

# Hemoglobina libre en plasma por espectrofotometría directa

## Plasma free hemoglobin by direct spectrophotometry

Rosa C, Mereles S, Rigacci M, Colimodio D.

*Laboratorio Central. Sector de Hematología. Hospital Universitario Austral. Pilar. Buenos Aires. Argentina.*

crosa@cas.austral.edu.ar

Fecha recepción: 10/8/2020  
Fecha aprobación: 15/8/2020



**LABORATORIO**

**HEMATOLOGÍA**  
Volumen 24 n° 2: 91-96  
Mayo - Agosto 2020

**Palabras claves:** Hemoglobina libre;  
Hemólisis intravascular;  
Espectrofotometría directa.

**Keywords:** Free hemoglobin;  
Intravascular hemolysis;  
Direct spectrophotometry.

### Introducción

Normalmente la mayor parte de la hemoglobina (Hb) se encuentra dentro de los glóbulos rojos y sólo hay trazas en el plasma. Los eritrocitos senescentes sufren la lisis al final de su vida media de 110-120 días dentro de las células del sistema retículo-endotelial en el bazo, hígado y la médula ósea (hemólisis extravascular) y la Hb no se libera al plasma en cantidades apreciables. En una anemia hemolítica la vida útil de los glóbulos rojos, por definición, se acorta. En algunos tipos de anemia hemolítica el aumento de la hemólisis es predominantemente extravascular y la concentración de Hb plasmática apenas aumenta. Sin embargo en otros trastornos se produce un grado importante de hemólisis en el torrente sanguíneo (hemólisis intravascular); la Hb

plasmática aumenta sustancialmente, la mayor parte forma un complejo con la haptoglobina, que debido a su tamaño no es filtrado a nivel glomerular, es removido y degradado por el sistema retículo-endotelial, y en algunos casos la cantidad de Hb liberada puede ser suficiente para que se excrete en la orina (hemoglobinuria).

La prueba de Hb libre es un análisis de sangre que mide el nivel de Hb en el plasma, fuera de los eritrocitos. Esta determinación es esencial para diagnosticar y monitorear la hemólisis intravascular. Los métodos conocidos para medir la Hb son ensayos cromogénicos, espectrofotométricos directos, inmunofluorimétricos y ELISA. Se prefieren los ensayos cromogénicos para la detección de pequeñas cantidades de Hb. En este grupo encontramos el de pe-

roxidasa (Crosby-Furth), método de detergente hemático alcalino conocido como Tritón/NaOH, el derivado del Drabkin y el que utiliza tetrametilbencidina (TMB) descrito por Standefer-Vanderjagt. Sin embargo, el uso de bencidina y sus derivados ha sido restringido debido a su carcinogenicidad y/o toxicidad. Los ensayos espectrofotométricos directos que miden la absorbancia en múltiples longitudes de onda se han utilizado para determinar los niveles de Hb libre y así evitar el uso de sustancias químicas cancerígenas o tóxicas. Sin embargo, sus resultados podrían verse influenciados por la presencia de bilirrubina y turbidez. Numerosos autores han propuesto sus propias fórmulas para minimizar la interferencia analítica, con distintos resultados. Mencionamos los ensayos de espectrofotometría directa de Harboe, el de Noe, el de Blakney-Dinwoodie, el de Kahn, el método policromático y el polinomio empírico de Fairbanks y el de la segunda derivada de Merrick-Pardue. Algunos de los métodos mencionados han sido adaptados a los autoanalizadores de Química Clínica para fines de diagnóstico en laboratorios de rutina<sup>(1)</sup>. Cabe destacar que no existe un método recomendado ni un kit estandarizado disponible en el mercado para los laboratorios clínicos que cuente con la aprobación de los organismos regulatorios. De esta forma, cada laboratorio adopta su propia técnica, adaptada de las descritas anteriormente y sujeta a limitaciones. Según el programa de evaluación externa de la calidad del *College of American Pathologists* (CAP), en el que participan más de 2000 laboratorios, sólo 92 participaron en la encuesta CAP 2018 para la prueba de Hb libre en plasma, lo que indica que no muchos laboratorios clínicos realizan el análisis de Hb libre, debido a las dificultades descritas anteriormente. A continuación describiremos el ensayo espectrofotométrico directo utilizado en nuestro laboratorio para medir Hb libre plasmática.

### Fundamento

Este método espectrofotométrico directo para el dosaje de Hb libre plasmática denominado polinomio empírico, fue desarrollado por Fairbanks et al<sup>(2)</sup> y está basado en la medida de la absorbancia en tres longitudes de onda en un espectrofotómetro UV/Vis. El cálculo de la concentración de hemoglobina libre se realiza con la siguiente ecuación:

$$\text{Hb libre} = \text{Factor}_1 \times \text{Abs}_{415} - \text{Factor}_2 \times \text{Abs}_{450} - \text{Factor}_3 \times \text{Abs}_{700}$$

En el primer término de la ecuación, la lectura de la absorbancia de la muestra a 415 nm corresponde a uno de los picos del espectro de absorción de la oxihemoglobina. Para minimizar la interferencia por la bilirrubinemia se le sustrae un término que incluye la absorbancia a 450 nm y para compensar por la turbidez se le sustrae otro término que incluye la absorbancia obtenida a 700 nm.

### Características pre-analíticas

Como el propósito es analizar un marcador de hemólisis, cualquier factor que pueda aumentar la misma debe evitarse estrictamente. Se utiliza plasma obtenido a partir de sangre entera anticoagulada con EDTA. Debe respetarse un tiempo limitado de aplicación del torniquete. La muestra debe remitirse inmediatamente al laboratorio evitando el estrés durante el transporte, como por ejemplo en el tubo neumático sin el embalaje adecuado que minimiza los impactos violentos. Se centrifuga el tubo de muestra a 3500 rpm durante 10 minutos. El plasma debe separarse de las células dentro de los 60 minutos posteriores a la recolección y es estable durante 24 horas a temperatura ambiente o a 4° C. Las muestras deben rechazarse si no se separan dentro de las 2 horas posteriores a la recolección. Es muy importante descartar hemólisis por una extracción de sangre traumática que podría provocar una falsa elevación de la hemoglobina plasmática.

### Características analíticas

#### Reactivos

- Solución madre:  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  1 g/dL. Estabilidad: 1 año a temperatura ambiente.
- Solución de trabajo:  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  10 mg/dL.

#### Equipamiento

- Espectrofotómetro Beckman DU® 520. Mide la absorbancia y la transmitancia en todo el rango UV-Vis (190 a 1100 nm +/- 1 nm). Ancho de banda espectral: <4.5 nm (Figura 1).

### Procedimiento

Se prepara la solución de trabajo diluyendo 1/100 la solución madre, para obtener una concentración final de 10 mg/dL de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ .

Dilución de la muestra: 1 parte de plasma + 10 partes de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ : 500 µl de plasma en 5 ml de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  10 mg/dL.



**Figura 1.** Espectrofotómetro UV/Vis.

Se enciende el espectrofotómetro y se deja estabilizar.

Leer la absorbancia en las siguientes longitudes de onda: 415, 450 y 700 nm, utilizando como blanco la solución de trabajo de CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> 10 mg/dL.

Para el cálculo de la Hb libre medida se aplica la

$$\text{Hb libre medida (mg/dL)} = 155 \times \text{Abs}_{415} - 130 \times \text{Abs}_{450} - 124 \times \text{Abs}_{700}$$

siguiente fórmula:

La concentración de **Hb libre final** se obtiene a partir este dato de Hb libre medida, utilizando la ecuación de la recta obtenida en la calibración, como se explica a continuación.

**Calibración**

Para realizar la curva de calibración se utiliza un estándar comercial o, en su defecto, una muestra de sangre entera anticoagulada con EDTA de la corrida del día, con una concentración cercana a 10 g/dL, medida

en el contador hematológico Sysmex XN-1000. Se realizan 6 diluciones por duplicado.

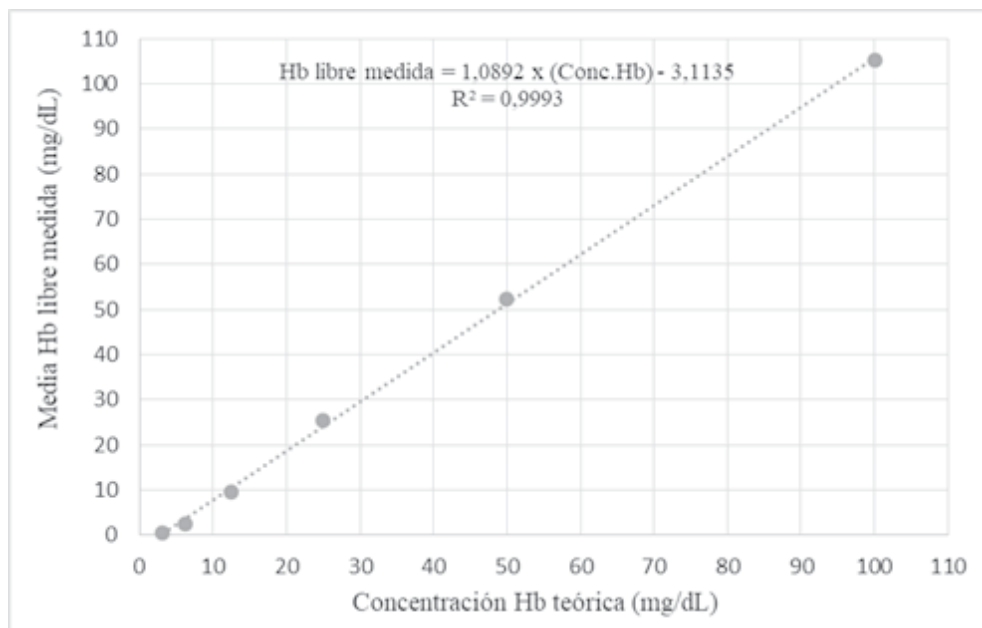
A continuación mostramos un ejemplo para una concentración de Hb de 10 g/dL, que es igual a 10.000 mg/dL. Se toman 100 µl de sangre entera con EDTA y se diluyen en 10 ml de agua destilada (dilución 1/100).

A partir de esta solución de 100 mg/dL de Hb se realizan las diluciones seriadas como se muestra en la tabla 1.

Se procesan todas las diluciones por duplicado como muestras siguiendo el procedimiento descrito. Con las lecturas de las absorbancias se calculan las concentraciones de Hb libre medidas. Se grafica la concentración de Hb teórica de las diluciones vs la concentración de Hb libre medida. Por el método de regresión lineal se obtiene la ecuación de la recta que se utilizará para calcular la concentración final

**Tabla 1.** Diluciones seriadas para la calibración.

Tubo	Agua destilada (µL)	Dilución anterior (µl)	Concentración final de Hb (mg/dL)
1	-	-	100
2	500	500	50
3	500	500	25
4	500	500	12.5
5	500	500	6.25
6	500	500	3.12



**Figura 2.** Ejemplo de curva de calibración para Hb libre en plasma.

de hemoglobina libre. En la figura 2 se muestra un ejemplo.

Para el cálculo de la concentración de Hb libre final se aplica la ecuación de la recta obtenida:

$$\text{Hb libre final (mg/dL)} = (\text{Hb libre medida} + 3.1135) / 1.0892$$

#### Control de calidad

En caso de no contar con controles comerciales se selecciona una muestra de sangre entera con EDTA con una concentración de 10 g/dL de Hb medida en el contador hematológico Sysmex XN-1000. A partir de esta muestra se realiza una dilución 1/500: 20 µl de sangre en 10 ml de agua destilada, para obtener una concentración final de 20 mg/dL (Control 1). A partir de este Control 1 de 20 mg/dL se realiza una dilución 1/4: 2 ml Control 1 + 6 ml de agua destilada, para obtener una concentración de 5 mg/dL (Control 2). Se hacen alícuotas de 1 ml de los controles y se conservan congeladas a -70°C. Se largan ambos controles en cada corrida.

En la tabla 2 se muestran los datos obtenidos en una corrida analítica en nuestro laboratorio.

Fairbanks et al determinaron el coeficiente de variación (CV) del ensayo a varias concentraciones de hemoglobina en muestras no ictericas ni lipémicas. Si bien el CV% es muy elevado para 1 mg/dL, la imprecisión es aceptable en el rango clínicamente relevante como podemos ver en la tabla 3.

Procesando una serie de muestras de plasma de donantes aparentemente sanos (n=56) los autores obtuvieron una media de 2.8 mg/dL con un desvío estándar (SD) de 2.2 mg/dL. La linealidad del ensayo

fue excelente en el rango de importancia clínica: 8-200 mg/dL.

#### Valores de referencia

Valor normal de Hb libre en plasma hasta 10 mg/dL. En pacientes con circulación extracorpórea se esperan valores de Hb libre menores a 50 mg/dL. Entre 50-100 mg/dL se consideran niveles de hemólisis moderados. Valores mayores a 100 mg/dL corresponden a hemólisis severa.

#### Utilidad clínica

El dosaje de Hb libre plasmática se utiliza para evaluar la anemia hemolítica. El exceso de Hb en plasma es un signo confiable de hemólisis intravascular sólo si la lisis no ha sido causada durante o después de la extracción de la sangre. También es necesario excluir la coloración del plasma que pueden ocasionar ciertos alimentos y aditivos alimentarios. El nivel plasmático de Hb aumenta drásticamente en las anemias hemolíticas de tipo intravascular, cuando la hemólisis es lo suficientemente grave y sobrepasa

**Tabla 2.** Datos obtenidos en una corrida analítica.

Dilución calibrador/ control/ muestra	Abs 415 nm	Abs 450 nm	Abs 700 nm	Hb libre medida mg/dL	Media Hb libre medida mg/dL	Hb libre final mg/dL
100	0,795	0,120	0,020	105	105	<b>99</b>
100	0,789	0,115	0,018	105		
50	0,412	0,075	0,011	53	52	<b>51</b>
50	0,405	0,073	0,010	52		
25	0,215	0,045	0,010	26	25	<b>26</b>
25	0,205	0,044	0,012	25		
12,5	0,102	0,042	0,013	9	10	<b>12</b>
12,5	0,110	0,040	0,011	10		
6,25	0,050	0,030	0,016	2	3	<b>5</b>
6,25	0,060	0,035	0,012	3		
3,12	0,031	0,027	0,000	1	1	<b>3</b>
3,12	0,025	0,025	0,005	0		
Paciente ECMO 1	1,478	0,808	0,045	118		<b>112</b>
Paciente ECMO 2	0,297	0,060	0,020	36		<b>36</b>
Paciente ECMO 3	1,243	0,393	0,051	135		<b>127</b>
Paciente Normal 4	0,050	0,025	0,012	3		<b>6</b>
Control 2	0,045	0,028	0,012	2		<b>5</b>
Control 1	0,178	0,038	0,012	21		<b>22</b>

**Tabla 3.** Reproducibilidad del ensayo en muestras no ictericas ni lipémicas.

Concentración Hb (mg/dL)	1	4	9	15	50	100
CV (%)	90	14	5.3	3.1	1.6	1.3

la capacidad de transporte de la haptoglobina disponible. Por lo tanto se puede encontrar un aumento marcado de Hb libre, con o sin hemoglobinuria, en la hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN), hemoglobinuria paroxística por frío, síndrome de hemaglutinina fría, en las microangiopatías trombóticas como en la púrpura trombocitopénica trombótica y en otras anemias hemolíticas mecánicas, como por ejemplo, después de una cirugía cardíaca y en las hemólisis por prótesis de válvulas cardíacas. En las anemias hemolíticas de tipo autoinmunes con anticuerpos calientes, la anemia falciforme y la talasemia  $\beta$  severa, el nivel de Hb plasmática puede aumentar en forma leve o moderada, pero en la esferocitosis hereditaria, en la que la hemólisis ocurre predominantemente en el bazo, los niveles son normales o se puede observar un ligero aumento.

Niveles elevados también pueden encontrarse como resultado del ejercicio violento en una persona sin entrenamiento previo.

Los pacientes conectados a dispositivos mecánicos como la oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO), la diálisis renal o la bomba de bypass cardíaco tienen riesgo de hemólisis. A pesar de las importantes mejoras tecnológicas observadas durante los últimos 20 años, la hemólisis asociada al ECMO sigue siendo una complicación que puede surgir durante la terapia. La gravedad de la hemólisis es directamente evaluada por la Hb libre y puede ser desde tolerable hasta altamente tóxica. Los niveles altos de Hb libre tienen consecuencias directas en la morbilidad y mortalidad, especialmente por la injuria renal. La hemólisis severa 24 horas después del inicio de la terapia es un predictor independiente de

mortalidad. Los niveles de Hb libre se asocian con insuficiencia renal aguda y muerte. Las circunstancias que conducen a hemólisis severa principalmente asociadas con trombosis en la bomba principal y flujo inadecuado, deben ser conocidas y anticipadas. Considerando la ausencia actual de tratamiento específico ante eventos de hemólisis severa, la medición de la Hb libre tiene un papel importante<sup>(3)</sup>. Por otra parte, los ensayos cromogénicos de anti-Xa para la monitorización de la actividad de la heparina no fraccionada que se utilizan en ECMO son susceptibles a la interferencia por la hemólisis y la ictericia. La hemólisis da como resultado un falso

aumento en la pendiente del cambio de absorbancia en el ensayo de actividad, que da como resultado una heparinemia falsamente más baja. El fabricante del reactivo de anti-Xa reporta en el inserto el umbral de interferencia de la Hb y es importante poder medir la concentración de la misma presente en las muestras de los pacientes, para saber si el resultado está afectado o no por la interferencia<sup>(4)</sup>. También se ha observado un aumento de la Hb libre en pacientes con sepsis grave y los métodos espectrofotométricos demostraron ser apropiados para la predicción de muerte en sepsis severa<sup>(5)</sup>.

**Conflictos de interés:** Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

### Bibliografía

1. Chung H-J, Chung J-W, Yi J et al. Automation of Harboe method for the measurement of plasma free hemoglobin. *J Clin Lab Anal.* 2020; 34:e23242. <https://doi.org/10.1002/jcla.23242>.
2. Fairbanks VF, Ziesmer SC, O'Brien PC. Methods for measuring plasma hemoglobin in micromolar concentration compared. *Clin Chem.* 1992; 38/1:132-40.
3. Dufour N, Radjou A, Thuong M. Hemolysis and Plasma Free Hemoglobin During Extracorporeal Membrane Oxygenation Support: From Clinical Implications to Laboratory Details. *ASAIO Journal.* March 2020;66(3):239-246. doi: 10.1097/MAT.0000000000000974
4. Khan J, Chandler WL. Interference in the anti-Xa heparin activity assay due to hemolysis and icterus during pediatric extracorporeal life support. *Artif Organs.* 2019;43:880-887. <https://doi.org/10.1111/aor.13467>.
5. Adamzik et al. Free hemoglobin concentration in severe sepsis: methods of measurement and prediction of outcome. *Crit Care.* 2012;16(4):R125. Published 2012 Jul 16.



**Atribución – No Comercial – Compartir Igual (by-nc-sa):** No se permite un uso comercial de la obra original ni de las posibles obras derivadas, la distribución de las cuales se debe hacer con una licencia igual a la que regula la obra original. Esta licencia no es una licencia libre.