

COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS DE MEDICIÓN DE HEMOGLOBINA EN CIRUGÍA CARDIACA.



TRABAJO DE SUFICIENCIA INVESTIGADORA.

Autor: Virginia Cegarra Sanmartín.

Email de contacto: vcegarra@santpau.cat

Directores:

Xavier Rius Cornadó.

Alfonso Martínez López.

**Universidad Autònoma de Barcelona.
Junio 2012.**



Universitat
Autònoma
de Barcelona

Annex 2

CERTIFICAT DEL DIRECTOR DEL TREBALL DE RECERCA

Doctor Xavier Rius Cornadó, Catedrático de cirugía del Departament de Cirurgia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

FA CONSTAR:

que el treball titulat "Comparación de tres métodos de medición de la hemoglobina en cirugía cardíaca" ha estat realitzat sota la meva direcció pel llicenciat Virginia Cegarra Sanmartín, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Cirurgia (curs 2011-2012).

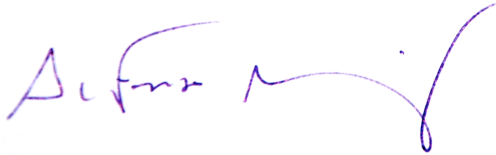
Barcelona, 14 de juny de 2012.

ALFONSO MARTÍNEZ LÓPEZ, Doctor en Medicina y Cirugía por el Departamento de Cirugía de la Universidad Autónoma de Barcelona,

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación con título "*Comparación de tres métodos de medición de hemoglobina en cirugía cardíaca*", y del que es autora Virginia Cegarra Sanmartín, ha sido realizado bajo mi dirección y está en condiciones de ser presentado para su lectura y defensa ante el tribunal correspondiente

Para que conste a los efectos que convenga firmo el presente documento en Zaragoza, ocho de junio de 2012,



Dr. D. Alfonso Martínez López
amtz.lopez@gmail.com

ÍNDICE:

1.- RESUMEN.....	4
2.- INTRODUCCIÓN.....	5
3.- REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	8
3.1.- Indicación transfusional y umbral transfusional.....	8
3.2.- Riesgos y efectos adversos de la transfusión sanguínea.....	9
3.3.- La Hemoglobina.....	10
3.3.1.- Compuestos de la hemoglobina.....	11
3.4.- El Hematocrito.....	12
3.5.-Introducción histórica de los métodos de medición hematométrica.....	13
3.6.- Métodos actuales de medición de la hemoglobina.....	15
3.6.1.- Espectrofotometría	15
(a): Método de la ciano-methemoglobina.....	17
(b): Método de la Co-oximetría.	18
3.7.- Métodos actuales de medición del hematocrito.....	19
3.7.1.- Centrifugación.....	19
3.7.2.- Principio Coulter o de impedancia eléctrica.....	19
3.7.3.- Conductividad.....	20
3.8.- Analizadores portátiles “POCT”	21
3.8.1.- GEM®Premier 3000 (<i>Instrumental Laboratory, USA</i>)	22
3.8.2.- ABL 800 FLEX (<i>Radiometer, Denmark</i>).....	23
3.9.- Analizador <i>COULTER® HmX Hematology Analyzer (Brea, EEUU)</i>	24
4.- HIPÓTESIS.....	25
5.- OBJETIVOS.....	25
6.- MATERIAL Y MÉTODO	26
7.- RESULTADOS.....	30
8.- DISCUSIÓN.....	38
9.- CONCLUSIONES.....	45
10.- BIBLIOGRAFÍA.....	46

1.-RESUMEN:

Durante la cirugía cardíaca con circulación extracorpórea (CEC) los pacientes pueden sufrir pérdidas sanguíneas cuantiosas y cambios electrolíticos clínicamente importantes. El umbral transfusional hemático está basado – entre otros factores- en el valor de las cifras de hemoglobina y/o hematocrito. Estos valores se obtienen mediante las máquinas tipo “point-of-care testing” (POCT) que están presentes en quirófano y en las unidades de reanimación.

En nuestro centro hay distintos tipos de máquinas POCT. Todas miden la cantidad de hemoglobina y/o el porcentaje de hematocrito que contiene la muestra sanguínea analizada. Cada una de ellas utiliza una metodología diferente para medir los parámetros sanguíneos: (i) la *conductividad*, y (ii) la *espectrofotometría*.

Los cambios hemodilucionales secundarios a la CEC pueden teóricamente, alterar la correcta medición de los POCT, ofreciendo resultados dispares con respecto a los sistemas de medición aceptados como sistemas de referencia o “gold standard”, y ocasionar errores en la indicación transfusional – por exceso o por defecto -, que no ocurriría si las muestras fueran analizadas en el laboratorio de referencia.

En este trabajo comparamos cada uno de los POCT con respecto a la máquina de referencia durante la cirugía cardíaca con CEC, buscando (1) la posible existencia de errores sistemáticos en los POCT al medir las cifras de hemoglobina y hematocrito, y (2) la validez de cada POCT para detectar el umbral de transfusión.

PALABRAS CLAVE: hemoglobina, analizadores “point-of-care testing”, transfusión.

2.-INTRODUCCIÓN

La medición del valor de la hemoglobina es una de las pruebas de laboratorio más demandada a diario en un hospital, tanto en pacientes agudos como crónicos.

La concentración de hemoglobina es una medida de la capacidad potencial de transporte de oxígeno¹, y actualmente, sigue siendo el principal valor que adoptamos para guiar la práctica transfusional.

En las áreas quirúrgicas y de cuidados postoperatorio, pueden existir situaciones de hemorragia aguda como consecuencia de la agresión quirúrgica. La reposición de derivados sanguíneos, principalmente de concentrados de hematíes, asegura el correcto aporte de oxígeno a los tejidos, evitando la aparición de fenómenos deletéreos en la homeostasis del organismo. Sin embargo, la administración de sangre puede transmitir enfermedades infecciosas y desencadenar alteraciones inmunitarias. Como consecuencia de estas complicaciones, se ha demostrado que la práctica transfusional liberal está asociada a un aumento de la morbi-mortalidad con respecto a prácticas restrictivas². Es por ésto, que necesitamos conocer con certeza el valor de la hemoglobina antes de decidir transfundir.

De acuerdo con las guías clínicas sobre transfusión sanguínea perioperatoria² en nuestro centro disponemos de un protocolo de transfusión en cirugía cardíaca de carácter restrictivo. En el intraoperatorio, el valor umbral para transfundir es Hb < 60g/L o Hto < 20%, mientras que en la unidad de cuidados postoperatorios, el umbral es Hb < 80g/L o Hto < 24%.

El método de referencia para la medición de la hemoglobina es la detección fotométrica de ciano-metahemoglobina y fue aceptado por el Comité Internacional de Estandarización de Hematología (ICSH) en 1967. Es el método que generalmente utilizan los analizadores hematológicos automáticos. Sin embargo, este método presenta ciertas desventajas: (i) precisa de la extracción de 3ml de sangre para cada determinación. (ii) precisa enviar la muestra al laboratorio y esperar los resultados supone una demora de hasta 30 minutos y (iii) precisa la utilización de un reactivo tóxico, el cianuro.

En contraposición al método de la ciano-methemoglobina, existen otros métodos estandarizados para la medición de la hemoglobina que son más rápidos, no utilizan reactivos tóxicos y por tanto, son de mayor utilidad en el ámbito quirúrgico. Son la *Co-oximetría* y la *conductividad*.

Estos métodos son utilizados por los aparatos portátiles *Point-of-care-testing* (POCT) presentes en quirófano o en la unidad de cuidados postoperatorios, y nos permiten conocer la concentración de hemoglobina o hematocrito en pocos minutos. Tienen la ventaja de aportar información adicional sobre los valores de oxigenación de la sangre, electrolitos y estado ácido-base.

En nuestro centro disponemos de dos POCT:

1. El analizador *GEM®Premier 3000 (Instrumentation Laboratory, MA, USA)*, mide hematocrito por el método de la *conductividad* y se encuentra en el quirófano de cirugía cardíaca.
2. El analizador *ABL 800 FLEX (Radiometer, Brønshøj, Denmark)* mide hemoglobina por el método de la *co-oximetría* y se encuentra en la unidad de cuidados intensivos postoperatorios.

En el laboratorio central del hospital existe el analizador *COULTER®HMX Hematology Analyzer (Brea, CA, Estados Unidos)*. Mide la hemoglobina por el método fotométrico libre de cianuro y el hematocrito mediante impedancia eléctrica. Es el método de referencia en las medidas de laboratorio.

Es importante conocer la exactitud en el proceso de medida de estos POCT con respecto al método de referencia. La diferente metodología utilizada puede dar sesgos entre los valores de hemoglobina y hematocrito, resultando en una terapia transfusional incorrecta. Para evitar estos sesgos, es necesario conocer su probable origen, el grado de variación y la intensidad con la que cada fuente es capaz de contribuir al mismo.

Por ello, hemos decidido comparar en este trabajo los valores de hemoglobina y hematocrito obtenidos por los POCT con respecto a los obtenidos por el laboratorio central de nuestro hospital, el cual utiliza el método de medición

estandarizado a nivel internacional y cuyo valor de hemoglobina y/o hematocrito obtenido, es considerado como el “gold standard”.

Las mediciones se han realizado durante el intra y el postoperatorio de cirugía cardíaca con circulación extracorpórea (CEC), con el objetivo de detectar: (i) el sesgo que presentan los POCT con respecto al método de referencia, (ii) el porcentaje de desacuerdos clínicamente relevante entre los POCT y el de referencia , expresado en términos de índice de transfusión innecesaria.

3.- REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN BIBLIOGRÁFICA.

3.1.-INDICACIÓN TRANSFUSIONAL Y UMBRAL TRANSFUSIONAL.

La principal indicación de la transfusión de hematíes es prevenir la hipoxia tisular derivada de la anemia, además de reponer la volemia y proporcionar factores para la hemostasia.

A mediados del siglo XX, Adams y Lundy^{3,4} definieron el concepto de umbral transfusional. Establecieron la regla de los “10/30”, indicando que para asegurar un aporte de oxígeno a los tejidos es necesario como mínimo un valor de hemoglobina de 100g/L y de hematocrito de 30%. Esta teoría, que se ha mantenido durante casi 60 años, ha ido en declive en los últimos años, debido a los riesgos y efectos adversos asociados a la transfusión, así como a la falta de evidencia que demuestre sus beneficios sobre la oxigenación.

El estudio de otros parámetros fisiológicos relacionados con la oxigenación tisular, ha ido desplazando el valor de la hemoglobina y/o del hematocrito, como único valor trigger para la transfusión^{5,6}.

De esta forma, la decisión de transfundir o no en las situaciones intermedias, va a depender de la evaluación global del paciente, que incluye la saturación venosa de oxígeno, el consumo de oxígeno por parte de los tejidos, la capacidad de poner en marcha los mecanismos compensadores frente a la anemia en cada paciente, y la presencia de comorbilidad en forma de vasculopatía periférica severa, y estados agudos de distres respiratorio, SRIS, o enfermedad pulmonar crónica entre otros.

De la combinación de varios ensayos clínicos, estudios observacionales y series de casos, han surgido las recomendaciones para la terapia transfusional publicadas en 2006 por la ASA⁷.

Durante la cirugía cardíaca, se recomienda transfundir cuando el valor de la hemoglobina es inferior a 60g/L, y es innecesaria con niveles de Hemoglobina > 100g/L. Es razonable transfundir con cifras de Hemoglobina 70g/L, pero no hay un alto nivel de evidencia que avale este aspecto. (Nivel de evidencia IIa)⁸.

3.2.- RIESGOS Y EFECTOS ADVERSOS DE LA TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA.

Debido al aumento de la complejidad de las intervenciones de cirugía cardíaca y de la alta comorbilidad de los pacientes intervenidos, la transfusión sanguínea se produce hasta en un 50% de los casos⁹.

Aunque la transfusión sanguínea es cada vez más segura, no puede dejar de considerarse como un producto biológicamente activo con consecuencias nefastas para la salud del paciente, como la transmisión de enfermedades víricas, reacciones hemolíticas postransfusionales, respuestas inmunes en pacientes inmunodeprimidos, empeoramiento del SRIS, complicaciones neumológicas (TRALI) o toxicidad por citrato o hierro contenido en cada bolsa de hematíes.

El interés por conocer si la transfusión sanguínea aumenta la morbi-mortalidad a corto y largo plazo, ha dado lugar a un gran número de artículos de revisión y ensayos clínicos en la literatura.

Ceñiéndonos a los casos de cirugía cardíaca, Hébert en 1999¹⁰, y Murphy en 2007¹¹ estudiaron la relación entre la tasa de transfusión y el número de complicaciones en el postoperatorio. En el grupo de Hébert se encontró una mayor mortalidad durante el tiempo total de hospitalización en el grupo de pacientes a los que se les había aplicado una estrategia liberal –mantener una hemoglobina entre 100 y 120 g/L- frente a los que fueron tratado con un protocolo restrictivo, transfundiendo con Hemoglobina < 70g/L (28.1% vs 23.3%, $p = 0.05$), siendo los eventos isquémicos miocárdicos (2.9% vs 0.7%, $p = 0.02$) y el edema agudo de pulmón (10.7% vs 5.3%, $p < 0.01$) las principales causas de mortalidad.

Para prevenir estas complicaciones, existen estrategias que ayudan a identificar factores predictivos de riesgo transfusional. Los modelos predictivos ya publicados TRACK (2009)¹² y TRUST (2006)¹³ permiten calcular la probabilidad de que un paciente sometido a cirugía cardíaca pueda necesitar al menos la transfusión de un concentrado de hematíes.

En nuestro centro, Martínez A y colaboradores (2011)¹⁴, desarrollaron ($n=310$) y validaron externamente ($n=80$) un modelo predictivo parsimonioso -- SP_SinCEC -- , adaptado a los pacientes que son intervenidos de cirugía de revascularización

miocárdica sin circulación extracorpórea. Dicho modelo, presentó para la población de nuestro centro, un valor predictivo superior a los publicados anteriormente.

Disponer de modelos fiables tiene ventajas clínicas importantes: permite (i) valorar el impacto que ciertos predictores específicos ejercen sobre el riesgo; (ii) optimizar la asignación de medidas para el ahorro transfusional; (iii) informar objetivamente a los pacientes sobre el riesgo que presentan; (iv) apoyar posteriores ensayos clínicos como elemento de cribado, y en definitiva (v) facilitar el desarrollo continuado de actividades que mejoren la asistencia en el terreno de la medicina transfusional.

Los riesgos mencionados asociados a la disminución de los donantes de sangre, refuerza la necesidad de mejorar las estrategias de ahorro transfusional.

3.3.- LA HEMOGLOBINA.

La hemoglobina es el componente principal de los glóbulos rojos y su función es la de transportar el oxígeno desde los pulmones a los tejidos.

La hemoglobina posee la propiedad de unirse con el oxígeno y el anhídrido carbónico, haciendo de ella un transporte eficaz de los gases de la sangre.

Totalmente saturada, contiene alrededor de 1,34ml de oxígeno por gramo. La masa de eritrocitos de un adulto contiene 600g de hemoglobina, capaz de transportar 800ml de oxígeno.

En los capilares pulmonares existe una presión de oxígeno de 100mmHg, y el 95-98% de la hemoglobina se combina con el oxígeno. En los tejidos, la presión parcial del oxígeno desciende hasta 20mmHg, de forma que el oxígeno unido a la hemoglobina se disocia fácilmente de ella para poder ser utilizado por las células tisulares.

La hemoglobina es una proteína conjugada que consta de dos cadenas polipeptídicas de globina y 4 grupos “hem”. Cada grupo “hem” contiene un átomo de hierro ferroso. Localizado cerca de la superficie de la molécula, el grupo “hem” se combina de forma reversible con una molécula de oxígeno o de dióxido de carbono.

3.3.1.- COMPUESTOS DE LA HEMOGLOBINA.

Cuando el grupo “hem” se combina con distintas moléculas, da lugar a los compuestos de hemoglobina que conocemos:

- la *oxihemoglobina* (O_2Hb), cuando se une una molécula de oxígeno, permaneciendo el ión hierro en estado ferroso.
- la *metahemoglobina* (MetHb), cuando el ión hierro pasa a estado férrico, perdiendo la capacidad de transportar oxígeno. Además, desvía la curva de disociación del oxígeno hacia la izquierda, aumentando la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y entorpeciendo su liberación en los tejidos. La sangre con un alto porcentaje de Methb adopta color chocolate. Agentes reductores como el azul de metileno, pueden reconvertirla en hemoglobina.
- la *sulfohemoglobina* (SHb), cuando la hemoglobina oxidada reacciona con sulfuro de hidrógeno. No es capaz de transportar oxígeno, pero sí de combinarse con monóxido de carbono y formar carboxisulfohemoglobina. No existen agentes que la reduzcan a oxihemoglobina, y permanece en los eritrocitos hasta que se disgregan. En presencia de altos niveles, la sangre adopta un color malva.
- la *carboxihemoglobina* (COHb), cuando se combina con monóxido de carbono (CO). La afinidad de la hemoglobina por el CO es 210 veces mayor que por el oxígeno. En altas concentraciones, la sangre adopta un color rojo cereza.

La capacidad efectiva de transporte de oxígeno corresponde a la suma de O_2Hb y de *deoxihemoglobina*: ésta última es la fracción de hemoglobina no unida al

oxígeno. La que tiene valor para garantizar la correcta oxigenación tisular es la oxihemoglobina.

Los niveles de hemoglobina normal en sangre es de 130g/L para hombres y 120g/L para mujeres. Por debajo de estos niveles, hablamos de anemia, que puede a su vez, ser dividida en distintos niveles. Hablamos de anemia moderada un rango de Hemoglobina 70-100g/L y de anemia grave, cuando la Hemoglobina es inferior a 70g/L.

3.4.- EL HEMATOCRITO.

El hematocrito es el porcentaje de la sangre que corresponde a células sanguíneas. El hematocrito medio de los varones es del 42% mientras que el de las mujeres es aproximadamente del 38%¹⁵. Estos valores varían dependiendo de si la persona tiene o no anemia, el grado de actividad corporal y la altitud a la que resida.

3.5.- INTRODUCCIÓN HISTÓRICA DE LOS METODOS MEDICIÓN HEMATOMÉTRICA.

El comienzo de las técnicas de “cuento” de los elementos formes de la sangre se remonta a 1852 cuando Karl Vierdot publica tres artículos en la revista *Archives für Physiologie*¹⁶. A esta época, se remonta la aparición de los primeros *hemocitómetros*, cuyo objetivo era medir la riqueza de la sangre según su opacidad. Basándose en los estudios previos de Alfred Donné, que propuso la idea de que la concentración de grasa en la leche se debía a los glóbulos blanquecinos y opacos contenidos en ella, se postula la teoría de que en la sangre ocurre algo similar. A mayor opacidad de la sangre, mayor contenido en glóbulos rojos. William Hénocque describió en 1886 su hematoscopia basado en esta teoría.

Por esta misma época, comienza el interés por la *espectroscopia* para el análisis hematológico. La Ley de Lambert-Beer, describe la transmisión y absorción de la intensidad de la luz cuando incide en una muestra con un compuesto de concentración desconocida.

En 1860 Wilhem Preyer aplicó el análisis espectral en la determinación de la hemoglobina en sangre. Hacia 1880, se comienza a diseñar espectroscopios específicos para estos fines. También William Hénocque propone su hematoscopia mejorado con el uso de la *espectrofotometría*.

Los métodos *colorimétricos* comienzan su desarrollo en el siglo XIX. En 1854, Hermann Welcker compara una muestra de sangre de concentración de hemoglobina desconocida, con una escala de diluciones hasta hallar el “color” de la muestra de sangre problema.

Hasta 1930 no se hicieron las primeras mediciones del espectro de absorción del la sangre sin diluir. A partir de 1950, se utilizó el espectrómetro Beckamn para medir la hemoglobina y sus derivados. Desde este momento, la *espectrofotometría* se ha convertido hasta hoy, en el método de análisis más usado en investigaciones biológicas en el siglo XX.

La medición automatizada de glóbulos rojos se remonta a 1949 cuando Wallace Coulter desarrolló un contador de partículas basado en el principio de la *resistencia eléctrica o impedancia*.

En 1950 se publicó en la revista Blood una revisión sobre la *conductividad* eléctrica de la sangre y su relación con la concentración de eritrocitos¹⁷.

Sin embargo, el método de la *conductividad* para el cálculo del hematocrito no pudo ser utilizado a nivel clínico hasta 1960.

Desde entonces, se han ido desarrollando otros métodos de medición de partículas sanguíneas. En 1953, Parker y Horst describieron un analizador automático que utiliza el método de la *luz halógena*, para eritrocitos y leucocitos. En 1965, Katmentsky, introdujo dos nuevos principios para el análisis automático: *la espectrofotometría o medida de la absorción lumínica y la dispersión de luz o principio del fondo oscuro*.

En 1966 se introdujo el método de la *radiofrecuencia* y más recientemente, en 1980, se incorpora la medida de la *dispersión de luz láser*, transformándose en *citómetros de flujo*, cuya complejidad ha ido evolucionando, permitiendo la medición de otras propiedades de las células sanguíneas como tamaño y características del núcleo, así como su reacción ante el contacto con diferentes sustancias o marcadores. Otra de sus ventajas es la posibilidad de analizar un mayor número de células (de 10.000 a 50.000) de forma rápida y fiable.

Así, los analizadores hematológicos, utilizan una combinación de los principios de análisis descritos para poder obtener una información completa y precisa

3.6.- MÉTODOS DE MEDICIÓN DE LA HEMOGLOBINA.

La hemoglobina puede ser medida por diferentes métodos:

- Fotométricos o colorimétricos.
- Gasométricos.
- Químicos.
- Densitométricos.

El objetivo de este trabajo hará que nos centremos en el estudio de los métodos fotométricos como medida de la hemoglobina.

Los métodos fotométricos consisten en convertir la hemoglobina en oxihemoglobina o en alguno de sus compuestos. La medición se realiza comparando la muestra problema con un patrón estándar. El método de comparación puede ser visual o fotoeléctrico. Éste último es el más exacto.

3.6.1.-Espectrofotometría:

Se define *espectrofotometría* a la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación, y las características de la sustancia absorbente.

La espectrofotometría nace a partir del año 1600, pero alcanzó su mayor expresión en 1760 gracias a los estudios de Lambert, y que fue continuada por Beer en 1852.

Sus experimentos demostraron que al hacer incidir un haz de luz monocromática con una intensidad de radiación conocida sobre un compuesto, la intensidad de la luz transmitida siempre sería menor que la inicial, ya que el compuesto absorbe parte de la radiación monocromática.

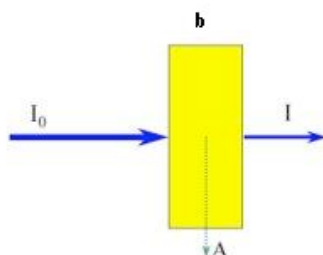


Figura 1. Absorción de la intensidad de la luz. I_0 = intensidad de la luz incidente.
 I = intensidad de la luz transmitida. A = absorbancia del compuesto.

Como consecuencia de interacciones entre los fotones y las partículas absorbentes, la intensidad del haz es atenuada. La *transmitancia* “ T ” de la solución es una fracción de la radiación incidente.

$$T = I / I_0$$

En los siguientes experimentos, comprobaron que aumentando la concentración del compuesto, se producía un descenso exponencial de la energía transmitida. De forma que relacionaron la transmisión/absorción de la luz con una función logarítmica de la concentración de las moléculas que absorben en las soluciones.

$$A = -\log_{10} (I / I_0) = \epsilon \cdot c \cdot L$$

Donde A es la absorbancia medida, I_0 es la intensidad de la luz incidente a una determinada longitud de onda, I es la intensidad de la transmisión, L la longitud de ruta a través de la muestra, y c la concentración de las especies absorbentes. Para cada especie y longitud de onda, ϵ es una constante conocida como absorptividad molar o coeficiente de extinción. Esta constante es una propiedad fundamental molecular en un solvente dado, a una temperatura y presión particular.

A mediados del siglo XX se desarrolla la espectrofotometría para el estudio de la hemoglobina. La determinación fotométrica de un compuesto estable de la hemoglobina (cianohemoglobina) se convierte en el método de referencia. Desde entonces, éste y otros métodos se han ido desarrollando e incorporando a los nuevos analizadores¹⁸.

A continuación, estudiaremos los métodos de uso más habitual para la medición de la hemoglobina: el método del *cianuro de hemoglobina (HiCN)* y el método de la *Co-Oximetría*).

3.6.1.a.- Método de cianuro de hemoglobina (HiCN)

El método de la HiCN fue propuesto en 1961 por Van Kampen y Zijlstra¹⁹ como procedimiento para la estandarización de la hemoglobina. Posteriormente, en 1965, Cannan²⁰ propone el uso de una solución de referencia para HiCN como un método exacto y preciso.

Finalmente es en 1967²¹ cuando el Comité Internacional de Estandarización de Hematología (ICSH) recomienda el método de la HiCN y se procede a la elaboración de un patrón de HiCN de referencia. En 1982 el patrón HiCN de referencia fue considerado como “Patrón de Referencia Internacional” por la OMS, persistiendo esta recomendación hasta nuestros días.

El principio de este método consiste en convertir la hemoglobina en HiCN mediante la adición de cianuro potásico y ferrocianuro. De esta forma se consigue un compuesto estable que presenta un pico máximo de absorbancia a 540nm y el cual sigue la Ley de Lambert-Beer.

La absorbancia de la muestra se compara con una solución de HiCN estandarizada, de concentración y absorbancia conocida.

Presenta varias ventajas: (i) ofrece una buena exactitud ya que utiliza una solución estándar internacional que está validada por el ICSH, (ii) a excepción de la sulfohemoglobina, el resto de las fracciones de la hemoglobina pueden ser determinadas. Pero por otro lado, las proteínas plasmáticas, el recuento de leucocitos, los lípidos y la bilirrubina puede producir turbidez en la muestra y

alterar la medición por este método²². Además, el reactivo cianuro es tóxico, y se ha considerado como un riesgo potencial.

Por eso, se han propuesto reactivos alternativos como la *azida sódica*²³ y el *lauril sulfato sódico* que convierten la hemoglobina en azidahemoglobina y en sulfato de hemoglobina respectivamente²⁴. Presentan la principal ventaja de ser menos tóxicos.

3.6.1.b.- Método de la Co-oximetría.

La Co-oximetría se basa en una técnica espectrofotométrica en la cual la hemoglobina y sus fracciones presentan picos de absorbancia a longitudes de onda específicos, y siguen la Ley de Lambert-Beer.

Cuando una muestra sanguínea se envía a analizar a un Co-oxímetro, la hemoglobina es liberada del interior de los hematíes por agentes físicos o químicos integrados en el aparato. La absorbancia de esa hemoglobina a distintas longitudes de onda, y a partir de calcular los resultados obtenidos por medio de un software, se obtiene el valor de la concentración de cada una de las fracciones de la hemoglobina¹⁸.

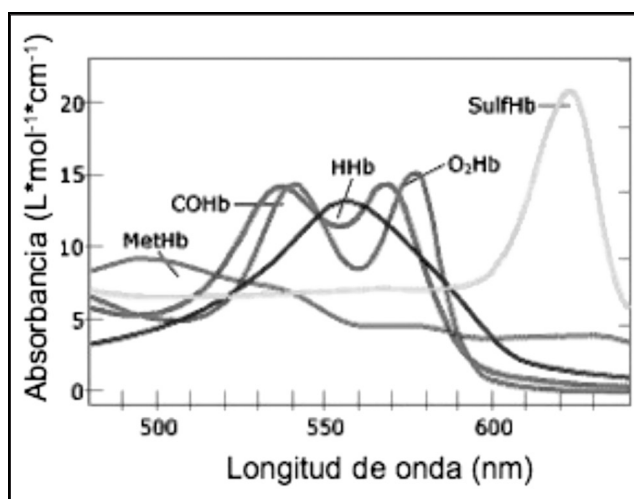


Figura 2. Curva de absorbancia característica de cada derivado de la hemoglobina.

La hemoglobina total es calculada a través de la suma de los derivados.

Esta técnica ofrece la ventaja de rapidez, fácil manejo, precisar un pequeño volume de muestra, permitir el estudio de los gases en sangre, y no se ve afectada por la presencia de leucocitosis o hiperbilirrubinemia. Sin embargo, la turbidez producida por la hiperlipidemia, sí que parece tener una repercusión significativa en el estudio de la Co-oximetría.

3.7.- MÉTODOS DE MEDICIÓN DEL HEMATOCRITO.

El recuento de eritrocitos puede llevarse a cabo mediante tres sistemas²⁵.

- centrifugación
- principio Coulter o de impedancia eléctrica.
- conductividad

3.7.1.- Centrifugación.

Este método continúa siendo el “gold estándar” en los laboratorios. Consiste en centrifugar a alta velocidad la muestra sanguínea, con lo que se consigue separar la sangre total en tres capas: una superficial, de plasma, una intermedia que contiene plaquetas y células blancas, y una inferior, que contiene los glóbulos rojos. El espesor de ésta última capa es lo que se traduce en hematocrito.

3.7.2.- Principio Coulter o de Impedancia eléctrica.

Este método fue descrito por Wallace Coulter en 1956. Las células sanguíneas son utilizadas para interrumpir una corriente que pasa entre dos electrodos. La señal producida es detectada y analizada. Las células sanguíneas cuyas membranas lipídicas son “no conductoras”, presentan una resistencia elevada y se comportan como aislantes de cara a una corriente eléctrica de baja frecuencia. La descripción es extraída de la presentación original de Wallace Coulter en la conferencia nacional de electrónica (EEUU 1958): “una suspensión muy diluida de células es contenida en un vaso E donde hemos inmerso un electrodo D. Un tubo B contiene un orificio A muy pequeño a través del cual un volumen exactamente definido de esta suspensión es aspirado. El segundo electrodo C es inmerso en este tubo. Cada vez que una célula sanguínea pasa a través del orificio A, provoca un impulso

(relacionado al aumento temporal de la resistencia) cuya amplitud depende de la talla de la célula. Los impulsos son contados y sus amplitudes medidas. Conociendo el volumen de suspensión aspirado y la relación inicial de dilución, podemos deducir el número de células en un volumen de sangre dado y la medida de sus tallas. El hematocrito puede igualmente ser calculado”.

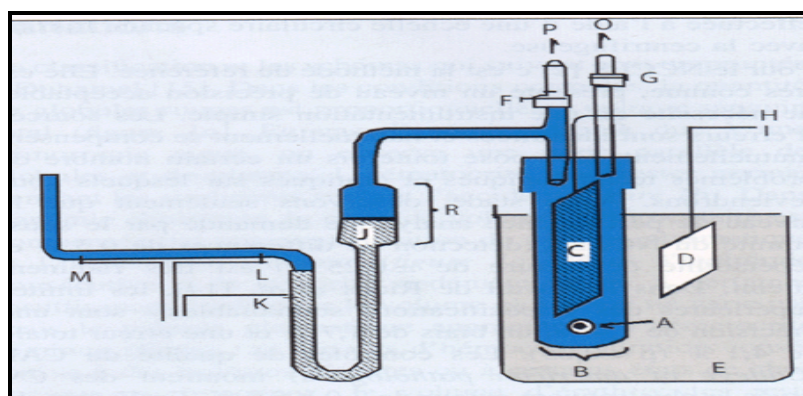


Figura 3. Método de medición del hematocrito mediante impedancia eléctrica. A= orificio a través del cual pasa una célula sanguínea. B= tubo que aspira un volume pequeño de la muestra sanguínea diluida. C= Electrodo. D= Electrodo. E= vaso dónde se deposita la muestra.

El contador Coulter (Coulter Electronic), ahora conocido como *COULTER® HmX Hematology Analyzer* fue ampliamente aceptado por los laboratorios para el conteaje celular. Pronto se pudo comprobar que aportaba más información sobre medidas y talla celular que los métodos disponibles hasta ese momento.

3.7.3.- Conductividad

Esta técnica fue descrita inicialmente en 1948-1950, mejorada y perfeccionada en 1950-56. Utiliza el mismo principio que el método Coulter pero da una aproximación global y “no celular”.

La conductividad es la habilidad de un fluido para permitir el paso de una corriente eléctrica a través de ella.

El principio de la medición del hematocrito por medio de la *conductividad* se basa en que la conductividad de la sangre a bajas frecuencias (inferior a 100KHz) depende de la membrana de los glóbulos rojos (no conductora), la conductividad

del plasma, y de la forma y orientación de los eritrocitos. Dado que las bajas frecuencias ($< 100\text{KHz}$) no atraviesan las membranas eritrocitarias, cuanto mayor número de glóbulos rojos (y por tanto, mayor hematocrito), menor será la conductividad del plasma. En este contexto, los cambios osmóticos producidos por una menor concentración de proteínas plasmáticas como ocurre tras una hemodilución, permiten un mayor paso de la corriente eléctrica, es decir, mayor conductividad del plasma, y por tanto, un menor hematocrito²⁶.

Viceversa ocurre con los incrementos osmóticos del plasma con partículas no conductoras: disminuyen la conductividad y el valor del hematocrito será mayor. Es lo que ocurre con la administración de coloides o la leucocitosis²⁷.

Se considera un método de referencia útil en la mayoría de situaciones fisiológicas, pero que se ve afectado cuando existen alteraciones de electrolitos (principalmente el sodio) y de la concentración de proteínas²⁸ como suele ocurrir tras la uso de expansores plasmáticos, el uso de anticoagulantes o con el aumento del recuento de glóbulos blancos²⁶.

La administración de algunos anticoagulantes también tiene efectos indeseables en la medición del hematocrito al modificar la morfología celular debido a cambios osmóticos. Gotch et al demostraron que la administración de distintas dosis de heparina inducía cambios significativos en la determinación por conductividad del hematocrito²⁹.

Es el método utilizado en la mayoría de los analizadores portátiles o POCT.

3.8.- ANALIZADORES “POINT-OF-CARE TESTING”.

Desde la última década, cada vez hay más monitores de los llamados “point-of-care testing” o de “cabecera del paciente”. Son analizadores portátiles, que ocupan poco espacio y que se encuentran dentro de quirófano y en las unidades de cuidados postoperatorios.

Estos monitores están destinados a obtener de forma rápida y veraz el valor de una gran variedad de parámetros: los electrolitos sanguíneos (K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{++}), los valores de hemoglobina y/o hematocrito, los valores de oxigenación de la sangre (pH, pO_2 , pCO_2 , HCO_3^- , EB), lactatos y glucosa.

Su ventaja es la de necesitar una mínima extracción de sangre, sin necesidad de transportar la muestra al laboratorio central del hospital, agilizando de esta forma, la toma de decisiones, para proveer un cuidado rápido pero seguro.

En los quirófanos de cirugía cardíaca de nuestro centro disponemos de un analizador portátil **GEM® Premier 3000** (Instrumentation Laboratory, USA) que determina gasometría arterial, análisis de electrolitos (Na^+ , K^+ , Ca^{++}), glucosa plasmática y Hb calculada a partir de la medición del hematocrito ($Hb = Hto \times 0.31$), medido por *conductividad eléctrica*.



Imagen 1. GEM® Premier 3000 (Instrumentation Laboratory, USA).

En el área de cuidados postoperatorios, el analizador presente es el **ABL 800 FLEX** (Radiometer, Denmark), que aporta informa información sobre valores de gases en sangre, estado ácido-base, electrolitos (Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca⁺⁺ iónico), los metabolitos glucosa y lactato, así como de saturación arterial de oxígeno y hemoglobina. Su metodología para la medición de la hemoglobina es *laco-oximetría*.



Imagen 2. ABL 800 FLEX (Radiometer, Denmark)

En el laboratorio central de nuestro hospital, se dispone del analizador **COULTER® HmX Hematology Analyzer**, cuyos valores obtenidos utilizamos como referencia. Además del valor de la hemoglobina, también aporta el valor de hematocrito, y características de los hematíes (RBC, VCM, HCM, CHCM, RDW, recuento total de glóbulos blancos y fórmula leucocitaria). Los cálculos se realizan a partir del principio de impedancia eléctrica para el conteo de células y método fotométrico libre de cianuro para medición de hemoglobina.



Imagen 3. COULTER® HmX Hematology Analyzer. (Beckman-Coulter, Inc).

El *COULTER® HmX Hematology Analyzer* inicialmente convierte la hemoglobina en un compuesto hemoglobínico libre de cianuro pero que presenta un espectro de absorbancia casi idéntico a la ciano-methemoglobina. Los resultados son comparables con el método de la ciano-methemoglobina.

Sus ventajas frente a los POCT es que es un analizador automatizado que se calibra diariamente de forma manual y automática. Su sistema de medición de la hemoglobina, no se ve alterado por la hemodilución y otros factores como la presencia de leucocitos o de bilirrubina en la muestra.

4.- HIPÓTESIS:

Las diferencias sistemáticas entre los métodos de medición de las máquinas Point-of-Care Testing (POCT) presentes en el quirófano de cirugía cardíaca y en el área de cuidados postoperatorios de nuestro centro, con respecto al laboratorio central, pueden inducir a un exceso o a un defecto en la indicación de la transfusión sanguínea.

5.- OBJETIVOS:

Objetivos principales:

(1): medir el grado de acuerdo, y el posible sesgo entre los valores proporcionados por los dos analizadores POCT (*GEM®Premier 3000*, y *ABL 800 FLEX*) de uso habitual en el quirófano de cirugía cardíaca y en el área de cuidados postoperatorios , y el analizador COULTER® HmX Hematology Analyzer , presente en el laboratorio de nuestro centro, considerado como valor de referencia.

(2): medir la validez de los POCT, *GEM®Premier 3000*, y *ABL 800 FLEX* para identificar correctamente el umbral transfusional tomando como valor de referencia el proporcionado por el laboratorio de nuestro centro.

6.- MATERIAL Y MÉTODO:

6.1. DISEÑO.

Desde Junio a Octubre 2008, obtuvimos de forma prospectiva, muestras de sangre procedentes de la cánula arterial radial de 58 pacientes intervenidos de cirugía cardíaca con circulación extracorpórea.

6.1.1.Sujetos estudiados:

Todos los pacientes intervenidos de cirugía cardíaca durante los meses mencionados fueron incluidos en el estudio. Posteriormente, los pacientes ingresaron en la unidad de cuidados intensivos dedicada a éste tipo de pacientes y coordinada por el servicio de Anestesiología y Reanimación de nuestro centro.

A las 48h, si no surgió ninguna complicación postoperatoria, los pacientes se trasladaron a la planta del servicio de Cirugía Cardíaca o al servicio de Cardiología para el control evolutivo.

6.1.2.Técnica quirúrgica:

La cirugía se llevó a cabo bajo anestesia general balanceada con sevoflurano. La analgesia se realizó con remifentanilo en perfusión continua a dosis entre 0.1-0.2mcg/kg/m. La relajación muscular se realizó con rocuronio a dosis 0.6mg/kg en la inducción. Como tratamiento fibrinolítico se utilizó bolus y perfusión de ácido tranexámico según el protocolo utilizado en el centro. Se administró un bolus de fentanilo 2mcg/kg al final de la intervención. Se mantuvo hipotermia moderada de 34°C en todos los pacientes. Los circuitos y oxigenadores fueron los biocompatibles habituales (Oxigenador de membrana adulto, CompactFlow EVO Dideco). Para el purgado del circuito de CEC, se utilizó una solución basada en 500ml de solución Hartman, 500ml de solución Heloes, y 250 ml de manitol 20%. El flujo en CEC se mantuvo de 2,0 a 2,4 L/min/m².

La anticoagulación se estableció con heparina sódica hasta alcanzar y mantener un valor objetivo de tiempo de coagulación de activado (TCA) de 450 segundos según

el procedimiento habitual. Al final de la intervención, se revirtió con sulfato de protamina para conseguir el valor inicial.

El umbral transfusional durante la CEC fue un hematocrito < 20% ó un valor de hemoglobina < 60g/L medido en el *GEM®Premier 3000*. Una vez terminada la CEC, el umbral transfusional es hematocrito <24% o hemoglobina < 80g/L, medido en el mismo analizador. En la unidad de cuidados postoperatorios, el umbral transfusional fue un valor de hematocrito < 24% o hemoglobina < 80g/L medido en el analizador de la unidad, el *ABL 800 FLEX*.

6.1.3.-Muestra:

Las muestras fueron recogidas en dos tiempos. En un primer momento (T_1), con el paciente sedado antes de la intervención quirúrgica. Bajo infiltración subcutánea con anestesia local, se canalizó una cánula en la arteria radial o femoral, y se extrajo una muestra sanguínea antes de la infusión de líquidos. De esa muestra, 3ml fueron introducidos en un tubo BD Vacutainer® y enviado inmediatamente al laboratorio central. Otros 2 ml fueron introducidos en una jeringa de gases QUICK A.B.S. y se enviaron al analizador de la unidad de cuidados postoperatorios, el *ABL 800 FLEX*. Y otros 2ml fueron introducidos en una jeringa de gases QUICK A.B.S. y analizadas en la máquina *GEM®Premier 3000* presente en quirófano.

La segunda muestra (T_2) fue recogida antes del cierre de la esternotomía, una vez terminada la CEC y realizada la revision hemostática, siendo el momento en el que no se esperan más pérdidas sanguíneas relacionadas directamente con la cirugía. El método de recogida fue idéntico al descrito anteriormente.

6.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

6.2.1. Medición de la reproducibilidad o grado de acuerdo entre las máquinas.

(i) detección del sesgo sistemático.

Para detectar los sesgos sistemáticos que existen durante la determinación de una variable continua, como la hemoglobina o el hematocrito, con una técnica de medición respecto a otra considerada de referencia, hemos utilizado el método de la estimación de la recta de regresión de Passing-Bablok. De esta forma, consideramos la variable “Y” como una determinación de hemoglobina o de hematocrito obtenido por la máquina de referencia, y “X” al valor de hemoglobina obtenido por la máquina a estudio. Si ambos valores fueran idénticos, la relación entre ambos vendría dada por la ecuación “ $Y = X$ ”. Pero si existe una diferencia, entonces, se puede utilizar la función lineal “ $Y = \alpha + \beta X$ ” para estimar “Y”.

En esta relación, consideramos “ α ” como el *error sistemático constante*, de forma que los dos métodos presentan diferencias de tipo constante si el intervalo de confianza 95% de “ α ” no incluye al valor 0.

El valor “ β ” representa el *error sistemático proporcional*. Los dos métodos presentarán diferencias de tipo proporcional cuando el intervalo de confianza 95% de “ β ” no incluye al valor 1.

Si $\alpha = 0$ y $\beta = 1$, la ecuación se transforma en la igualdad $X = Y$ e indica que los dos métodos miden igual.

(ii) detección del acuerdo absoluto:

Para calcular el acuerdo absoluto de los valores medidos por las distintas máquinas a estudio sobre un mismo parámetro (hemoglobina/hematocrito) con respecto al valor obtenido por la máquina de referencia, se ha utilizado el coeficiente de acuerdo propuesto por Lin³⁰.

(iii) detección del porcentaje de desacuerdos:

Para conocer el porcentaje de desacuerdos entre los POCT y el laboratorio de referencia, considerando clínicamente relevante cuando la diferencia entre los valores de hemoglobina es mayor de 5g/L y la del hematocrito supera el 2%, se ha utilizado el método propuesto por Luiz et al, basado en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier³¹. De forma que las diferencias en valor absoluto entre cada medida del POCT y la máquina de referencia, se consideran eventos o tiempos de fallo, de manera que pueden obtenerse las probabilidades de ocurrencia de los eventos en función del grado de desacuerdo.

6.2.2. Medida de la validez de las diferentes máquinas.

Para medir la validez de los distintos POCT, se ha contabilizado y comparado el número de casos detectados por encima y por debajo del umbral transfusional con cada uno de los POCT, con respecto a los valores dados por la máquina de referencia.

Los errores en la indicación de transfusión, debidos a las diferencias en el valor de hemoglobina o de hematocrito obtenido entre los POCT y el analizador de referencia, se han considerado como falsos positivos y falsos negativos.

Los **falsos positivos** han sido aquellas muestras sanguíneas, que presentan un valor de hemoglobina o de hematocrito superior al del umbral transfusional medido en el analizador de referencia, pero inferior a dicho umbral cuando fue medido en alguno de los POCT, provocando un aumento de transfusión sanguínea innecesaria.

Los **falsos negativos** han sido aquellas muestras sanguíneas que al ser medidas por los POCT mostraban un valor de hemoglobina o hematocrito superior al umbral transfusional, pero sin embargo, al medirlo en el aparato de referencia, el valor era inferior a dicho umbral, impidiendo por tanto, una transfusión sanguínea que sería necesaria.

7.- RESULTADOS:

7.1.- Estimación de sesgo entre los POCT y COULTER® HmX Hematology Analyzer.

Las figuras 1, 2, 3 y 4 muestran las diferencias observadas entre los valores de hemoglobina obtenidas por los aparatos *GEM®Premier 3000* y *ABL 800 FLEX* y la máquina de referencia COULTER® HmX antes de la administración de líquidos (T₁) y antes del cierre del tórax (T₂).

En la figura 1 observamos -mediante la recta de regresión-, que antes de la administración de líquidos (T₁), los valores de hemoglobina no presentan diferencias sistemáticas entre *GEM®Premier 3000* y COULTER® HmX el IC 95% de la constante α incluye el valor 0. La pendiente β de las rectas de regresión no difiere estadísticamente de 1 -su IC 95% incluye el valor 1- lo que indica que tampoco existen diferencias de tipo proporcional entre las máquinas evaluadas.

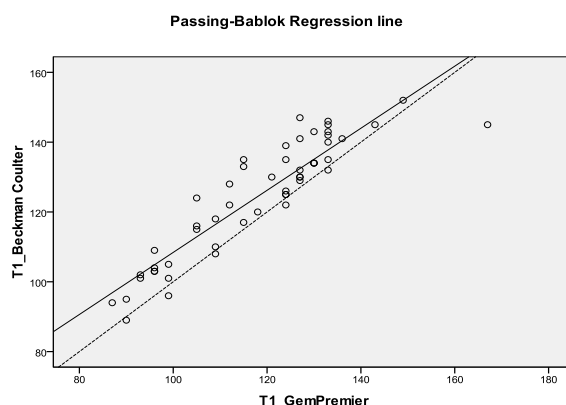


FIGURA 1.- Comparación de los valores de hemoglobina entre el *GEM®Premier 3000* y COULTER® HmX en el momento T₁, antes de la administración de líquidos. Recta de regresión ($Y=\alpha+\beta X$). $\alpha = 4,18$ (IC 95%: -8,47-17,86). $\beta = 1,02$ (IC 95%: 0,89 a 1,35). Test de linealidad $> 0,2$. Coef. Lin (acuerdo absoluto) = 0,85.

Lo mismo muestra la Figura 2, al comparar *ABL 800 FLEX* y COULTER® HmX antes de la administración de líquidos (T₁).

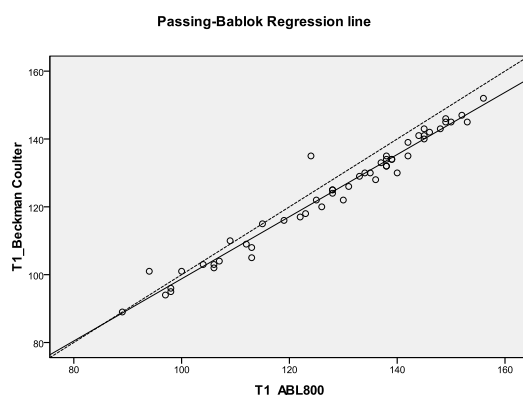


FIGURA 2. Comparación de valores de hemoglobina entre ABL 800 FLEX y COULTER® HmX en el momento T₁. Recta de regresión ($Y=\alpha+\beta X$). $\alpha = 1,83$ (IC 95%: -4,13 a 8,00). $\beta = 0,96$ (IC 95%: 0,92 a 1,00). Test de Linealidad $p > 0,20$. Coeficiente de Lin = 0,96.

Sin embargo, al comparar los valores de hemoglobina de GEM®Premier 3000 y COULTER® HmX en el momento T₂ (Figura 3), la constante $\alpha = 13$ muestra valores significativamente diferentes de 0, indicando que el POCT infraestima sistemáticamente el valor de la hemoglobina 13g/dL con respecto a la máquina de referencia.

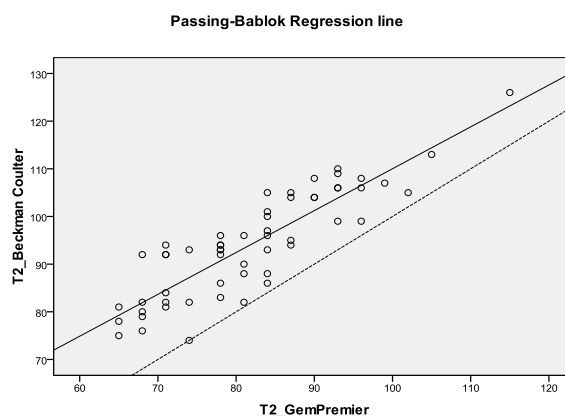


FIGURA 3. Comparación de valores de hemoglobina entre GEM®Premier 3000 y COULTER® HmX en el momento T₂. Recta de regresión ($Y=\alpha+\beta X$) $\alpha = 13$ (IC 95% : 1,63 a 27,63). $\beta = 1,0$ (IC 95%: 0,82 a 1,14). Test de linealidad $p < 0,05$. Coef. De Lin = 0,54.

En cambio, al comparar los resultados de hemoglobina del dispositivo ABL 800 FLEX y COULTER® HmX en el momento T₂ (Figura 4), no se obtienen diferencias significativas.

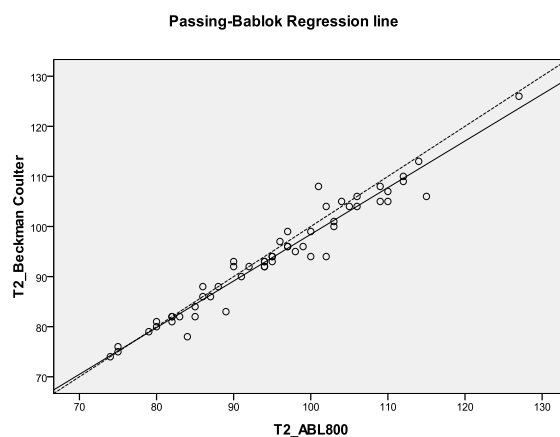


FIGURA 4. Comparación entre valores de hemoglobina de ABL 800 FLEX y COULTER® HmX en el momento T₂. ($Y=\alpha+\beta X$). $\alpha=3,75$ (IC 95%: -1,00 a 7,97). $\beta=0,95$ (IC 95%: 0,90 a 1,00). Test de linealidad $p < 0,20$. Coeficiente de Lin: 0,97.

En cambio, al comparar los resultados de hemoglobina del dispositivo ABL 800 FLEX y COULTER® HmX en el momento T₂, las diferencias halladas no son de tipo constante. (Figura 4).

Las figuras 5 y 6 muestran el resultado del análisis para el estudio de los valores de hematocrito entre GEM®Premier 3000 y COULTER® HmX.

En el momento T₁ (figura 5), no se observan diferencias de tipo constante entre ambas máquinas.

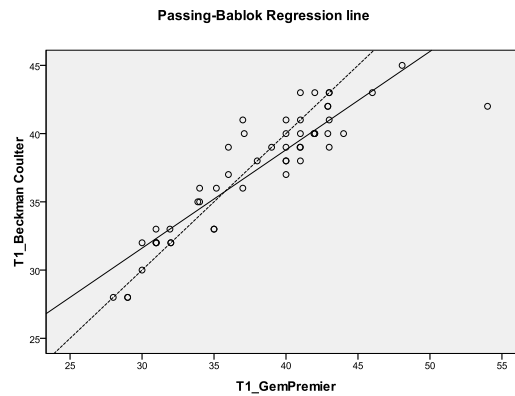


FIGURA 5: comparación de los valores de hematocrito entre el GEM®Premier 3000 y COULTER® HmX en T_1. ($Y=\alpha+\beta X$). $\alpha = 3,0$ (95%IC: 0,0 a 8,75). $\beta = 0,83$ (95%IC: 0,75 a 1,0). Test de linealidad $p > 0,20$. Coef Lin = 0,87.

Pero en cambio en T_2 (Figura 6), GEM®Premier 3000 infraestima sistemáticamente los valores de hematocrito con respecto a COULTER® HmX, siendo $\alpha = 2$ (IC 95%: 2 a 6,07) el valor medio constante de las diferencias entre ambas máquinas.

Por su parte, el analizador ABL 800 FLEX, no ofrece valores de hematocrito.

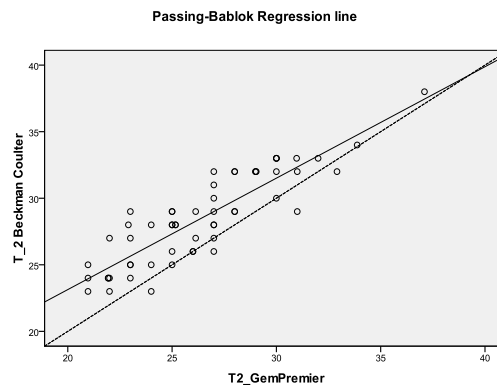


FIGURA 6: Comparación de los valores de hematocrito entre GEM®Premier 3000 y COULTER® HmX en T_2. ($Y=\alpha+\beta X$). $\alpha = 2,0$ (95%IC: 2 a 6,07). $\beta = 1,0$ (95%IC: 0,86 a 1,00). Test de linealidad $p < 0,01$. Coef Lin = 0,74.

7.2.- Estimación de acuerdos absolutos entre POCT y Beckman-Coulter.

Para evaluar la reproducibilidad de las mediciones de los valores de hemoglobina y de hematocrito dados por los analizadores portátiles y el de referencia, se ha utilizado el coeficiente propuesto por Lin. Este coeficiente gradúa la concordancia en “casi perfecta”, “sustancial”, “moderada” y “pobre” cuando los valores son $>0,99$, $0,95-0,99$, $0,90-0,95$, e $< 0,90$ respectivamente.

En T_1 (Figura 1 y 2), el *GEM®Premier 3000* presenta una concordancia “pobre” con el COULTER® HmX (coeficiente Lin 0,84).

Por el contrario, esta concordancia es “sustancial” en el caso del *ABL 800 FLEX* (coef Lin 0,96).

En T_2, (Figura 3), la concordancia entre *GEM®Premier 3000* y el COULTER® HmX también es “pobre” presentando un coeficiente de Lin de 0,54.

Sin embargo, en este mismo momento, la concordancia entre el *ABL 800 FLEX* y el COULTER® HmX sigue siendo “sustancial” con un coeficiente de Lin de 0,96. (Figura 4).

Al comparar el valor de hematocrito entre *GEM®Premier 3000* y COULTER® HmX en T_1, (Figura 5) el acuerdo absoluto es “pobre” (coef Lin 0,87). Al compararlos en T_2 (Figura 6), el desacuerdo es mayor que en el momento inicial, (coeficiente de Lin 0,74).

7.3.- Estimación de los desacuerdos relevantes entre POCT y COULTER® HmX Hematology Analyzer.

Para medir la probabilidad acumulada de encontrar desacuerdos clínicamente relevantes entre cada uno de los analizadores portátiles y el de referencia, hemos utilizado – a modo gráfico-, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. La comparación de los resultados de hemoglobina de las distintas máquinas frente a

la de referencia en los momentos, T₁ y T₂ se presentan en las figuras 7 y 8 respectivamente.

En ambos momentos, se consideró como clínicamente relevante una diferencia entre las medidas igual o superior a 5g/L.

En T₁, (Figura 7) la proporción de desacuerdos presentados por el *GEM®Premier 3000* respecto al *COULTER® HmX* se aproxima al 60%. Este valor es mayor que cuando comparamos el *ABL 800 FLEX* que apenas presenta un 21% de desacuerdos. Si fuéramos más estrictos respecto al punto de corte, y buscáramos diferencias superiores a 3g/dL, alcanzaríamos porcentajes de desacuerdos > 80% con las dos máquinas.

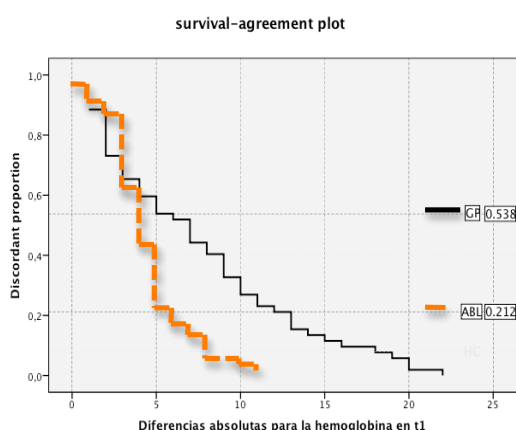


Figura 7.- Proporción de desacuerdos clínicamente relevantes entre los niveles de hemoglobina calculados por *GEM®Premier 3000*, *ABL 800 FLEX*, y la máquina de referencia del hospital (Beckman-Coulter). Las diferencias $\geq 5\text{g/L}$ entre las máquinas, se consideran clínicamente relevantes. T₁: antes de la administración de líquidos.

La figura 8, representa el porcentaje de desacuerdos cuando medimos la hemoglobina en el momento T₂, antes del cierre del tórax. El porcentaje de desacuerdos entre *GEM®Premier 3000* y la máquina de referencia es del 87,5%. Para el *ABL 800 FLEX*, el porcentaje de desacuerdos no alcanza el 20%.

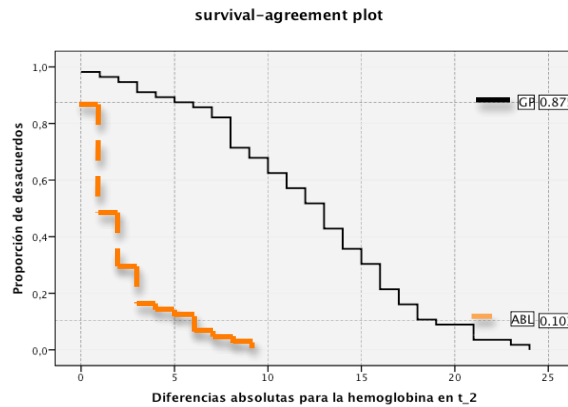


Figura 8.- Proporción de desacuerdos clínicamente relevantes entre los niveles de hemoglobina calculados por GEM®Premier 3000, ABL 800 FLEX, y la máquina de referencia del hospital (COULTER® HmX). Las diferencias $\geq 5\text{g/L}$ entre las máquinas, se consideran clínicamente relevantes. T₂: antes de la administración de líquidos.

La figura 9, representa el porcentaje de desacuerdos entre GEM®Premier 3000 y la máquina de referencia cuando medimos el hematocrito. Tomando como relevante una diferencia entre ambas medidas superior a 2%, en T₁ el porcentaje de desacuerdos se aproxima al 20%. Para la misma diferencia, los desacuerdos superan el 40% en el momento previo al cierre de tórax en T₂.

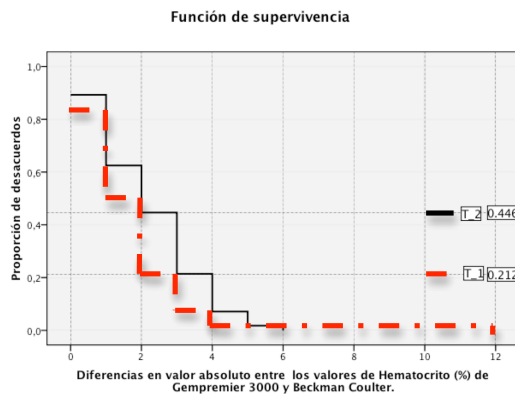


Figura 9.- Proporción de desacuerdos clínicamente relevantes entre los niveles de hematocrito calculados por GEM®Premier 3000 y la máquina de referencia del hospital (COULTER® HmX) en el momento. T₁: antes de la administración de líquidos. T₂: antes del cierre de tórax. Un valor $\geq 2\%$ fue considerado clínicamente relevante.

7.4.- Validez de los POC para detectar el umbral transfusional con respecto al COULTER® HmX Hematology Analyzer.

La tabla 1 muestra la distribución de los pacientes en función de si alcanzaron o no el umbral transfusional (hemoglobina < 80g/L) según los analizadores POC y el sistema de referencia. Consideramos los valores obtenidos en el momento T₂.

Encontramos que *GEM®Premier 3000* encontró a 26 de los 58 pacientes que alcanzaran el umbral transfusional, de los cuales sólo 5 de los 58 presentaban una hemoglobina < 8g/dL según la máquina de referencia. Es decir, *GEM®Premier 3000* mostró por lo tanto un 39,6% de falsos positivos, mientras que *ABL 800 FLEX* no mostró ninguno.

	<i>GEM®Premier 3000</i>		<i>ABL 800 FLEX</i>	
	≥ 80 g/L	< 80 g/L	≥ 80 g/L	< 80 g/L
COULTER® HmX ≥ 80g/L	32	21	53	0
COULTER® HmX < 80g/L	0	5	1	4

Tabla 1.- Distribución de los valores de hemoglobina obtenidos por los POCT y el sistema de referencia en el momento T₂: antes del cierre de tórax. Consideramos el valor de hemoglobina < 80g/L como umbral para la transfusión

En la tabla 2 se representan la distribución de los pacientes, cuando se mide el hematocrito. El *GEM®Premier 3000* detectó que 16 de los 58 pacientes alcanzaban el umbral transfusional, aunque sólo 3 lo presentaban según la máquina de referencia. Presenta un 23,6% de falsos positivos.

	<i>GEM®Premier 3000</i>	
	≥ 24%	< 24%
COULTER® HmX ≥ 24%	42	13
COULTER® HmX < 24%	0	3

Tabla 2.- Distribución de los valores de hematocrito obtenidos por el *GEM®Premier 3000* y el sistema de referencia en el momento T₂: antes del cierre de tórax. Consideramos el valor de hematocrito <2% como umbral para la transfusión.

8.- DISCUSIÓN.

Los analizadores “point-of-care” permiten conocer de forma rápida distintos parámetros sanguíneos, como el estado de oxigenación de la sangre, el valor de distintos electrolitos, y los valores de hemoglobina y /o hematocrito.

Lo anterior, añadido a la pequeña cantidad de sangre requerida para una determinación, y su bajo coste, hace que su presencia sea cada vez mayor en los quirófanos y en las unidades de cuidados postoperatorios.

Durante la cirugía cardíaca y en las primeras horas postoperatorias, se presentan situaciones de sangrado importante. La decisión de transfundir concentrados de hematíes está condicionada, entre otros parámetros, por la concentración sanguínea de hemoglobina y/o hematocrito.

En nuestro centro, el tiempo requerido para conocer los resultados de una muestra sanguínea enviada desde el quirófano al laboratorio es de 35 minutos aproximadamente. De esta manera, en situaciones de sangrado agudo, la decisión transfusional se retrasa, pudiendo presentarse una situación de inestabilidad hemodinámica e hipoxemia tisular.

Por lo tanto, con el fin de agilizar estas decisiones, utilizamos los analizadores POCT que tenemos disponibles en nuestros quirófanos, el *GEM®Premier 3000*, y en la unidad de cuidados postoperatorios, el *ABL 800 FLEX*.

8.1.-Comparación GEM®Premier 3000y COULTER®HMX HematologyAnalyzer.

Los resultados del análisis, indican que el *GEM®Premier 3000* ubicado en el quirófano de cirugía cardíaca presenta un acuerdo pobre con respecto a la máquina de referencia del laboratorio de nuestro centro. Esto sucede tanto para los valores de hemoglobina como para los valores del hematocrito (coeficiente de Lin³⁰ 0,85 y 0,87 respectivamente). El nivel de acuerdo es más pobre aún en el momento T₂, cuando ya ha terminado la CEC y está a punto de terminar la cirugía (coeficiente de Lin 0,54 y 0,74 para hemoglobina y hematocrito respectivamente).

La medición efectuada en T₂ es muy importante, porque se corresponde con el momento en que se inicia el cierre de tórax, una vez realizada la revisión hemostática del paciente. Ya no se prevén más pérdidas sanguíneas y el objetivo de mantener una hemoglobina > 80g/L o hematocrito > 24% es requerido para asegurar la estabilidad hemodinámica.

Consideramos que las diferencias de los valores de **hemoglobina** medidas por las dos máquinas son clínicamente relevantes si son mayores a 5g/L³², ya que en un protocolo de transfusión de hematíes basado principalmente en cifras de hemoglobina, una diferencia mayor o igual a 5g/L cercanos al umbral transfusional, condicionaría la transfusión del paciente.

Por ejemplo, un protocolo considera necesario transfundir hematíes en un paciente estable si sus cifras de hemoglobina son inferiores a 80g/L. Si para este mismo paciente y ante una misma extracción de muestra sanguínea, un POCT ofrece una lectura de hemoglobina de 75g/L y el laboratorio de referencia ofrece una lectura de 80g/L, la lectura de la primera máquina induce erróneamente a la administración de hematíes (falso positivo).

Según nuestros datos, al comparar los resultados de **hemoglobina** del *GEM®Premier 3000* con los del aparato de referencia, el 53,8% de las mediciones superan esta diferencia de 5g/L en T₁, y el 87,5% lo superan en T₂.

En cuanto al **hematocrito**, se consideran relevantes las diferencias superiores a 2%^{33,34}.

Según nuestros datos, hemos encontrado en T₁, un porcentaje de desacuerdos relevantes del 21,2%, y en T₂, del 44,6%.

La importancia de esto radica en los errores de identificación del umbral transfusión al. Si *GEM®Premier 3000* ofrece valores de hematocrito inferiores a los valores detectados por la máquina de referencia, da lugar a decisiones transfusionales innecesarias.

En nuestro estudio, hasta un 39,6% de los pacientes hubieran sido transfundidos en exceso si nos hubiéramos basado exclusivamente en la lectura de hemoglobina realizada por el *GEM®Premier 3000* (falsos positivos). Si definimos el hematocrito como umbral transfusional, el porcentaje seguiría siendo excesivo aunque inferior (23,6%).

Al comparar el *GEM®Premier 3000* con el método de referencia, encontramos mayores similitudes con respecto al hematocrito que con respecto a la hemoglobina; menor sesgo, menor porcentaje de desacuerdos, y mejor identificación del umbral transfusional. Estos resultados se explican por el hecho de que *GEM®Premier 3000* calcula directamente el **hematocrito** por el método de la *conductividad*. Sin embargo, la hemoglobina la calcula a partir del valor del hematocrito, a través de un cálculo integrado en el aparato ($Hb\text{ g/dL} = Htc\text{ \%}/3.226$)³⁵.

De forma que la hemoglobina siempre presenta un error sistemático en cada medición.

En contraposición, el *Beckman-Coulter®HmX* mide la hemoglobina de forma *directa*, por medio de un método *fotométrico*, mientras que el hematocrito, lo mide por *impedancia eléctrica* para el recuento celular.

En la literatura, se ha estudiado en diversas ocasiones el *GEM®Premier 3000* durante cirugía cardíaca.

Steinfeld-Visscher J et al³⁶ hicieron un estudio prospectivo “in vivo” en 88 pacientes sometidos a CEC. Los valores de hematocrito fueron comparados entre el *GEM®Premier 3000* (conductividad) y el *Sysmex 2100* (CoulterCounter). Encontraron 55 muestras que tenían un hematocrito inferior al 20% cuando usaban el método de la conductividad, de las cuales, 37 tenían un hematocrito superior al 20% cuando utilizaban el método Coulter. Concluyeron que usando la conductividad, 67% de los 55 pacientes habrían recibido una transfusión sanguínea innecesaria.

Posteriormente en 2007, este mismo grupo de investigadores, analizaron en 55 muestras sanguíneas si el sesgo encontrado era diferente cuando se utilizaba una solución de cebado con cristaloides o coloides³⁷. Los hallazgos encontrados sugirieron que cuando la dilución se realizaba con coloides, se producía un sesgo “hacia arriba”, mientras que cuando se utilizaban cristaloides el sesgo es “hacia abajo” ($p < 0.05$) es decir, sobrevalorando e infravalorando respectivamente, los valores del hematocrito.

Los hallazgos de nuestro estudio son compatibles con los de Steinfeld-Visscher J³² en 2006. Aunque no hemos definido el umbral del hematocrito a partir del cual la medición se afecta, sí hemos constatado que la hemodilución que conlleva el purgado del CEC, ocasiona una disminución del valor del hematocrito de forma sistemática.

8.2.- Comparación de ABL 800 y COULTER®HMX HematologyAnalyzer.

Ambas máquinas muestran un acuerdo excelente (96,7%) en la lectura de las cifras de **hemoglobina**. No obstante, al comparar los datos pareados, se observa que el *ABL 800 FLEX* sobreestima el valor de la hemoglobina en 3,58 g/L, lo que podría explicar los falsos negativos encontrados (1,8%) y la ausencia de falsos positivos. El hematocrito no lo hemos comparado puesto que el *ABL 800 FLEX* no informa sobre éste parámetro.

La semejanza en el método de medición de ambas máquinas *Beckman-Coulter®HmXy ABL 800 FLEX* explica los buenos resultados encontrados al compararlos. La técnica utilizada por ambos es la *espectrofotometría*.

El *ABL 800 FLEX* hemoliza la muestra para liberar la hemoglobina y aplica la *espectrofotometría* a distintas longitudes de onda para hallar todas las fracciones de la hemoglobina. El resultado de hemoglobina total es la suma de cada una de sus fracciones. A este método lo llamamos *co-oximetría*.

Sin embargo, el *Beckman-Coulter®HmX* inicialmente convierte la hemoglobina en un compuesto hemoglobínico libre de cianuro pero que presenta un espectro de absorbancia casi idéntico al sistema estandarizado internacional (la ciano-methemoglobina).

El *ABL 800 FLEX* sobreestima el valor de la hemoglobina en 3,58 g/L. Aunque en nuestro estudio sólo encontramos un caso de sobreestimación, puede tener implicación a nivel clínico, ya que se tratarían transfusiones que no se realizan cuando sí debieran (falsos negativos).

Se podría explicar por el hecho de que la *co-oximetría* mide todas las fracciones de hemoglobina, mientras que con el método de referencia, determina todas las fracciones de hemoglobina excepto una, la sulfohemoglobina, la cual no puede ser convertida en un compuesto hemoglobínico. El no tenerla en cuenta, podría explicar las diferencias halladas.

8.3.- Comparación entre espectrofotometría y conductividad en la determinación de la hemoglobina.

En 2007, Myers GJ et al²⁵ realizó una revisión de los POCT utilizados en cirugía cardíaca para medición del hematocrito o hemoglobina.

De los dos principales métodos, *-conductividad* para el hematocrito y *espectrofotometría* para la hemoglobina- concluyeron que los POCT que utilizan la conductividad son seguros en los casos que no hay variación de la concentración de proteínas, perfil lipídico, recuento leucocitario o expansores de volumen. Es decir, son fidedignos en los “sujetos fisiológicamente normales” pero no, en los pacientes críticos o quirúrgicos.

El método de la *espectrofotometría* se presentó como el método más exacto, consistente y seguro para determinar el valor de la hemoglobina y decidir una terapia transfusional.

La *conductividad*, se altera con los cambios de electrolitos del plasma y de la concentración de proteínas, como ocurre tras la infusión de 900-1250ml de cristaloides y coloides que se utilizan para purgar el sistema de circulación extracorpórea. Debido a estas variaciones osmóticas, los analizadores cuyo método de medición es la *conductividad*, no estarían indicados para guiar el umbral transfusional en las cirugías que comportan grandes pérdidas sanguíneas y alta tasa de reposición volémica como es el caso de la cirugía cardíaca.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO:

Nuestro estudio presenta las siguientes limitaciones.

1.- Por un lado, el tiempo en enviar el tubo BD Vacutainer® al laboratorio central no fue estandarizado. Habitualmente se envía inmediatamente tras ser extraída la muestra. Pero el hecho de que el anestesiólogo que recogió las muestras fuera el mismo anestesiólogo responsable del paciente, pudo generar retraso en el análisis de las muestras, sobre todo en situaciones de inestabilidad hemodinámica.

En otras ocasiones la muestra se hemoliza durante el transporte y se ha de extraer una nueva muestra para el análisis. No se recogieron las incidencias derivadas de la manipulación de las mismas.

2.- El umbral transfusional para el intra y postoperatorio es un valor de referencia. Cada paciente se trata de forma individualizada. De tal manera, en pacientes pluripatológicos, la decisión de transfundir no se toma únicamente por el valor de hemoglobina y hematocrito, sino por el contexto clínico. En este estudio, el número de transfusiones innecesarias es un concepto teórico que nos sirve de orientación para comprender la importancia de las diferencias encontradas entre los POCT y la máquina de referencia.

3.- El valor mínimo alcanzado por el *GEM®Premier 3000* en el momento T₂ fue un hematocrito de 22%, que correspondió a una hemoglobina de 68g/L. En esa misma medición, con la máquina de referencia se obtuvo un hematocrito de 23% y una hemoglobina de 76 g/L. Es reseñable que con valores tan bajos de hematocrito, las diferencias encontradas no alcancen el rango clínicamente significativo (son

inferiores al 2%). No hemos definido un valor de hematocrito por debajo del cual se puede asegurar que existe un sesgo significativo, aunque sería de gran utilidad, conocer mediante un algoritmo, qué diferencias esperaríamos encontrar a partir de una hemodilución determinada, marcada por ejemplo, por la concentración de sodio.

9.- CONCLUSIONES:

- Ante un protocolo restrictivo para transfusión de concentrados de hematíes, es necesario considerar las diferencias entre los sistemas de medición de hemoglobina.
- El POCT *GEM®Premier 3000* presente en nuestro quirófano de cardíaca, presenta un grado de acuerdo pobre con respecto a la máquina de referencia e infraestima sistemáticamente el resultado del **hematocrito y hemoglobina**. La explicación a estos hallazgos están dados por el método de medición. El *GEM®Premier 3000* mide el hematocrito por *conductividad* y ésta no sólo depende de la fracción de glóbulos rojos, sino también de la concentración de iones y proteínas. Las soluciones de cebado de la CEC alteran la concentración normal de iones y proteínas del componente sanguíneo y alteran el proceso de medida.
- El *GEM®Premier 3000* presenta un alto porcentaje de desacuerdos con la máquina de referencia a la hora de identificar el umbral transfusional. Si guiáramos la práctica transfusional por los valores de hemoglobina y o hematocrito obtenidos por este POCT, resultaría en un porcentaje elevado de transfusiones innecesarias.
- El POCT *ABL 800 FLEX* presenta mínimas diferencias de tipo sistemático en el cálculo de la hemoglobina con respecto a la máquina de referencia. El grado de acuerdo con la máquina de referencia es excelente, y sus resultados no inducen a la transfusión por exceso.
- El método de la *espectrofotometría y co-oximetría* constituyen el método más exacto y seguro para calcular el valor de la hemoglobina en pacientes de cirugía cardíaca.

10.- BIBLIOGRAFÍA:

- 1.- **Marino P L.** El libro de la UCI, The ICU Book. 2ª edición. Barcelona: Masson, S.A.; 2002.
- 2.- **Ferraris VA,** Ferraris SP, Saha SP, Hessel EA, 2nd, Haan CK, Royston BD, et al. Perioperative blood transfusion and blood conservation in cardiac surgery: the Society of Thoracic Surgeons and The Society of Cardiovascular Anesthesiologists clinical practice guideline. *Ann Thorac.*
- 3.- **Adams RC,** Lundy JS: Anesthesia in cases of poor surgical risk. Some suggestions for decreasing risk. *Surg Gynecol Obstet* 1942; 74:1011-1019.
- 4.- **Lundy JS:** Clinical anesthesia – a manual of clinical anesthesiology. Philadelphia. WB. Saunders Co, 1942, pg 381.
- 5.- **Orlov D,** O'Farrell R, McCluskey SA, Carroll J, Poonawala H, Hozhabri S, et al. The clinical utility of an index of global oxygenation for guiding red blood cell transfusion in cardiac surgery. *Transfusion.* 2009;49(4):682-8.
- 6.- **Vallet B,** Robin E, Lebuffe G. Venous oxygen saturation as a physiologic transfusión trigger. *Critical Care.* 2010;14(2):213.
- 7.- Practice guidelines for perioperative blood transfusion and adjuvant therapies: an up dated report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Perioperative Blood Transfusión and Adjuvant Therapies. *Anesthesiology.* 2006;105(1): 198-208.
- 8.- **Ferraris VA,** Brown JR, Despotis GJ, Hammon JW, Reece TB et al. 2011 Up date to the society of thoracic surgeons and the society of cardiovascular anesthesiologists blood conservation clinical practice guidelines. *Ann Torca Surg* 2011;91:944-982
- 9.- **Metha RH,** Sheng S, O'Brien SM, et al. Reoperation for bleeding in patients undergoing coronary artery bypass surgery: incidence , risk factors, time trends and outcomes. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2009;2:583-90.
- 10.- **Hebert PC,** Wells G, Morris A, Blajchman MA, Marshall J, Martin C, Pagliarello G, et al. A multicenter, randomized, controlled clinical trial of transfusión requirements in criticalcare. *N Engl J Med* 1999;340:409-417.
- 11.- **Murphy GJ,** Reeves BC, Rogers CA, et al: Increased mortality, postoperative morbidity, and cost after red-blood-cell transfusion in patients having cardiac surgery. *Circulation.* 2007; 116:2544-2552.

- 12.-**Ranucci M**, Castelvechio S, Frigiola A, Scolletta S, Giomarelli P, Biagioli B. Predicting transfusions in cardiac surgery: the easier, the better: the Transfusión Risk and Clinical Knowledge score. Vox sang.2009;96(4):324-32.
- 13.- **Alghamdi AA**, Davis A, Brister S, Corey P, Logan A. Development and validation of TransfusionRiskUnderstandingScoringTool (TRUST) tostratifycardiacsurgerypatients accordingtotheirbloodtransfusionneeds. Transfusion **2006**; 46:1120-112.
- 14.- **Martínez A**. Modelo predictivo de transfusión sanguínea en cirugía de revascularización miocárdica sin circulación extracorpórea. Desarrollo, validación y comparación. (TESIS DOCTORAL). Universidad Autónoma de Barcelona. 2011. Disponible en : www.educacion.es/teseo
- 15.- **Guyton AC**. Tratado de fisiología médica. 9º ed. Madrid. McGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA; 1996. 177-186
- 16.- **Garrigós L**. Los comienzos de la determinación colorimétrica de la hemoglobina en la sangre: ¿innovación o evolución?. Actes d'història de la ciència i de la tècnica. Nova Època. 2008;1:53-56.
- 17.- **Frederic G**. Hirsch, E. Clinton Texter, JR, Lloyd A. Wood, William C. Ballard, JR, Francis E. Horan, Irving S. Wright, Constance Frey and DorothyStarr. The electrical conductivity of blood: I. Relationship to erythrocyte concentration. Blood. 1950 5:1017-10.
- 18.- **Oliver Sáez P**. Buño Soto, A. Galán Ortega, R. Díaz García, P. Guevara Ramírez, P. Recomendaciones para el estudio de la cooximetría. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comisión Magnitudes Biológicas relacionadas con la urgencia Médica. Documento de la SEQC.
- 19.- **Van Kampen E**. Sijlstra, W. Standardization of hemoglobinometry. II. The hemoglobincyanide method. ClinChim. Acta 1961; 6:538-544.
- 20.- **Cannan R**. Proposal for adoption of an international lmethod and standard solution for hemoglobinometry, specification for preparations of the standard solution, and notification of avaliability of a reference standard solution. Am J ClinPath. 1954;24:607-611.
- 21.- International Committee for Standardization in Hematology: Recomendations for haemoglobinometry in human blood. Br. J. Haemat. 1967;13:71-75.
- 22.- **Valenciano E**. Estudio Critico y experimental de la Hemoglobinometria. Sangre. 1979;24:1133-1141.
- 23.- **Vanzetti G**. Anazide-methemoglobinmethod for hemoglobindetermination in blood. Journal of Laboratory and Clinical Medicine. 1966; 67:116-126.

- 24.- **Lewis SM** . Bain, BJ. Bates, I. Técnicas hematológicas básicas. Hematología práctica. 10º ed. ELSEVIER. 2008; 23-50.
- 25.- **Myers GJ**, Browne J. Point of care hematocrit and hemoglobin in cardiac surgery: a review. *Perfusion* 2007;22:179-183.
- 26.- **Stott RA**. Analytic artifacts in hematocrit measurements by whole blood chemistry analyzers. *Clinical Chemistry* 1995;41:306-11.
- 27.- **Rosenthal RL** and Tobias CW. Measurements of the electrical resistance of human blood. Use in coagulation studies and cell volumen determinations. *J Lab Clin Med* 1948;33: 1110-22.
- 28.- **Sydney M**. Hopfer. Effect of Protein on Hemoglobin and Hematocrit Assays with a Conductivity-Based Point-of-Care Testing Device: Comparison with Optical Methods. *Ann Clin Lab Sci*. 2004;34(1):75-82.
- 29.- **Gotch F**. Comparison of conductivity measured hematocrit to microhematocrit. *ASIAO Trans* 1991;37(3):M138-139.
- 30.- **Lin L**. A note on the concordance correlation coefficient. *Biometrics*. 2000; 56:324-325.
- 31.- **Kaplan El**, Meir P. Non parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-81.
- 32.- **Gehring H**, Hornberger C, Dibbelt L, *et al*. Accuracy of point-of-care-testing (POCT) for determining hemoglobin concentrations. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 2002; 46(8): 980-6.
- 33.- **Passing H**, Bablock W. Application of statistical procedures in analytical instrument testing. *J Automat Chem*. 1985;7(2):74-9.
- 34.- **Delgado M**, Llorca J, Doménech JM. Estudios para pruebas diagnósticas y factores pronósticos. 3ª ed. Barcelona: Signo; 2008.
- 35.- **Zijlstra WG**, Mook GA: Medical Reflection Photometry . Van Gorcum's Medical Library, nr (152) , Assen, the Netherlands, 1962; pp 85.
- 36.- **Steinfeldt-Visscher J** et al. Reliability of point-of-care hematocrit, blood gas, electrolyte, lactate and glucose measurements during cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 2006;21:33-37.
- 37.- **Steinfeldt-Visscher J** et al: Conductivity-based hematocrit measurement during cardiopulmonary bypass. *J Clin Monit Comput* .2007;21:7-12.

