

ORIGINAL

Interferencia de la bilirrubina en la medición del paracetamol por el método del indofenol en el analizador Dimension® EXL™



José Luis Martín Calderón*, Fernando Bustos Guadaño, Julia Varona Pérez y Juan Carlos Sánchez Gómez

Servicio de Análisis Clínicos, Hospital General Nuestra Señora del Prado, Servicio de Salud de Castilla-La Mancha, Talavera de la Reina, Toledo, España

Recibido el 21 de julio de 2013; aceptado el 11 de octubre de 2013

Disponible en Internet el 16 de noviembre de 2013

PALABRAS CLAVE

Paracetamol;
Acetaminofeno;
Hiperbilirrubinemia;
Interferencias
endógenas

Resumen

Introducción: Los niveles de paracetamol se miden habitualmente en los laboratorios de urgencias ante la evidencia o sospecha de una intoxicación para predecir la posible hepatotoxicidad aguda por este fármaco. Sin embargo varios estudios han reportado un falso incremento en la concentración de paracetamol medida por métodos enzimáticos en plasmas ictericos, circunstancia que ocurre frecuentemente en casos de fracaso hepático.

Material y métodos: Para evaluar la influencia de la bilirrubina en la medición de paracetamol en el analizador Dimension® EXL™ (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.®) se preparó una solución primaria de interferente a una concentración de 800 mg/dl (13.680 $\mu\text{mol/l}$) que se añadió a una solución de control comercial con altos niveles de paracetamol hasta obtener una mezcla con una concentración de bilirrubina de 40 mg/dl (684 $\mu\text{mol/l}$) realizando la medición de paracetamol en esta mezcla y en una de referencia. Comprobada la existencia de interferencia se procedió a cuantificarla diluyendo la solución primaria hasta obtener mezclas con 20; 10; 5; 2,5; 1,25 y 0,625 mg/dl de bilirrubina (342; 171; 85,5; 42,75; 21,37 y 10,69 $\mu\text{mol/l}$). Se obtuvo el interferograma representando la desviación de la medida frente a la mezcla de referencia frente a las distintas concentraciones de interferente.

Resultados: Las distribuciones fueron gaussianas, por lo que se pudo aplicar la t de Student para el cálculo de las significaciones estadísticas. Se demostró la existencia de una interferencia significativa negativa a partir de 5 mg/dl (85,5 $\mu\text{mol/l}$) de bilirrubina, lo que muestra que las mediciones de paracetamol deben interpretarse con cautela en casos de hiperbilirrubinemia.

© 2013 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jlmartinc@sescam.jccm.es (J.L. Martín Calderón).

KEYWORDS

Acetaminophen
(paracetamol);
Acetaminophen;
Hyperbilirubinemia;
Endogenous

Bilirubin interference in the measurement of paracetamol by the indophenol method on the Dimension® EXL™**Abstract**

Background: Blood levels of acetaminophen (paracetamol) are measured routinely in large acetaminophen overdoses or when poisoning is suspected, in order to predict the likelihood of hepatotoxicity. However some cases of spurious acetaminophen levels have been reported in jaundiced patients.

Material and methods: The interference of bilirubin in acetaminophen measurements was studied on the Dimension® EXL™ by preparing a primary mixture of bilirubin at 800 mg/dL, which was spiked to a quality control solution with high acetaminophen concentration in order to get a bilirubin concentration of 40 mg/dL on the mixture. Acetaminophen concentration was measured in the mixture with bilirubin and in reference solution without bilirubin. Interference was assessed and quantified by diluting the bilirubin solution to achieve final concentrations of 20, 10, 5, 2.5, 1.25 and 0.625 mg/dL (342, 171, 85.5, 42.75, 21.37 and 10.69 $\mu\text{mol/L}$). A graph of the interference was obtained showing the bias of acetaminophen concentrations with reference solution vs. increasing bilirubin concentrations.

Results: Acetaminophen concentrations in both solutions followed Gaussian distributions. The *t* test showed significant negative interference at bilirubin concentrations higher to 5 mg/dL (85.5 $\mu\text{mol/L}$), which means that blood acetaminophen concentrations must be interpreted with caution in cases of hyperbilirubinemia.

© 2013 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La toxicidad por fármacos es la tercera causa de fallo hepático agudo, entre los cuales el 25% acaban en una necrosis hepática fulminante¹. Debido a su amplio consumo al tratarse de un medicamento que se dispensa sin receta médica, el paracetamol (N-acetil-*p*-aminofenol) ocupa un lugar destacado entre los tóxicos más frecuentemente involucrados en fallo hepático agudo en los servicios de Urgencias. Más del 90% del paracetamol ingerido es conjugado a través de reacciones de fase II en glucurónidos y sulfatos, metabolitos desprovistos de toxicidad que son excretados por la orina². Sin embargo, menos del 5% se metaboliza a través de la isoenzima del citocromo P-450, 2E1 (CYP2E1) generando un producto altamente reactivo y tóxico, la *N*-acetil-*p*-quinoneimina (NAPQI), que en condiciones fisiológicas es detoxificada por el glutatión hepático y eliminada como ácido mercaptúrico². En casos de sobredosis por paracetamol o en cualquier otra situación en la que las reservas hepáticas de glutatión caigan por debajo del 30% la NAPQI se une a las proteínas hepáticas, causando necrosis centrolobulillar^{3,4}. En casos de sobredosis por paracetamol se debe establecer antes de las 12 h el tratamiento con *N*-acetilcisteína (NAC), compuesto donador de sulfhidrilos que minimiza el daño hepático producido por las altas dosis de paracetamol. La determinación de los niveles plasmáticos de paracetamol por el laboratorio de urgencias juega un papel destacado a la hora de predecir la probabilidad de necrosis hepática, así como de establecer la necesidad del tratamiento con el antídoto^{4,5}.

Dejando a un lado los métodos cromatográficos que se consideran el *gold standard*, el paracetamol puede ser medido por 2 grupos de métodos en los laboratorios de urgencias. Por un lado, los métodos enzimáticos cromogénicos, ampliamente extendidos que por lo general utilizan una amidasa para producir *p*-aminofenol que reacciona con

un reactivo cromogénico para producir un compuesto coloreado. Aunque menos extendidos y más caros también están disponibles en equipos automatizados los inmunoensayos homogéneos. Los métodos enzimáticos son más sensibles a interferencias tanto endógenas como exógenas^{3,4} que los inmunoensayos. Entre los posibles interferentes en estos métodos cromogénicos la bilirrubina es el principal candidato, debido a su intensa absorbancia en un amplio rango de longitudes de onda del espectro ultravioleta y visible. De hecho han sido reportados varios casos de niveles falsamente elevados de paracetamol cuantificado con métodos enzimáticos en pacientes con fallo hepático e hiperbilirubinemia que negaban la ingesta del analgésico^{3,4,6}.

En el presente estudio nos proponemos demostrar la existencia de una interferencia de la bilirrubina en la medición del paracetamol con nuestro método adaptado a la plataforma Dimension® EXL™ (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.®) que consiste en la producción de indofenol que absorbe fuertemente la luz a 600 nm, a partir de la hidrólisis enzimática del paracetamol y reacción con un compuesto cromogénico aromático. Una vez evidenciada la existencia de interferencia procederemos a cuantificarla expresándola gráficamente en forma de interferograma.

Material y métodos

En nuestro laboratorio utilizamos para medir los niveles de paracetamol un método que se basa en el uso de una amidasa específica de las amidas aromáticas. La enzima rompe la molécula de paracetamol, produciendo *p*-aminofenol, el cual reacciona específicamente con *o*-cresol en una solución amoniacal de cobre dando lugar a indofenol, que absorbe la luz a 600 nm. La cantidad de aminofenol producida es proporcional a la concentración de paracetamol y se mide usando una técnica bicromática a punto final en el analizador® EXL™ (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.®).

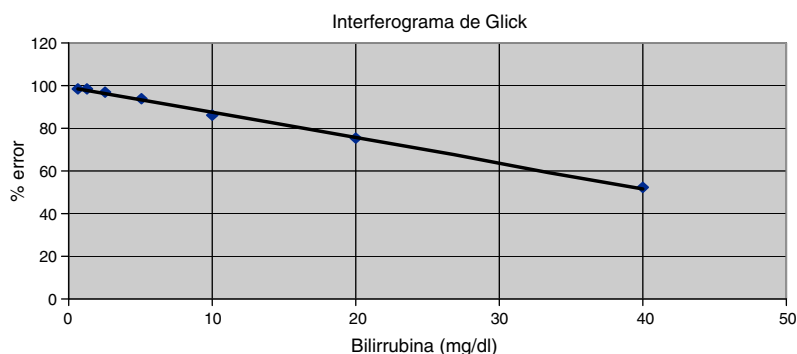


Figura 1 Interferograma obtenido al representar en ordenadas la desviación porcentual en la medida de paracetamol de la muestra, con interferente a distintas concentraciones de bilirrubina respecto a la mezcla de referencia, y en abscisas las concentraciones crecientes de interferente.

Para evaluar la influencia de la bilirrubina en la cuantificación de paracetamol utilizamos un protocolo basado en las recomendaciones de la SEQC para el estudio de interferencias endógenas con algunas modificaciones⁷. Se preparó una solución primaria de interferente disolviendo 24 mg de bilirrubina no esterificada (Merck®) pesada en la oscuridad en 3 ml de NaOH 0,1 N. Se añadieron 100 µl de esta solución primaria de interferente a 1,8 ml de una solución de control de calidad (TDM PLUS®, Siemens Healthcare Diagnostics Inc.®) con altos niveles de paracetamol, añadiendo a continuación 100 µl de HCl 0,1 N para neutralizar el medio, con lo que se obtiene una mezcla problema con una concentración de bilirrubina de 40 mg/dl. La mezcla de referencia se obtuvo añadiendo a 1,8 ml de la misma solución de control de calidad 100 µl de NaOH 0,1 N y 100 µl de HCl 0,1 N de modo que la concentración final de paracetamol es la misma en ambos especímenes. Se hicieron 15 mediciones de paracetamol en las 2 mezclas. La normalidad de la distribución de las 2 series de resultados se evaluó mediante el test de D'Agostino-Pearson usando el paquete estadístico SPSS® v.15.0. Dada la gaussianidad de las distribuciones se aplicó la prueba t de Student para evaluar la significación de la interferencia. Comprobada la existencia de interferencia se procedió a cuantificarla diluyendo la solución primaria hasta obtener mezclas con 20; 10; 5; 2,5; 1,25 y 0,625 mg/dl de bilirrubina (342; 171; 85,5; 42,75; 21,37; 10,69 µmol/l). En cada una de estas soluciones se midió el paracetamol por quintuplicado. Se representó gráficamente la media de los resultados de cada solución frente a las concentraciones de bilirrubina, obteniéndose la ecuación de regresión que describe la interferencia. Además se obtuvo el interferograma representando la desviación de la medida en porcentaje respecto a la mezcla de referencia frente a las distintas concentraciones de interferente. Se consideró que existía interferencia significativa si había significación estadística ($p < 0,05$).

Resultados

Se obtuvieron las medias y las desviaciones estándar de cada distribución para la mezcla problema y la de referencia. Las distribuciones de resultados en la serie de la mezcla problema y la mezcla de referencia fueron gaussianas ($p = 0,12$ para la mezcla problema, y $p = 0,63$ para la de referencia), por lo que se pudo aplicar la t de Student para el cálculo

Tabla 1 Cuantificación del paracetamol en la solución primaria de interferente (40 mg/dl de bilirrubina) frente a la solución de referencia sin interferente

	Solución de interferente (40 mg/dl bilirrubina)	Solución referencia
Media	61,546	117,693
Desviación estándar	1,164	0,655
Diferencia media	56,147	
IC 95%	55,219-57,074	
t	129,89	
p	< 0,001	

IC 95%: intervalo de confianza del 95%; p: probabilidad de cola; t: estadístico de la prueba de la t de Student.

de las significaciones estadísticas. En la tabla 1 se resume el resultado del test de la t de Student para la comparación de la mezcla con interferente y la muestra de referencia.

Puesto que el intervalo de confianza de la media de las diferencias no contiene el cero y $p < 0,001$ ⁷, la interferencia es estadísticamente significativa, procediéndose a su cuantificación. Al cuantificar paracetamol en cada solución con niveles crecientes de bilirrubina se obtuvo una recta regresión descrita por la ecuación $y = 117,0261 - 1,3880x$, siendo x la concentración de interferente e y la concentración de paracetamol con un coeficiente de determinación $R^2 = 0,996$. El signo de la pendiente de la recta de regresión nos indica que se trata de una interferencia negativa. La cuantificación de la interferencia se muestra gráficamente en forma de interferograma (Glick et al.⁸) en la figura 1.

Utilizando el criterio de la significación estadística ($p < 0,05$) se observa que existe interferencia significativa para concentraciones de bilirrubina iguales o superiores a 5 mg/dl (85,5 µmol/l) (tabla 1).

Discusión y conclusiones

De nuestro estudio se deduce que la bilirrubina produce interferencia negativa en el método de medida del paracetamol con indofenol acoplado a Dimension® EXL™. La interferencia es significativa a partir de una concentración de 5 mg/dl de bilirrubina (85,5 µmol/l).

El paracetamol es el principal tóxico implicado como causa de fallo hepático en las urgencias de nuestros hospitales^{1,2}, siendo la determinación de sus niveles clave para establecer con prontitud la terapia con N-acetilcisteína⁵. La bilirrubina es uno de los compuestos endógenos más proclives a producir interferencias, dada su amplia e intensa absorción en el espectro ultravioleta y visible³. Diversos estudios han demostrado la producción de resultados falsos positivos para el paracetamol en plasmas con hiperbilirrubinemia en pacientes que negaban el consumo del fármaco y en los que se mostró la ausencia de paracetamol en la muestra mediante metodologías más específicas. Bertholf et al.³ encuentran niveles detectables de paracetamol entre 5 y 18 µg/ml (33 y 119,16 µmol/l) en 12 especímenes de pacientes que negaban la ingesta del analgésico, con concentraciones de bilirrubina comprendidas entre 15,9 y 33,8 mg/dl (271,9 y 578 µmol/l), usando un método enzimático acoplado a la producción de indofenol con *o*-cresol. Al diluir estos especímenes de forma seriada con salino (1:2, 1:3) mostraron falta de linealidad en la concentración de paracetamol. Fong et al.⁴ reportan un caso de una paciente de 31 años con fallo hepático severo (bilirrubinemia 71 mg/dl o 1.210 µmol/l) en la que se solicita determinación de paracetamol, obteniéndose unos niveles de 18 µg/ml (121 µmol/l) con un método enzimático colorimétrico. La paciente negaba el consumo de paracetamol, evidenciándose además que los niveles del fármaco se mantenían constantes a las 24 y 48 h del ingreso, lo que era incoherente con el comportamiento farmacocinético. Al sospecharse una interferencia analítica se sometió al plasma a una ultrafiltración para eliminar la influencia de la bilirrubina y se determinó paracetamol en el ultrafiltrado hallándose niveles indetectables (< 4 µg/ml). Al medir paracetamol mediante HPLC en el plasma original se obtienen también valores inferiores al límite de detección (< 1 µg/ml). Por su parte Polson et al.⁶ encuentran 2 casos de pacientes con fallo hepático agudo y concentraciones de bilirrubina de 34,8 mg/dl y 28 mg/dl (595 y 479 µmol/l) hallándose niveles de paracetamol de 14,2 y 30 µg/ml (94 y 199 µmol/l) respectivamente, medidos con un método colorimétrico y en los que al diluir la muestra (1:1) no se hallaron niveles detectables del fármaco. Estos mismos autores reúnen 36 sueros hiperbilirrubinémicos testados como negativos para paracetamol mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), en los que se realiza el ensayo de paracetamol por varios métodos automatizados, incluyendo métodos enzimático-colorimétricos como el nuestro e inmunoensayos (EMIT, FPIA). Se evidenció en este estudio que los inmunoensayos homogéneos no eran afectados por la interferencia, mientras que los métodos cromogénicos producían resultados espurios para el paracetamol, principalmente a partir de 10 mg/dl de bilirrubina (171 µmol/l).

Nuestro método es un método enzimático-colorimétrico que produce como producto final indofenol, el cual absorbe fuertemente la radiación a 600 nm. Al revisar el procedimiento normalizado de trabajo del fabricante (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.[®]) encontramos ausencia de interferencia significativa (< 10% de desviación, según el fabricante) con 5 mg/dl (85,5 µmol/l) de bilirrubina y una interferencia negativa (-21%) con 20 mg/dl (342 µmol/l) de bilirrubina. Cuando realizamos nuestro estudio de

interferencia encontramos una significación estadística para concentraciones de bilirrubina de 5 mg/dl (85,5 µmol/l) o superiores. Nosotros consideramos que nuestro criterio es el que más se ajusta al citado documento de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular⁷ y es el más riguroso desde el punto de vista estadístico que el ampliamente aceptado del 10% de desviación que aparecen recogidos en la mayoría de las instrucciones de los fabricantes de reactivos. No hemos encontrado referencias en la literatura que estudien la interferencia de la bilirrubina en la medida del paracetamol en plasma o suero humanos.

En resumen, concluimos que el método del indofenol para la determinación del paracetamol en Dimension[®] EXL[™] produce errores en presencia de concentraciones de bilirrubina de 5 mg/dl (85,5 µmol/l) o superiores, siendo preferible el uso de métodos inmunoanalíticos para evitar esta interferencia. Por fortuna ante un caso de fallo hepático agudo por paracetamol las concentraciones plasmáticas de bilirrubina se elevan casi 24 h tras la ingesta del fármaco, mientras que los primeros síntomas de la intoxicación se presentan a las pocas horas, que es cuando el paciente suele acudir a urgencias y cuando es útil medir los niveles de paracetamol⁴. En todo caso las concentraciones plasmáticas de paracetamol deben interpretarse con cautela en presencia de hiperbilirrubinemia cuando se usan métodos enzimáticos colorimétricos como el de nuestro laboratorio. Nosotros recomendamos en lo posible la implantación de métodos de inmunoanálisis homogéneo para la medida de la concentración de paracetamol en suero o plasma humanos, que además presentan la misma facilidad de uso y rapidez que los métodos colorimétricos, si bien tienen un coste económico ligeramente superior.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún tipo de conflicto de interés con las firmas comerciales implicadas en el estudio.

Bibliografía

1. Rubin E, Farber JL. The liver and biliary system. En: Rubin E, Farber JL, editores. *Essential Pathology*. 2nd ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1995. p. 393-439.
2. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis: I. Role of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther*. 1973;187:185-94.
3. Bertholf R, Johannsen LM, Bazooaband A, Mansouri V. False-positive acetaminophen results in a hyperbilirrubinemic patient. *Clin Chem*. 2003;49:695-8.
4. Fong BM, Siu TS, Tam S. Persistently increased acetaminophen concentrations in a patient with acute liver failure. *Clin Chem*. 2011;57:9-11.
5. Rumack BH, Mathew H. Acetaminophen poisoning and toxicity. *Pediatrics*. 1975;55:871-6.
6. Polson J, Wians FH, Orsulak P, Fuller D, Murray NG, Koff JM, et al. False positive acetaminophen concentrations in patients with liver injury. *Clin Chim Acta*. 2008;391:24-30.
7. Castaño Vidriales JM. Estudio de las interferencias analíticas endógenas en química clínica. Sociedad Española de Química Clínica. Comité Científico. *Química Clínica*. 1994;13:84-92.
8. Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. *Clin Chem*. 1986;32:470-5.