Stamm D. The specific determination of serum creatinina. *J. Clin Chem Clin Biochem* 1970; 8: 582-587.
54. Schlebusch H, Gruenn U, Schneider Ch. Simultaneous interference of bilirubin and hemoglobin in creatinina determinations. *Clin Chem* 1993; 39: 1144.