

Estimación de interferencias en la determinación de fructosamina en suero de felinos y caninos

Estimation of interferences in the determination of fructosamine
of feline and canine serum

Colla, C.¹; Rodriguez, J.^{1,2}; Rabe, G.¹; Patalano, C.¹; Perassi, M.¹; Bordone, F.¹; Cerrutti, J.^{1,*}

¹Cátedra de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR. Boulevard Ovidio Lagos y Ruta 33, Casilda, Santa Fe, Argentina. ²Centro Binacional (Argentina-Italia) de Investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC) - UNR. Av. Arijón 28 bis, Rosario, Argentina

RESUMEN

La concentración de fructosamina en suero es útil para monitorear el control de la glucemia en un período precedente. En muestras de sangre, la presencia de hemoglobina y bilirrubina pueden causar interferencias en técnicas analíticas diagnósticas. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la posible interferencia al medir fructosamina sérica de gatos y perros clínicamente sanos. Se construyeron interferogramas, agregando concentraciones crecientes del posible interferente a pools de sueros de ambas especies. Se estudiaron concentraciones de hemoglobina desde 0.19 a 7.5 g/l en felinos, y de 0.16 a 6.10 g/l en caninos. Para bilirrubina, desde 6 a 600 mg/l, en ambas especies. Los resultados mostraron interferencia positiva y aditiva de hemoglobina en felinos (≥ 1.60 g/l) e interferencia negativa en caninos (≥ 1.20 g/l). En ambas especies se observaron interferencias positivas y aditivas para bilirrubina en el rango de concentraciones estudiadas (≥ 30 mg/l para felinos y ≥ 150 mg/l para caninos).

Palabras clave: (interferencias), (fructosamina), (caninos), (felinos).

Correspondencia *e-mail*: Jorgelina Cerrutti jorcerrutti@yahoo.com.ar

Recibido: 20-12-2013

Aceptado: 25-10-2014

SUMMARY

The fructosamine serum concentration reflects the degree of glycemic control obtained during a preceding period. Usually, the presence of hemoglobin or bilirubin in blood samples, could cause interferences in the laboratory analytical assays. Thus, we investigated the possible interferences on fructosamine determinations in serum from healthy cats and dogs. To testing and quantify the interference, we construct interferograms adding increased concentrations of hemoglobin or bilirubin to serum pools of cats or dogs. We tested serum hemoglobin concentrations from 0.19 to 7.5 g/l in feline sera and 0.16 to 6.10 g/l in canine sera. The bilirubin testing was done from 6 to 600 mg/l in both species sera. The results had shown a hemoglobin positive and additive interference in feline sera (≥ 1.60 g/l) and a negative interference in canine sera (≥ 1.20 g/l). In addition both species had shown positive and additive bilirubin interferences (≥ 30 mg/l for feline sera and ≥ 150 mg/l for canine sera).

Key words: (interferences), (fructosamine), (canine), (feline).

INTRODUCCIÓN

En muestras de sangre destinadas a pruebas diagnósticas, la presencia de hemoglobina (Hb) y bilirrubina (BRR) pueden causar interferencias en las técnicas analíticas de laboratorio que utilizan métodos espectrofotométricos y otros^{4,11}. Se puede definir a la interferencia analítica como el efecto de una sustancia presente en la muestra que altera el valor correcto del resultado, generalmente expresado como la concentración o actividad del analito¹¹. Las fuentes de interferencia pueden ser endógenas, sustancias propias del organismo como Hb, BRR, lípidos y proteínas y/o exógenas, como medicamentos, anticoagulantes, componentes de alimentos, conservantes, detergentes, etc. El objetivo de estudiar las interferencias analíticas es el de detectarlas, cuantificarlas y buscar las posibles soluciones al problema que ellas plantean. Según se produzca un aumento o disminución aparente de la concentración del analito medido, la interferencia se considera aditiva o negativa, respectivamente⁴. El método más conocido que se utiliza para cuantificar las interferencias es el de la construcción de interferogramas, propuesto por Glick y col⁸. El interferograma es un método gráfico obtenido a partir de la determinación del analito en cuestión en muestras fraccionadas sin (control)

y con concentraciones crecientes del posible interferente. Luego se grafican los resultados provenientes de la diferencia obtenida entre la muestra con interferente menos el control, en función de la concentración de interferente agregada. Se establece un intervalo para la aceptación o rechazo de los valores del analito en presencia del interferente⁴.

En nuestro grupo de trabajo estudiamos los niveles de fructosamina (FR) en felinos y caninos que reciben tratamientos con corticoides⁵. Uno de los problemas más comunes con el que nos enfrentamos es la presencia de hemólisis en las muestras, principalmente en el gato debido a las dificultades en la extracción de sangre en esta especie. Menos frecuentemente, se presentan casos de ictericia como potencial interferente. Los prospectos que acompañan a los kits de determinaciones de bioquímica clínica, generalmente diseñados para uso en humanos, contienen indicaciones respecto a las posibles interferencias por Hb y BRR que son muy generales y poco precisas. Por ello y con el fin de detectar y establecer los límites de las mismas, nos propusimos evaluar las interferencias de Hb y BRR en la estimación de FR sérica de gatos y perros clínicamente sanos mediante el uso de un kit comercial para el método colorimétrico desarrollado por Johnson y col¹⁰.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los estudios fueron realizados utilizando sueros provenientes de muestras de sangre de gatos (n=8) y perros (n=9) sanos cuyos dueños accedieron a participar en el estudio, obtenidas por venopunción. Las muestras de suero fueron mezcladas en pools (n=4) y almacenadas a -20°C hasta un máximo de 2 meses. Para evaluar *in vitro* el posible efecto de la hemólisis y de la bilirrubinemia sobre la determinación de FR se prepararon sueros suplementados con Hb o BRR de la siguiente manera:

Preparación de solución de Hb: se preparó una solución madre de Hb con los eritrocitos provenientes de 2 ml de sangre de gato o perro de acuerdo a la técnica de referencia¹³. La concentración de Hb en el hemolizado final se determinó mediante el método de la cianmetahemoglobina (Kit Hemoglobina, Lab. W Brizuela SA, Córdoba, Argentina).

Adición de Hb: se agregaron concentraciones crecientes de hemolizado diluido con agua destilada (20 µl) a alícuotas de los pools de sueros (190 µl) para producir concentraciones crecientes de hemoglobina en sueros de felinos (0.19, 0.27, 0.45, 0.71, 1.6, 4.0 y 7.5 g/l) y en sueros de caninos (0.16, 0.50, 0.70, 1.00, 1.22, 2.15, 4.00 y 6.10 g/l). La concentración de Hb en las alícuotas de suero se determinó por espectrofotometría directa utilizando el método de Harboe⁹. Posteriormente se determinó la concentración basal de FR por triplicado en el pool de sueros control y en las muestras adicionadas con Hb.

Preparación de solución de BRR: se utilizó BRR (Sigma Chem Co, St. Louis, USA) purificada por recristalización utilizando la técnica de MacDonagh y Assisi¹², y disuelta en Dimetil sulfóxido (DMSO) (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina) a una concentración de 6.3 mg/mL. Todo el procedimiento se realizó en la oscuridad.

Adición de Bilirrubina: a alícuotas de los pools de sueros (190 µl) se agregó BRR diluida en DMSO (20 µl) en cantidad suficiente para obtener concentraciones crecientes de 6, 15,

30, 60, 150, 300 y 600 mg/l de BRR. La concentración final de BRR en las muestras fue determinada mediante la reacción diazoica utilizando el kit Bilirrubina (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Posteriormente, se midió la concentración de FR por triplicado en el pool de sueros control (solo con DMSO) y en las muestras conteniendo BRR.

Determinación de FR: se realizó utilizando el kit colorimétrico fructosamina AA (Wiener Lab, Rosario, Argentina). La técnica está basada en el método desarrollado por Johnson y col.¹⁰ y aprovecha la propiedad del grupo ceetoamino de las proteínas glicosiladas de reducir la sal de tetrazolio (NTB) a formazán en medio alcalino.

Estimación gráfica de las posibles interferencias en la determinación de FR. Para estimar los niveles séricos de Hb y BRR a los que se producirían alteraciones se construyeron gráficos de interferencias⁸ representando el parámetro **I** en función de las concentraciones del interferente agregadas: $I = (b - a) / a$, siendo (**b**) la concentración de FR en el pool de sueros al que se le agregó el diluyente que contiene diferentes concentraciones del posible interferente. A este valor se le sustrae la concentración de FR del pool de sueros (**a**) que contiene el mismo volumen de diluyente sin el interferente. El intervalo de tolerancia para la aceptación o rechazo de los valores de FR en presencia del interferente se calculó a partir de la media \pm 3 desvío estándar (SD) de tres determinaciones de FR en las muestras sin agregado de interferente¹³.

Análisis estadísticos. Con el objeto de verificar los resultados obtenidos con los gráficos de interferencia se realizó un test *t* de Student apareado para analizar los valores de FR medidos en sueros sin y con concentraciones crecientes de interferentes. Todas las muestras se analizaron por triplicado, se consideró estadísticamente significativa una $p < 0.05$.

RESULTADOS

En las figuras 1A y 1B se muestran los gráficos de interferencia por Hb obtenidos en la medición de FR en sueros de felinos y caninos

respectivamente. Para felinos se produce una interferencia positiva a la concentración sérica de Hb de 1.6 g/l, magnificándose el fenómeno aditivamente para concentraciones mayores. En cambio para caninos se produce una interferencia negativa desde una concentración de 1.20 g/l. Puede observarse además que a concentraciones de Hb mayor a 6 g/l se revierte dicha interferencia. El análisis estadístico confirmó para ambos estudios el intervalo de confianza de las concentraciones de FR en presencia de Hb.

En las figuras 1C y 1D se muestran los gráficos de interferencia por BRR obtenidos en sueros de felinos y caninos respectivamente. En sueros provenientes de felinos se observa una interferencia positiva creciente con el incremento de la concentración de BRR en las muestras a partir de 30 mg/l. Para caninos también se observa una interferencia positiva y creciente a partir de la concentración de 150 mg/l. El análisis estadístico corroboró para ambos casos el intervalo de confianza. En la tabla 1 se resumen los valores de FR determinados

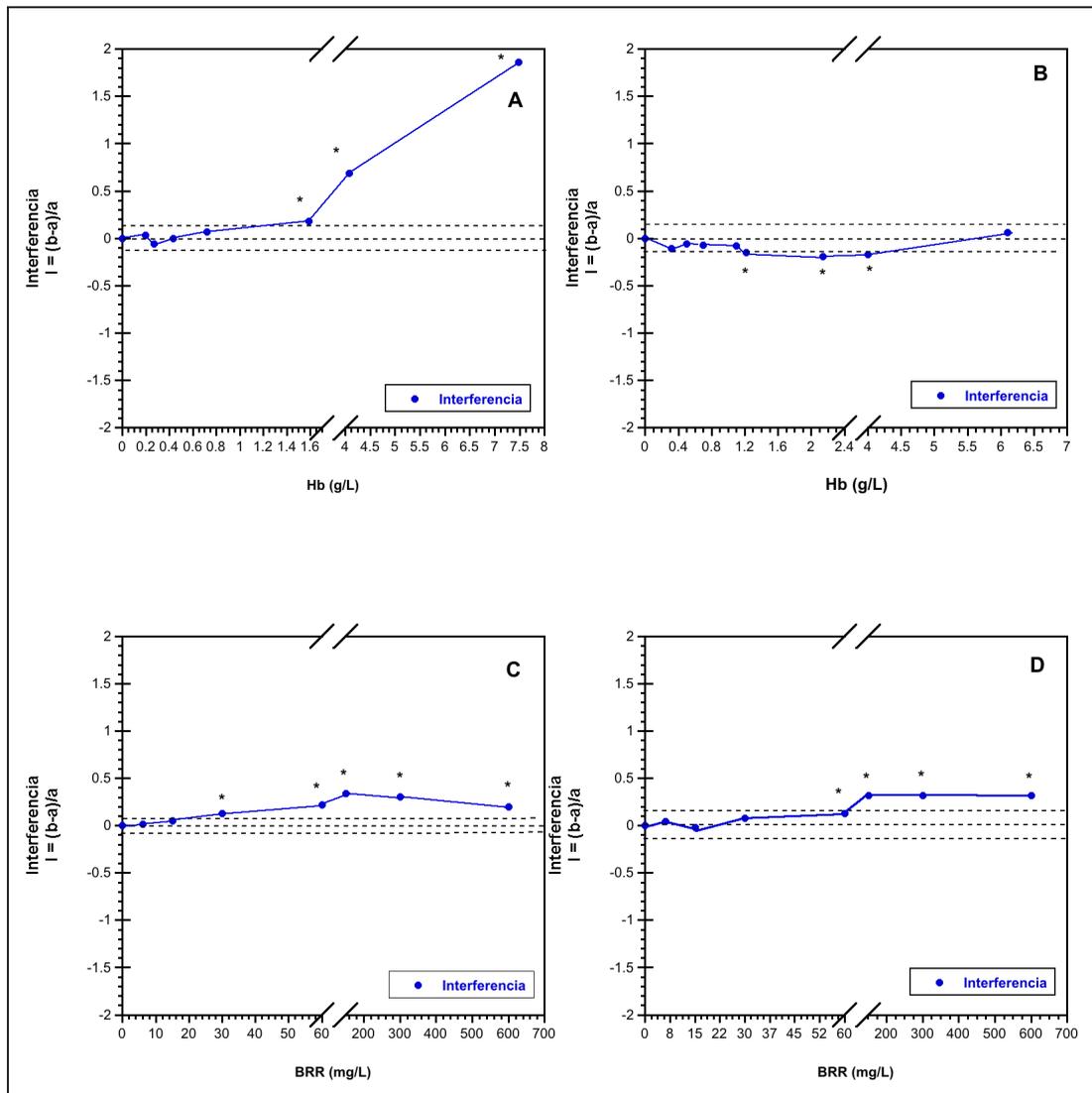


Figura 1. Gráficos de Interferencia de Hb en la determinación de FR en sueros de felinos (A) y caninos (B) y de Interferencia de BRR en la determinación de FR en sueros de felinos (C) y caninos (D). I = interferencia, a = concentración de FR en pool de sueros, b = concentración de FR en pool de sueros + Hb. * diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) en Test t de Student apareado de muestras con interferente vs pool de sueros.

en los pools respectivos y los intervalos de rechazo obtenidos para los distintos gráficos de interferencia.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La concentración de FR en suero refleja el grado de control glicémico obtenido por el paciente diabético y es útil para monitorear la efectividad de la terapia aplicada en la diabetes en un período de varias semanas de manera similar a la determinación de Hb glicosilada¹. Por ello, es importante conocer en profundidad las características de la determinación de FR por las implicancias clínicas que esta tiene en el seguimiento de control de la glucemia en el paciente diabético. El problema de la muestra a analizar comprende varios aspectos que tienen una marcada influencia sobre los resultados de las determinaciones de laboratorio⁶. Entre las variables preanalíticas podríamos considerar por ejemplo la hemólisis y la presencia de sustancias endógenas debidas a una patología presente que puede causar interferencias espectrales como el caso de la BRR. Este trabajo se centra en estas dos variables que se presentan frecuentemente en el laboratorio de análisis clínico veterinario. Hemos encontrado que en los casos estudiados con Hb y BRR, se producen interferencias en la determinación de FR con características diferentes para cada sustancia y cada especie. Mientras que la interferencia por Hb en el felino

es aditiva, en el canino es negativa. El posible mecanismo de interferencia en el felino podría asociarse a las características diferentes de la Hb felina respecto de la canina, en relación a la mayor cantidad de grupos sulfhídricos en su estructura³. Como antecedente, es conocida la interferencia de sustancias que portan sulfhidrilos, como por ejemplo el glutatión y la cisteína, en la reacción del formazán². En perros la interferencia negativa podría asociarse a una reacción química competitiva de la Hb canina con algún producto intermedio de la reacción colorimétrica⁶. Respecto a la interferencia aditiva de BRR observada en suero de caninos y felinos, podríamos postular que el mecanismo de interferencia se produce por las características espectrales de la BRR, que absorbe en el rango de 400 a 550 nm. El formazán producido en la reacción colorimétrica de la FR absorbe a 530 nm. Para verificar dicha hipótesis, se determinó la concentración de FR en un suero canino y en otra muestra del mismo suero al que se le adicionó BRR en una concentración de 150 mg/l. Luego se realizó un barrido espectral en las dos determinaciones de FR y se determinó que la curva perteneciente a la reacción colorimétrica de la FR en suero + BRR presenta mayor absorción a partir de los 400 nm. Las concentraciones de FR determinadas en ambos casos fueron de 178 y 224 $\mu\text{mol/l}$ para la muestra de suero y suero+ BRR

Tabla 1: Concentraciones basales de FR en los pools utilizados para el estudio de interferencias y valores de los intervalos de rechazo o aceptación de la interferencia. Concentraciones séricas de Hb ($[\text{Hb}]_{\text{interf}}$) y BRR ($[\text{BRR}]_{\text{interf}}$) a las que se produce interferencia en la determinación de FR. (n=número de determinaciones). del pool de sueros obtenida por triplicado y SD = desvío estándar.

	Felinos	Caninos
[FR] ($\mu\text{mol/l}$) en pool p/interf. Hb	166 \pm 6 (n=3)	330 \pm 14 (n=3)
[FR] ($\mu\text{mol/l}$) en pool p/interf. BRR	241 \pm 4 (n=3)	238 \pm 12 (n=3)
Intervalo grafico Interf. Hb*	0 \pm 0.11	0 \pm 0.13
Intervalo grafico Interf. BRR	0 \pm 0.05	0 \pm 0.15
$[\text{Hb}]_{\text{interf}}$ (g/l)	1.60	1.20
$[\text{BRR}]_{\text{interf}}$ (mg/l)	30	150

nota: *el intervalo gráfico se calcula como: $[(a \pm 3 \text{ SD}) - a] \div a$, siendo **a** la concentración de FR del pool de sueros obtenida por triplicado y SD = desvío estándar.

respectivamente, verificando la interferencia positiva de la BRR. ¿Cómo resolver el problema de estas interferencias en el laboratorio? En primer lugar el laboratorio debe establecer las concentraciones límite de los interferentes en la muestra a partir de los cuales se rechaza la misma o se informa al médico veterinario el problema encontrado. Para ello será necesario determinar la concentración de Hb o BRR en las muestras. Alternativamente en el caso de Hb, si no se dispone de un espectrofotómetro que permita la determinación precisa de Hb, se puede confeccionar una imagen con tubos conteniendo sueros con concentraciones crecientes de Hb, de modo que el laboratorista pueda rápidamente por comparación obtener una estimación de la concentración del interferente en la muestra. Como ejemplo de este proceder, en la dirección web: <https://drive.google.com/file/d/0Bzf-5xzGtp1dc3llTm9JdEZVejA/edit?usp=sharing> se muestra una fotografía con tubos conteniendo concentraciones de Hb desde 0.23 a 1.43 g/l en sueros de origen canino, las cuales podrán ser contrastadas con los valores de Hb y BRR a los que se produce interferencia de la Tabla 1.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Ambruster, D.A.. Fructosamine: structure, analysis and clinical usefulness. *Clin.Chem.* 1987; 33:2153-2163.
- 2- Blair, S.C.; Schier, G.M.; Gan, I.E.T.. More on fructosamine assay [Letter] *Clin. Chem.* 1987; 33:446-448.
- 3- Brockus CW. Erythrocytes. En Latimer KS. (Ed). Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology, 5th Edition. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, USA, 2011:3-44.
- 4- Castaño Vidriales, J.L.. Estudio de las interferencias analíticas endógenas en química clínica. *Quím.Clin.* 1994; 13:84-92.
- 5- Colla, C.; Rabe, G.; Patalano, C.; Perassi, M.E.; Albarello, G.; Cerrutti, J.. Efecto del tratamiento con acetona de triamcinolona sobre la glucemia en gatos. *InVet.* 2011; 13: 99-102.
- 6- Dimeski Gore. Interference testing. *Clin.Biochem.Rev.* 2008; 29:S43-S48.
- 7- Fairbanks, V.F.; Ziesmer, S.C. and O'Brien, P.C.. Methods for measuring plasma hemoglobin in micromolar concentration compared. *Clin.Chem.* 1992; 38:132-140.
- 8- Glick, M.R.; Ryder, K.W. and Jackson, S.A.. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. *Clin. Chem.* 1986; 32:470-475.
- 9- Harboe, M.. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 1959; 11:66-70.
- 10- Johnson, R.N.; Metcalf, P.A.; Baker, J.R.. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycoprotein. An index of diabetic control. *Clin.Chim.Acta* 1982; 127:87-95.
- 11- Kroll, M.H.; Elin, R.J.. Interference with clinical laboratory analysis. *Clin. Chem.* 1994; 40: 1996-2005.
- 12- McDonagh, A.F. and Assisi F. The ready isomerization of bilirubin IX- in aqueous solution. *Biochem.J* 1972; 129:797-800.
- 13- NCCLS Document EP7-A2 Vol 25 N°27. *Interference testing in clinical chemistry. Approved Guideline-Second edition.* Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005, USA.