(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 733 148**

(21) Número de solicitud: 201900050

(51) Int. CI.:

A61B 5/145 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN B2

(22) Fecha de presentación:

28.03.2019

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

27.11.2019

Fecha de concesión:

30.09.2020

(45) Fecha de publicación de la concesión:

07.10.2020

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID (100.0%)
Sec. Contratos y Patentes (OTRI), Fac. Medicina (Edificio Entrepabellones 7 y 8), C/ Dr. Severo Ochoa, 7 Ciudad Universitaria
28040 Madrid (Madrid) ES

(72) Inventor/es:

ORTUÑO SORIANO, Ismael;
VARGAS CASTRILLÓN, Emilio;
SIMÓN LÓPEZ, Leticia Carmen;
OCHOA MAZARRO, María Dolores y
LUQUERO BUENO, Sergio

(54) Título: **Procedimiento y dispositivo para la detección visual del grado de aptitud de una muestra aislada de sangre para su validación en análisis clínicos**

(57) Resumen:

Procedimiento y dispositivo para la detección visual del grado de aptitud de una muestra aislada de sangre para su validación en análisis clínicos.

La presente invención se refiere a un procedimiento para identificar visualmente el grado de aptitud de una muestra aislada de sangre para la validación de su análisis clínico posterior, teniendo en cuenta el grado de hemolisis de la muestra. Este procedimiento incluye la comparación del plasma de la muestra con una escala degradada, continua, dividida en siete estadios que se distribuyen, con igual tamaño, desde los 55º a los 00º y de los 00º a los 351º, siendo 00º el color rojo en el círculo cromático del modelo de doble cono.

La invención también se refiere a dicha escala degradada y al dispositivo que la contiene, que puede estar elaborado en distintos materiales (papel, cartón, cartón- pluma, plástico, metal).

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para la detección visual del grado de aptitud de una muestra aislada de sangre para su validación en análisis clínicos

Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el sector de los análisis clínicos, más concretamente, en la identificación del grado de hemólisis que presentan las muestras aisladas de sangre.

Antecedentes de la invención

La hemólisis es un fenómeno que puede alterar los resultados de parámetros analíticos.

Si no ocurren interferencias cruzadas, generalmente, la hemólisis incrementa la concentración de aquellas determinaciones que presentan grandes concentraciones a nivel intracelular, y disminuye aquellas que se encuentran en concentraciones bajas.

Por ejemplo, ítalo Moisés Saldaña recoge un estudio de la interferencia de la hemólisis sobre 25 constituyentes bioquímicos, de los cuales 16 presentaron interferencia clínicamente significativa (Saldaña, I.M. An Fac Med 2015; 76(4):377-384).

Para determinar el grado de hemólisis de una muestra aislada de sangre antes de proceder a su análisis clínico, existen varios métodos. Fundamentalmente, se utilizan métodos basados en la determinación del espectro de absorción de la muestra mediante espectrofotometría, o bien, métodos visuales. El método de detección más frecuentemente utilizado es la inspección visual, sin embargo, se trata de un método que, en general, se considera poco fiable (Gómez Rioja, R., et al. Rev Lab Clin. 2009; 2(4): 185-195). Por otro lado, las metodologías que se centran en las absorbancias de las muestras son más sensibles, pero su aplicación también tiene inconvenientes: implica costes adicionales y requisitos de tiempo relativamente extensos.

Diversos autores exponen escalas de hemólisis de detección visual a través de colorimetría o fotografías de tubos eppendorf para mostrar la intensidad de hemólisis (Saldaña, I.M. An Fac Med 2015; 76(4):377-384; Plumhoff E.A., et al. Mayo Medical Laboratories. Communiqué. 2008; 33(12): 1-8). Otros autores apuestan por la pertinencia de las técnicas espectrofotométricas para la detección de la hemólisis en las muestras aisladas de sangre por tener mayor precisión (Appierto, V. et al. Bioanalysis. 2014; 6:1215-1226). También hay estudios comparativos de otros métodos que hay actualmente a disposición, como la detección de microARN séricos (Shash, J.S. et al. PLoS ONE 2016; 11(4) 1-12); en este trabajo, se analiza la sensibilidad de cuatro métodos diferentes para la detección de bajos niveles de hemólisis y se concluye que, de los analizados, solo la detección de microARN y la espectrofotometría son suficientemente sensibles.

Por otro lado, se han descrito diferentes interferencias cruzadas en la determinación de la hemólisis de una muestra que podrían sesgar la identificación de su intensidad, tanto cuando se utilizan métodos espectrofotométricos como cuando se utilizan métodos de detección visual en el plasma, y, por lo tanto, interferir en algunas determinaciones analíticas. Son especialmente importantes las interferencias cruzadas debidas a la bilirrubina y la lipemia. La lipemia sobreestima y la bilirrubina infraestima la intensidad de la hemólisis y la exactitud en la determinación de constituyentes sanguíneos (Gómez Rioja, R., et al. Rev Lab Clin. 2009; 2(4):185-195). Existe una relación no lineal entre la concentración de hemoglobina libre en plasma y la determinación de bilirrubina total, produciéndose una infraestimación en pequeñas concentraciones de hemólisis y viceversa (Saldaña, I.M. An Pac Med 2015; 76(4):377-384).

La Organización Internacional para la Estandarización aborda los requisitos del sistema de calidad para ser aplicado en el laboratorio clínico (ISO 15189:2012), enfocado en la seguridad del paciente. Las muestras de sangre recogidas por venopunción son el tipo más común de muestras biológicas extraídas y enviadas a laboratorios para su análisis, para el diagnóstico y seguimiento terapéutico. Según las guías de actuación de la Organización Mundial de la Salud, el laboratorio debe detectar la presencia de hemólisis en la muestra aislada para analizar y valorar si supone un motivo de rechazo para alguna de las determinaciones solicitadas (World Health Organization. Diagnostic Imaging and Laboratory Technology. (2002). Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations. Geneva: World Health Organization. Disponible en: http://www.who.int/iris/handle/10665/65957).

Ante la ausencia de un método validado que conlleve un coste bajo y tiempo de aplicación breve, sigue siendo necesario encontrar un método de determinación de la hemólisis en muestras aisladas de sangre, para su análisis clínico, que sea suficientemente rápido, económico y fiable.

Explicación de la invención

Procedimiento y dispositivo para la detección visual del grado de aptitud de una muestra aislada de sangre para su validación en análisis clínicos.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar el grado de aptitud de una muestra aislada de sangre para el análisis clínico posterior de la misma. Este procedimiento comprende un paso en el que se compara la muestra aislada de sangre a analizar con una escala degradada según las intensidades visuales de la hemólisis en el plasma, que incorpora toda la gama de intensidades de color comprendida desde los 55° a los 00° y de los 0º a los 351°, siendo 00° el color rojo en el círculo cromático. Estos valores reflejan la cantidad de grados de rotación alrededor de un doble cono de colores a partir del color rojo (00°).

En esta memoria descriptiva se entiende por escala degradada una escala de colorimetría en la que aumenta progresivamente, de manera continua, la intensidad del color. Para realizarla se utilizaron el tono en grados, la saturación y el brillo en un doble cono de colores y el modelo HSL (de las siglas Hue, Saturation y Lightness - tono, saturación, luminosidad -), así como la información de 277 muestras de plasma.

El doble cono está constituido por dos conos que se asientan sobre una misma base circular y cuyos vértices están alineados con el centro del círculo de dicha base. Los vértices superior e inferior corresponden con la luminosidad, el blanco (100%) y el negro (0%) respetivamente; la distancia al eje con la saturación, cuya máxima intensidad de cada color se representa con el 100% y la mínima intensidad, que corresponde a una sombra gris, con un 0%; y el ángulo corresponde al tono del color. El tono reside a lo largo de la base circular del doble cono, formando un círculo cromático que se define por tres valores primarios mediante su posición en el círculo cromático. La posición de los tres valores primarios se ha normalizado, formando un triángulo, en los siguientes: rojo primario se sitúa a 0º, el verde primario a 120° y el azul primario a 240°, volviendo al rojo cuando regresamos al origen del círculo a 360°.

Se forman otros tres valores secundarios (sustractivos) entre los espacios del primer triángulo, dando lugar a un segundo triángulo: amarillo se sitúa a 60°, cian a 180° y magenta a 300°. Se generan matices intermedios mediante transiciones entre pares adyacentes de las posiciones de los colores primarios y secundarios (sustractivos), a lo largo del círculo cromático (naranja, turquesa, etc.). De ahí que la posición de los colores se pueda especificar en grados de ángulo (siendo el círculo completo 360°).

El modelo CMYK (de las siglas Cyan, Magenta, Yellow y Key) es un modelo de color sustractivo que permite representar una amplia gama de colores y tiene una buena adaptación a los medios industriales. Este modelo se basa en la mezcla de pigmentos de los colores cian, magenta, amarillo y negro para crear otros y es el que se ha utilizado para convertir los colores obtenidos según el modelo HSL a valores de impresión.

Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para identificar visualmente el grado de aptitud de una muestra aislada de sangre para su validación en análisis clínicos, mediante la detección del grado de hemólisis que ha sufrido la muestra, que incluye:

- la obtención del plasma de la muestra,

- la comparación del color del plasma de la muestra con una escala degradada de color que incluye toda la gama de intensidades de color desde los 55° a los 00° y de los 00° a los 351°, siendo 00° el color rojo en el círculo cromático del doble cono y en la que dicha gama de intensidades está dividida en 7 intervalos de igual tamaño que se corresponden con los siguientes estadios: estadio 1: 55°-44°; estadio 2: 43°-38°, estadio 3: 37°-26°; estadio 4: 25°-16°; estadio 5:15°-07°; estadio 6: 06°-01°; estadio 7: 00°-351°, cuya armonización en saturación y brillo, respetivamente, son: estadio 1: 35% - 44%, 99%- 89%; estadio 2: 47%-50%, 90%-90%; estadio 3: 50% -60%, 93% - 89%; estadio 4: 68%-80%, 95% - 80%; estadio 5: 71%-81%, 91% - 78%; estadio 6: 68%-83%, 80% - 70%; estadio 7: 82%-88%, 70% - 55% (Tabla 1),

- la asignación de la muestra a un estadio concreto de los 7 estadios de la escala degradada descrita en el paso anterior.

	Tono	**Saturación**	**Brillo**
Estadio 1	55°-44°	35%-44%	99%-89%
Estadio 2	43º-38º	47%-50%	90%-90%
Estadio 3	37°-26°	50%-60%	93%-89%
Estadio 4	25°-16°	68%-80%	95%-80%
Estadio 5	15°-07°	71%-81%	91%-78%
Estadio 6	06º-01º	68%-83%	80%-70%
Estadio 7	00°-351°	82%-88%	70%-55%

Tabla 1. Definición de los estadios de la escala degrada según el modelo HSL

No todos los parámetros sanguíneos se ven afectados en la misma medida por la hemólisis de la muestra sanguínea por lo que la aptitud de la muestra se debe tener en cuenta en cada una de las determinaciones que se realizan con cada muestra. Es decir, a cada uno de los 7 estadios de la escala degradada le corresponde una intensidad de hemólisis que supone la potencial alteración de determinados parámetros sanguíneos cuyo número va aumentando según aumenta el grado de hemólisis de tal manera que el número de alteraciones son acumulativas a medida que aumenta la intensidad de hemólisis en plasma EDTA K2/K3 en adultos sanos. Por ello, a continuación, se reflejan los parámetros que se ha documentado como potencialmente alterados en muestras sanguíneas con hemólisis, en función de la intensidad de hemólisis (mg/dl de desoxihemoglobina), englobados en cada uno de los estadios de la escala degradada.

Los datos se representan de la siguiente manera: parámetros potencialmente alterables (número de estadio que engloba todos los analitos anteriores); (número de otros estadios cuyos parámetros están potencialmente afectados).

- Estadio 1. Hidroxibutirato Deshidrogenasa (1)

- Estadio 2. Aspartato aminotransferasa (2); (1).

- Estadio 3. Bilirrubina total (3); (2); (1).

- Estadio 4. Alanina Aminotransferasa; pseodocolinesterasa no inhibida e inhibida por dibucaína; Creatinina quinasa; Etanol; Gamma-Glutamiltrasferasa; Hierro; Amoniaco (4); (3); (2); (1).

- Estadio 5: Ferritina; Mioglobina; Fosfato (inorgánico); Factores reumatoides (5); (4); (3); (2); (1).

- Estadio 6: Alanina aminotransferasa; Complemento C4; Colesterol total; Proteína C reactiva; Receptor soluble de la transferrina; Triglicéridos; Ácido valproico; Vancomicina (6); (5); (4); (3); (2); (1).

- Estadio 7: alfal-Glucoproteína ácida; Alfa 1-Antripsina; Albúmina; Apolipoproteina A-1; Apolipoproteina B; Antiestreptolisina O; Carbamacepina; Creatinina; Proteína C reactiva ultrasensible; Digoxina; Gentamicina; Glucosa HK; Colesterol HDL; Inmunoglobulina A; Inmunoglobulina G; Inmunoglobulina M; Litio; Fenobarbital; Fenitoína; Salicilato; Teofilina; Proteína total; Ácido úrico; Urea/BUN (7) ; (6); (5); (4); (3); (2); (1).

En el supuesto en el que el plasma de una muestra de sangre aislada sea objeto de análisis de parámetros de los enunciados en el párrafo anterior, se evalúa visualmente su intensidad de hemólisis y se asigna a uno de los 7 estadios. Posteriormente, será analizada y el resultado de cada parámetro alterado podrá ser evaluado en combinación con el estadio al que había sido asignada. El número de estadio al que se asigna la muestra debe acompañar al resultado de los parámetros evaluados en el informe, a modo de alerta para el responsable de la validación de resultados. Así, los resultados serán validados o desestimados sí, no encontrándose en un rango de normalidad, su correspondiente estadio de hemólisis alcanza una intensidad suficiente como para ser compatible con una alteración potencial de los resultados.

En el supuesto en el que el plasma de una muestra de sangre aislada sea objeto de análisis de parámetros adicionales a los enunciados en el párrafo anterior, se evalúa visualmente su intensidad de hemólisis y se asigna a uno de los 7 estadios. Posteriormente, será analizada y el resultado de cada parámetro alterado podrá ser evaluado en combinación con el estadio de la escala degradada. El número del estadio con el que se identifica la muestra debe acompañar al resultado de la muestra en el informe, a modo de alerta para el responsable de validación de los resultados. Así, los resultados serán validados o desestimados si, no encontrándose en un rango de normalidad, su correspondiente estadio de hemólisis alcanza una intensidad suficiente como para ser compatible con una alteración potencial de los resultados de los parámetros analizados. De la misma manera, si los resultados de un parámetro no se encuentran en el rango de normalidad y, para esa muestra, el estadio de hemólisis no es compatible con una alteración esperada de esos resultados observados, se determina la alteración fisiológica o patológica del paciente y, por lo tanto, se elimina la necesidad de repetir una muestra y se reducen costes.

En el supuesto en el que una muestra de plasma de sangre aislada sea objeto de análisis de analitos de principios activos de fármacos, como en los ensayos clínicos, la intensidad de hemólisis suficiente para desencadenar una alteración del analito, facilita la elección de muestras finales a analizar. De tal manera que evita sesgos en los resultados de investigación en fármacos y costes del análisis de muestras no válidas.

Como resultado del procedimiento de la invención, para un parámetro alterado compatible con alteración por hemólisis según el estadio de la escala degradada al que se asigna, el responsable de validación del laboratorio puede emitir el juicio de sospecha de una alteración de la muestra de plasma y no a una potencial patología del paciente, o bien, puede emitir un juicio de resultados alterados no esperables por cierta intensidad de hemólisis en la muestra. Por lo tanto, mediante el procedimiento de la invención el responsable del análisis clínico puede decidir la conveniencia o no de realizar un segundo análisis de una segunda muestra de sangre asilada.

En este procedimiento, se puede utilizar un dispositivo en el que la escala degradada de color ocupa, preferentemente, una superficie de 210 mm de alto por 297 mm de largo, correspondiendo a cada estadio un tamaño de 105 mm de alto por 41 mm de ancho, el conjunto de los colores de la escala ocupa 105 mm de alto por 287 de largo, con un margen de 52,5 mm en la parte superior como en la inferior y 5 mm en la parte derecha como izquierda en el que el color es, preferentemente, blanco mate, y que puede fabricarse prácticamente en cualquier material: papel, cartón, cartón-pluma, plástico, metal.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a una escala degradada de color para identificar el grado de aptitud de una muestra aislada de sangre para su validación en análisis clínicos, en función del grado de hemólisis que presenta dicha muestra, que incluye toda la gama de intensidades de color desde los 55° a los 00° y de los 00° a los 351°, siendo 00° el color rojo en el círculo cromático del doble cono y en la que dicha gama de intensidades está dividida en 7 intervalos de igual tamaño que se corresponden con los siguientes estadios: estadio 1: 55°-44°; estadio 2: 43°-38°; estadio 3: 37°-26°; estadio 4: 25°-16°; estadio 5: 15°-07°; estadio 6: 06°-01°; estadio 7: 00°-351°. Cuya armonización en saturación y brillo, respetivamente son: estadio 1: 35% - 44%, 99%- 89%; estadio 2: 47%-50%, 90%-90%; estadio 3: 50% -60%, 93% - 89%; estadio 4: 68%-80%, 95% - 80%; estadio 5: 71%-81%, 91% - 78%; estadio 6: 68%-83%, 80% - 70%; estadio 7: 82%-88%, 70% - 55%. Esta escala degradada se puede utilizar según el procedimiento que se ha indicado en el párrafo anterior.

Por otro lado, para utilizar la escala degradada de color para identificar el grado de hemólisis de una muestra aislada de sangre se puede elaborar un dispositivo en el que la escala ocupa, preferentemente, una superficie de 210 mm de alto por 297 mm de largo, correspondiendo a cada estadio un tamaño de 105 mm de alto por 41 mm de ancho, el conjunto de los colores de la escala ocupa 105 mm de alto por 287 de largo, con un margen de 52,5 mm en la parte superior como en la inferior y 5 mm en la parte derecha como izquierda en el que el color es, preferentemente, blanco mate. Este dispositivo puede fabricarse prácticamente en cualquier material: papel, cartón, cartón- pluma, plástico, metal.

Breve descripción de los dibujos

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompañan como parte integrante de dicha descripción figuras en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Escala degradada para detección visual de hemólisis con indicación de los valores utilizados para su elaboración.

Figura 2. Ejemplo de escala degradada para la detección visual de hemólisis, para utilizar en el laboratorio de análisis clínicos.

Figura 3. Heterocedasticidad entre estadios y relación entre absorbancia y estadios.

Realización preferente de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1. Reclutamiento de muestras.

Reclutamiento por conveniencia de muestras de plasma en adultos sanos, ciego y unimuestral para detección visual de hemólisis colorimétrica con referencia estandarizada de absorbancias.

Los criterios de selección de muestras fueron los siguientes:

- Hombres y mujeres.

- Edad: entre 18 y 55 años.

- Bilirrubinemia en rangos de normalidad. Monitorización a través de análisis sanguíneos.

- Muestras sanguíneas preprandriales (*).

- No fumar.

- No tener enfermedad diagnosticada.

- Tener los parámetros sanguíneos dentro de los rangos de normalidad. No portar preprandriales.

(*) Algunas muestras postpandriales pueden incluirse excepcionalmente si se extraen lo más tarde posible; la causa más común de lipemia es la ingesta reciente de una comida alta en grasas saturadas por lo que será necesario aplicar a estas muestras un factor de corrección.

Los individuos que tenían una bilirrubinemia total entre 0,2 y 1,2 mg/dl fueron incluidos. Aquellos que obtuvieron un resultado de bilirrubinemia total mayor de 1,5 del límite superior de la normalidad y obtuvieron un resultado de la bilirrubina directa igual o mayor del 35% de la bilirrubina total fueron excluidos tanto para la elaboración de la escala como para su validación. La medición se realizó mediante un análisis de sangre de seguridad entre 7 y 5 días antes de la obtención de la muestra para su uso en la elaboración y validación de esta escala.

Los individuos que tenían valores de triglicéridos, en ayunas de 8-10 horas, inferiores a 150 mg/dl fueron incluidos. Aquellos que alcanzaron dichos límites o resultados superiores en ayunas fueron excluidos tanto para la elaboración de la escala como para su validación. La medición se realizó mediante un análisis de sangre de seguridad entre 7 y 5 días antes de la obtención de la muestra para su uso en esta escala. Las muestras utilizadas para la elaboración y validación de la escala degradada fueron obtenidas en ayunas de, al menos, 5 horas.

Ejemplo 2. Elaboración de la escala.

Se elaboró una escala original de colorimetría degradada según las intensidades visuales de la hemólisis en el plasma. Se utilizó la información de 277 muestras de plasma para construir una escala degradada, en la que aumenta progresivamente, de manera continua, la intensidad del color. Para ello, se utilizó la saturación, la luminosidad y el tono en grados según el modelo HSL y su correlación con los códigos CMYK.

Como se puede ver en la figura 1, la escala se diseñó incluyendo desde los 55° a los 00° y de los 00° a los 351°, siendo 00° el color rojo en el círculo cromático de la base del doble cono. Estos valores reflejan la cantidad de grados de rotación a lo largo del círculo cromático de la base del doble cono a partir del color rojo (00°).

Las 277 muestras se evaluaron por espectrofotometría como se indica en el ejemplo 3. Los tonos de color expresados en grados y los resultados de la espectrofotometría se muestran en la figura 1: los grados en la parte superior de la escala degradada y las absorbancias de hemólisis en la parte inferior de la escala degrada. En ambos casos, en negrita se han marcado los valores utilizados en los siguientes ejemplos para el estudio de las concordancias y en las pruebas estadísticas realizadas en el proceso de validación del método de detección de la hemólisis en muestras aisladas de sangre. De arriba hacia abajo, en la figura 1 se indican:

- Primera línea: grados del tono del color ajustados que delimitan cada estadio.

- Segunda línea: grados del tono de color encontrado en el trabajo de campo experimental de la invención.

- Tercera línea: límites de absorbancia de hemólisis encontrada en las 277 muestras utilizadas.

- Cuarta línea: media aritmética calculada a partir de los límites de absorbancia de hemólisis hallados en las 277 muestras utilizadas (tercera línea) de los extremos de cada estadio.

De la intensidad mínima a la intensidad máxima de absorbancias, se dividió el total de la escala en 7 estadios, es decir, en 7 fragmentos de igual tamaño que representan 7 fases o estados sucesivos de hemólisis que puede presentar una muestra aislada de sangre, de menor a mayor intensidad de hemólisis.

En este ejemplo, la escala se diseñó con un tamaño de 105 mm de alto por 287 mm de largo, correspondiendo a cada estadio un tamaño de 105 mm de alto por 41 mm de ancho. Se fabricó un dispositivo utilizando papel de 90 gramos, en colores mates. Como se puede apreciar en la figura 1, los 7 estadios en los que se dividió la escala estaban delimitados por los intervalos que se detallan en la tabla 2:

	Tono del color (grados)	Espectrofotometría (unidades adimensionales de absorbancia)
Estadio 1	55°-44°	0,000-0,122
Estadio 2	43°-38°	0,123-0,163
Estadio 3	37°-26°	0,164-0,203
Estadio 4	25º-16°	0,204-0,281
Estadio 5	15°-07°	0,282-0,489
Estadio 6	06°-01°	0,490-0,638
Estadio 7	00°-351°	0,639-2,585

Tabla 2. Intervalos de la escala degradada en grados de tono de color y en unidades adimensionales de absorbancia en espectrofotometría.

La escala se diseñó de manera que todos los estadios ocupan idéntico espacio en el total de la escala, lo que evita sesgos de distorsión visual.

Entre los 7 estadios, se ha considerado que la relevancia clínica se sitúa entre el estadio 1 y el estadio 2. Se considera que una muestra sanguínea con hemólisis de estadio 1 no tiene un impacto clínicamente relevante en la mayoría de los parámetros de medición sanguínea en

plasma. En el estadio 1 solo se altera un parámetro que, además, no se valora rutinariamente en los análisis clínicos; en el estadio 2, se altera potencialmente un parámetro que sí se analiza de forma más rutinaria y en los siguientes estadios se alteran aún más valores.

Ejemplo 3. Valoración de referencia de la hemólisis.

Para validar la escala degradada elaborada según el ejemplo 2, se utilizó una metodología de espectrofotometría puesto que, aunque no es la técnica más discriminativa de las existentes actualmente, en general, se considera suficiente para la detección de hemólisis en muestras de sangre aisladas.

Se utilizó un NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, United States of America), con un amplio espectro ultravioleta-visible (190- 840 nm) y que requiere microvolúmenes de 0,5 a 2 µl de muestra inicial. Mediante este espectrofotómetro se pueden realizar mediciones de muestras muy concentradas sin necesidad de diluirlas previamente.

En este ejemplo, en cada muestra, se midió la absorbancia de la desoxihemoglobina en todo el espectro a través de 2 µl de plasma. El plasma de cada muestra se obtuvo como se indica en el ejemplo 4. Se calibró el NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer con 2 µl de agua destilada, se realizó la medición y, una vez obtenida la unidad adimensional de absorbancia en el software NanoDrop 2000/2000c 1.6.198 Thermo Fisher Scientific Inc., se limpió con pañuelos desechables. A continuación, se tomaron 2 µl de plasma de una muestra de sangre aislada y se analizaron, repitiendo el proceso al menos 3 veces, limpiando con un pañuelo entre cada medición. Entre la tercera medición de una muestra y la primera medición de la siguiente muestra, la zona del NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer que se pone en contacto con la muestra se limpió con 2 µl de agua destilada y se realizaron 1 o 2 mediciones para corroborar que no había arrastre del análisis de una muestra con la siguiente.

Ejemplo 4. Procedimiento de validación de la escala degradada.

En cada observación visual (test y re-test) hubo dos observadores. Los dos observadores del test de una tanda específica de muestras fueron los mismos que los dos observadores del re-test de dicha tanda. Se establecieron los observadores en función de:

- titulación,

- experiencia en la inspección de hemólisis y procesamiento de muestras en laboratorio,

- disponibilidad de colaboración en el laboratorio en tres momentos cada día.

Los observadores recibieron una formación previa de 10 minutos para realizar las evaluaciones. Posteriormente, se les permitió tardar un máximo de un minuto para la evaluación de cada muestra.

De cada muestra aislada de sangre, se obtuvo el plasma sanguíneo. Para ello, las muestras se recogieron en tubos EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) dado que es el más utilizado como anticoagulante por interferir en muy pocas determinaciones sanguíneas. El plasma se obtuvo centrifugando cada muestra a 3400 rpm durante 10 minutos a 4°C, en un máximo de dos horas posteriores a la toma de muestras. Se trasvasó el contenido plasmático al mayor número posible de tubos de 1,4 mi (Wilmut, W-2DPH 1,40 ml, Nirco, S.L., Barcelona, España). El primer tubo se estandarizó en un volumen mínimo de 150 µl y se identificó con una V en la parte superior del tubo, donde no había plasma para no interferir en la visualización del color. Todos los tubos con contenido plasmático se reservaron almacenándolas a -80°C. Posteriormente, se

descongelaron las muestras que estaban rotuladas mediante una descongelación lenta con agitador orbital. Inmediatamente antes del análisis por espectrofotometría, los tubos con contenido plasmático se agitaron con vórtex.

Se solicitó a cada observador que inspeccionara visualmente el tono de color del plasma de un tubo de cada muestra aislada de sangre, que evaluara y registrara el estadio de la escala degradada con el que coincidía el tono del plasma contenido en el tubo, según su criterio. Se comprobó su concordancia y discordancia según el estadio correspondiente a la absorbancia medida para el plasma de esa muestra.

Se elaboró una trazabilidad entre números y letras. La primera observación de los tubos de plasma correspondió a números y la segunda a letras. Se ordenaron los tubos de plasma de izquierda a derecha en orden numérico ascendente y alfabético, respectivamente. El registro de la trazabilidad fue cometido de una persona responsable de la coordinación del trabajo de campo, que tenía acceso único. Con la identificación de la segunda secuencia alfabética se realizó un cegamiento a los observadores. La medición de la absorbancia fue ciega y se realizó en otro laboratorio diferente al laboratorio en el que se realizó la evaluación visual.

Se consideró adecuado un número de muestras mínimo de 6 y máximo de 16 por tanda y se realizó el procedimiento dos veces por secuencia en cada tanda de tubos de 1,4 ml:

- test: se recopiló el tubo centrifugado y se trasvasaron 150 µl del plasma total a un tubo de 1,4 ml. Se evaluó visualmente la muestra contenida en el tubo y, posteriormente, se congeló;

- re-test: a las 24-48 horas postcongelación, se descongelaron los tubos con contenido plasmático utilizados en el test y se evaluaron de nuevo visualmente esas muestras; posteriormente, se analizaron mediante espectrofotómetro, según se indica en el ejemplo 3, congelándose posteriormente el tubo.

Para realizar la evaluación visual se utilizó luz artificial.

La persona responsable de la coordinación monitorizó la no influencia entre observadores impidiendo que confluyeran en el mismo laboratorio. Cada registro de evaluación se guardó, inmediatamente después de realizarlo, en un sobre con acceso limitado únicamente a la coordinadora y guardado bajo llave.

4.1. Tamaño de la muestra.

Se llevó a cabo un cálculo muestral unilateral de proporción observada respecto a una referencia, con un error alfa de 5% y una potencia de 80%, test unilateral. La proporción de referencia fue 46,6% basada en un estudio en el que, de 15 muestras identificadas con presencia de hemólisis a través de espectrofotometría, 8 de ellas no fueron detectadas visualmente y 7 sí pudieron ser detectadas a través del ojo humano (Shash, J.S. et al. PLoS ONE 2016; 11(4) 1-12). El objetivo fue alcanzar una concordancia de al menos 85%, justificado por ser un valor de certidumbre considerado suficientemente satisfactorio; lo que se consideró óptimo para detectar la intensidad de hemólisis en cada estadio.

H0: La concordancia de intensidad de hemólisis a través de estadios visuales no es óptima < 0,70.

H1: La concordancia de intensidad de hemólisis a través de los estadios visuales es óptima ≥ 0,85; al menos 0,85.

Por lo tanto, la diferencia mínima a detectar se obtuvo a través del objetivo de 85% - 46,6%, es decir, 38,4%. Finalmente, se concluyó que se necesitaban, al menos, 9 muestras o, lo que es lo mismo, 10 muestras sanguíneas por estadio, con una proporción prevista de pérdidas del 10% debidas, fundamentalmente, a muestras con contenido sanguíneo insuficiente para su inspección. Dado que la escala estaba formada por 7 estadios, en total, se necesitaron 63 muestras aisladas de sangre por escala, o bien, 70 muestras sanguíneas por escala, incluyendo las pérdidas.

4.2. Análisis estadísticos.

Se evaluaron los parámetros de fiabilidad, validez y factibilidad.

Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman para observar la tendencia y fortaleza de las relaciones entre variables; el índice de Kappa de Cohén para conocer las concordancias y discordancias de los estadios; el test de Kaiser-Meyer-OIkin (KMO) y de esfericidad de Bartlett (modelo chi-cuadrado); el coeficiente de correlación intraclase para la fiabilidad de la espectrofotometría en todas las mediciones repetidas de absorbancia.

Se detectó una distribución no paramétrica a través de la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov (p-valor< 0.05). Por lo tanto, se utilizó el test estadístico Kruskal- Wallis para conocer la heterocedasticidad entre los estadios de la escala; y una estadística descriptiva para evaluar la factibilidad.

El análisis se realizó por cumplimiento de protocolo, las muestras necesarias para completar el tamaño muestral de cada estadio. Es decir, aquellas muestras de plasma que los observadores consideraron que no eran óptimas para la detección visual por potencial lipemia, fueron excluidas.

Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 23 y el programa XLSTATA de Microsoft Excel para el abordaje de la validez de criterio predictiva.

Aspectos éticos y de calidad

Los sujetos firmaron el consentimiento informado correspondiente a un ensayo clínico en el que fueron partícipes. De la sangre restante a la exigida por el ensayo, parte fue utilizada para la elaboración y prueba de la escala. Sin embargo, no se recogió trazabilidad en la identificación de las muestras de sangre para la validación, se identificaron por orden cronológico de obtención. Además, no se extrajo ninguna muestra sanguínea adicional, el plasma se obtuvo de la cantidad de sangre restante de la muestra justificada por el ensayo clínico para el que los sujetos aportaban su consentimiento firmado, y se destruyeron según correspondía, por lo que no se consideró necesario un consentimiento específico adicional.

La metodología utilizada para llevar a cabo la validación de la escala se respalda a través de la guía de estudios de precisión diagnóstica STARD publicada en 2015 (Bossuyt, P.M. et al. BMJ 2015;351:h5527).

4.3. Teoría/cálculo.

A 414 nanómetros (nm), donde se encuentra generalmente la máxima intensidad de hemoglobina libre en plasma, es un punto específico de medición en el que las curvas de absorbancias de bilirrubina y lipemia se solapan; entre 400 nm y 540 nm para la detección de ictericia, la máxima expresión se evidencia a 460 nm, y entre 300 nm y 750 nm para la lipemia, sin pico máximo pero con óptima absorbancia a 300 nm. Además, en la actualidad existen algunas guías para la evaluación de riesgo cardiovascular realizándose determinados análisis

sanguíneos en condiciones no necesariamente de ayunas (como la medición de triglicéridos y hemoglobina glicosilada), por lo que se considera que podría estar justificado el método de ajuste de corrección de lipemia que Appierto, V. et al. proponen en Bioanalysis. 2014; 6:1215-1226: (A414-A385)+0,16xA385.

En cada medición, se obtuvo todo el rango desde 0 nm hasta 750 nm de cada muestra.

Para la elaboración y validación de la escala, se realizaron tres mediciones correspondientes a cada muestra de plasma, se calculó la absorbancia a 750 nm para realizar una corrección basal en cada muestra. Asimismo, se calculó la absorbancia a 414 nm y a 385 nm. Posteriormente, se realizó el cálculo según la fórmula de Appierto, V et al. (2014).

En los casos en los que las 3 mediciones de absorbancia fueron muy diferentes, se realizaron hasta un máximo de 6 mediciones adicionales. Es decir, se realizaron mínimo 3 y máximo 9 mediciones de una misma muestra de plasma. Del total de mediciones, la media aritmética se realizó con aquellas 3 mediciones más similares, eliminando los valores más extremos.

Como resultado, se obtuvieron tres valores de absorbancias corregidos. Se calculó la media aritmética de estas tres mediciones corregidas que resultaron en un valor único final correspondiente a una muestra.

Número de muestras

Se incluyeron 80 muestras sanguíneas, en total, de 64 sujetos. Cada estadio se validó mediante un determinado número de muestras: estadio 1 validado por 14 muestras, estadio 2 validado por 16 muestras, estadio 3 validado por 10 muestras, estadio 4 validado por 10 muestras, estadio 5 validado por 9 muestras, estadio 6 por 9 muestras y estadio 7 por 12 muestras.

Fiabilidad interobservador

Se obtuvo un índice de Kappa de Cohén de 0,491 en el test y de 0,270 en el re-test. Se considera un acuerdo moderado y aceptable, respectivamente, según Landis y Koch (Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. Fam Med. 2005 May; 37(5):360-3).

Fiabilidad intraobservador

Por otro lado, se obtuvo un índice de Kappa de Cohén de 0,474 en el test y re-test del primer observador. Índice de Kappa de Cohén de 0,489 en el test y re-test del segundo observador. Se considera un acuerdo moderado en ambos observadores según Landis y Koch.

Fiabilidad del instrumento

Se determinó el coeficiente de correlación intraclase (CCI) de las mediciones repetidas de absorbancia de cada muestra para representar la estabilidad de las mediciones del instrumento de referencia. Se obtuvo en el re-test, un CCI de 0,995 en un intervalo de confianza (IC) al 95% (0,992 - 0,996).

Fiabilidad de la consistencia interna

Se explica la heterocedasticidad entre los estadios que elaboran la escala, de acuerdo con la magnitud de hemólisis que representa cada estadio. Se observa en la tabla 3 y en la figura 3, a través del test de Kruskal-Wallis (p=0,000); cada estadio contiene una varianza de datos diferente, de tal manera que los estadios más bajos están formados por varianzas menores y, a

medida que aumenta la magnitud de hemólisis, aumenta la varianza de los datos que componen los estadios sucesivos de acuerdo con la estrecha relevancia clínica entre los estadios 1 y 2, la cual se disipa a medida que la muestra se encuentra más hemolizada.

ESTADIO	Rango promedio de unidades de absorbancia
Estadio 1	30,50
Estadio 2	92,50
Estadio 3	144,50
Estadio 4	184,50
Estadio 5	222,50
Estadio 6	258,50
Estadio 7	298,50

Tabla 3. Prueba de Kruskal-Wallis para los siete estadios de la escala de hemólisis.

En combinación, la tabla 4 representa un aumento significativo de absorbancia a lo largo de los estadios; a través de una correlación de Spearman:

	Valor	**Error estandarizado asintótico[a]**	**T Aproximada[b]**	**Significación aproximada**
Correlación de Spearman	0,988	0,001	114,477	0,000[c]
N° de casos válidos	80			

[a] No se supone la hipótesis nula.

[b] Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

[c] Se basa en aproximación normal.

Tabla 4. Relación entre media aritmética de absorbancias y estadios. Correlación de Spearman.

De la misma manera, se muestran las desviaciones típicas de las muestras de plasma utilizadas para la validación de cada estadio que fueron las siguientes:

Estadio 1: 0,018; estadio 2: 0,009; estadio 3: 0,013; estadio 4: 0,015; estadio 5: 0,055; estadio 6: 0,036; y estadio 7: 0,277.

Como consecuencia de los pares de estadios de combinaciones posibles para sus comparaciones, se llevó a cabo un ajuste de alfa a través de prueba de Bonferroni. Como las combinaciones en total fueron 21, se elevó el alfa fijado de 0,05 a 21. Se obtuvo un alfa significativo < 0,002 y un intervalo e confianza del 99,8%.

Validez de apariencia

La magnitud y relevancia clínica de hemólisis representadas se respalda por teoría subyacente en un panel de expertos (Appierto, V. et al. Bioanalysis. 2014; 6:1215-1226; Saldaña, I.M. An Fac Meó 2015; 76(4):377-384; Plumhoff E.A., et al. Mayo Medical Laboratories. Communiqué. 2008; 33(12): 1-8).

Validez de contenido

Se evalúo la adecuación de las absorbancias de la muestras de plasma obtenidas en el trabajo de campo experimental para reflejar el espectro al completo de la magnitud de absorbancia de hemólisis, tal y como se expone en la Tabla 5, Kaiser-Meyer-OIkin (KMO) ≥ 0,70.

De la misma manera, en la Tabla 5, se evaluó que las variables de media aritmética de absorbancia y la variable de estadios guardan una correlación entre ambas significativa para representar la dimensión de hemólisis (p-valor =0,000). Por lo tanto, la dimensión estaba correctamente representada y no había más dimensiones, no previstas, responsables de la magnitud de la hemólisis en las muestras de plasma del trabajo de campo.

Medida Kaiser-Meyer-OIkin de adecuación de muestreo	0,715
Prueba de esfericidad de Bartlett Aprox. Chi-cuadrado	1497,086
gl	3
Sig.	0,000

Tabla 5. Pruebas de KMO y Bartlett de los estadios según medias aritméticas. Validez de contenido.

Validez de criterio. Validez concurrente global

Se evaluaron las concordancias de los estadios de la escala de manera global. Es decir, se evaluaron concordancias de estadios asignados por los observadores en el test y retest en referencia al estadio asignado por la media aritmética de las mediciones de absorbancia de cada muestra de plasma. Se observa en la Tabla 6 una concordancia global ≥ del 70% en el re-test.

Momento			**Frecuencia**	**Porcentaje**
Res-test	Concordancias	No	23	28,7
		Si	57	71,3
		Total	80	100,0
Test	Concordancias	No	40	50,0
		Si	40	50,0
		Total	80	100,0

Tabla 6. Concordancias y discordancias globales de los estadios según media aritmética de absorbancia en función de los momentos del test y re-test.

Concordancias absolutas intraestadío de la escala en el re-test: estadio 1 del 100%, estadio 2 del 100%, estadio 3 del 90%, estadio 4 del 60%, estadio 5 del 33,3%, estadio 6 del 11,1% y el estadio 7 de 63,6%. En las discordancias halladas, se obtuvo un Rho de Spearman entre el estadio visual de los observadores y el elaborado por absorbancias del 90%; la correlación fue significativa en el nivel 0,01 (unilateral).

Validez predictiva

Se observa en la tabla 6 que el test no alcanza un parámetro satisfactorio, evaluando las muestras de plasma en las 48 h antes a ser analizado. Sin embargo, en el re-test, en el que sí se halla un parámetro satisfactorio, también es predictivo, pues se evalúa antes de analizar absorbancias, pero en un periodo de tiempo corto.

Por lo tanto, se exponen en la tabla 7 las mediciones del criterio globales de la escala en el re-test, es decir, de los estadios 2 al 7 respecto al estadio 1. Las concordancias enunciadas aluden a correctas clasificaciones absolutas con relevancia clínica implícita.

Se calculó la prevalencia del estadio 1 que fue de 0,188.

Mediciones	Valor	Límite inferior (95%)	Límite superior (95%)
Concordancias	0,713	0,613	0,812
Discordancias	0,288	0,188	0,387
Sensibilidad	0,646	0,524	0,751
Especialidad	1,000	0,757	1,000
Tasa de falsos positivos	0,000	0,000	0,000
Tasa de falsos negativos	0,354	0,241	0,467
Prevalencia	0,812	0,727	0,898
VPP (Valor Predictivo Positivo)	1,000	1,000	1,000
VPN (Valor Predictivo Negativo)	0,447	0,292	0,601
LR-(Razón de verosimilitud negativa)	0,354	0,255	0,491
RR (Riesgo relativo)	1,652	1,284	2,126

Tabla 7. Mediciones de validez de criterio global en los estadios conjuntos de la escala.

Estadio 2: Concordancias de 0,886 en un intervalo de confianza (IC) del 95% (0,780- 0,780), discordancias de 0,114 IC 95% (0,009-0,220), sensibilidad de 0,80 en un IC 95% (0,577-0,923), especificad de 1,00 en un IC 95% (0,757-1,00), tasa de falso positivo de 0,00, tasa de falsos negativos de 0,200 en un IC 95% (0,040-0,360). Prevalencia de 0,571 en un IC 95% (0,407-0,735), Valor Predictivo Positivo (VPP) de 1,00 en un IC 95% (1,00-1,00), Valor Predictivo Negativo (VPN) de 0,952 en un IC 95% (0,857-1,00). Razón de verosimilitud negativa (LR-) de 0,20 en un IC 95% (0,083-0,481). Riesgo relativo (RR) de 4,750 en un IC 95% (2,112-10,681).

Estadio 3: Concordancias de 0,960 en IC 95% (0,883-1,00), discordancias de 0,040 IC95% (0,000-0,117), sensibilidad de 0,90 en un IC 95% (0,571-1,000), especificidad de 1,00 en un IC 95% (0,757-1,00), tasa de falso positivo de 0,00, tasa de falsos negativos de 0,100 en un IC del 95% (0,000-0,257). Prevalencia de 0,400 en un IC 95% (0,208- 0,592), VPP de 1,00 en un IC 95% (1,00-1,00), VPN de 0,986 en un IC 95% (0,928- 1,00). LR- de 0,100 en un IC 95% (0,016-0,642), RR de 16,000 en un IC 95% (3,479- 73,583).

Estadio 4: Concordancias de 0,600 en IC 95% (0,438-0,762), discordancias de 0,400 IC 95% (0,238-0,562), sensibilidad de 0,300 en un IC 95% (0,145-0,522), especificidad de 1,000 en un IC 95% (0,757-1,00), tasa de falso positivo de 0,000, tasa de falsos negativos de 0,700 en un IC 95% (0,517-0,883). Prevalencia de 0,571 en un IC 95% (0,407-0,735), VPP de 1,00 en un IC 95% (1,000-1,000), VPN de 0,909 en un IC 95% (0,804-1,00). LR- de 0,700 en un IC 95% (0,525-0,933), RR de 2,071 en un IC 95% (1,435-2,990).

Estadio 5: Concordancias de 0,947 en IC 95% (0,847-1,000), discordancias de 0,053 IC 95% (0,000-0,153), sensibilidad de 0,750 en un IC 95% (0,290-0,960), especificidad de 1,000 en un IC 95% (0,757-1,00), tasa de falso positivo de 0,000, tasa de falsos negativos de 0,250 en un IC 95% (0,000-0,550). Prevalencia de 0,211 en un IC 95% (0,027-0,394), VPP de 1,000 en un IC 95% (1,00-1,00), VPN de 0,969 en un IC 95% (0,884-1,000), LR- de 0,250 en un IC 95% (0,046-1,365), RR de 16,000 en un IC 95% (3,479-73,583).

Estadio 6: Concordancias de 0,842 en IC 95% (0,678-1,000), discordancias de 0,158 IC 95% (0,000-0,322), sensibilidad de 0,250 en un IC 95% (0,040-0,710), especificidad de 1,000 en un IC 95% (0,757-1,00), tasa de falso positivo de 0,000, tasa de falsos negativos de 0,750 en un IC 95% (0,450-1,000). Prevalencia de 0,211 en un IC 95% (0,027-0,394), VPP de 1,000 en un IC 95% (1,000-1,000), VPN de 0,913 en un IC 95% (0,782-1,000), LR- de 0,250 en un IC 95% (0,046-1,365), RR de 6,000 en un IC 95% (2,336-15,411).

Estadio 7: Concordancias de 1,000 en IC 95% (1,000-1,000), discordancias de 0,000 IC 95% (0,000-0,000), sensibilidad de 1,000 en un IC 95% (0,590-1,000), especificidad de 1,000 en un IC 95% (0,757-1,000), tasa de falso positivo de 0,000, tasa de falsos negativos de 0,000 en un IC 95% (0,000-0,000). Prevalencia de 0,318 en un IC 95% (0,124-0,513), VPP de 1,000 en un IC 95% (1,000-1,000), VPN de 1,000 en un IC 95% (1,000-1,000), LR- de 0,000 en un IC 95% (0,000-0,000). No fue posible el cálculo de RR.

Validez de constructo

Se considera que una proporción de 0,713 en un intervalo de confianza del 95% (0,611- 0,814) de concordancias de la escala a nivel global es un parámetro suficientemente satisfactorio a pesar de no rechazar la hipótesis nula planteada. Además, los VPP de los estadios de la escala superan el 85%; siendo una medición más práctica para el objetivo diseñado en la aplicación clínica práctica.

Factibilidad

Los observadores dedicaron un tiempo de inspección visual en cada muestra representado en media aritmética (varianza) de 0,200 (±0,003) minutos, mínimo de 0,12 minutos y máximo 0,33 minutos en el re-test (número de muestras =80).

Los observadores requirieron una formación previa del uso de la escala de 10 minutos.

4.4. Interpretación de resultados

La fiabilidad global entre los observadores se considera aceptable, y la fiabilidad intraobservador moderada, según Landis y Koch, en el re-test de la escala, lo que sugiere una ligera variación de juicio entre los observadores, que puede deberse a una ausencia de unificación de criterio.

Las mediciones de absorbancia repetidas en muestras representan estabilidad con base en el índice de correlación intraclase representado, aproximadamente del 99%, tanto del contenido plasmático a medir como del instrumento medidor espectrofotómetro.

Se evidencia una heterocedasticidad significativa entre los estadios a través de Kruskal- Wallis (p= 0,000). De tal manera que a mayor número de estadio, mayor es la varianza de las absorbancias de las muestras de plasma incluidas. Concuerda con la relevancia clínica cuya mayoría de parámetros medidos en plasma comienzan a desencadenar alteraciones acumulativas en el estadio 2 y sucesivos, con una varianza muy estrecha entre los estadios 1 y 2, por lo que la escala es consistente con la representación de una muestra de plasma en un estadio específico y no en varios; por lo tanto es discriminativa. Adicionalmente, se observa una fuerte relación pues a medida que aumenta el valor del estadio del 1 al 7, aumenta el valor de las absorbancias. Por lo tanto, se considera que la escala es coherente al constructo de medición teórico, sus magnitudes y relevancia clínica, pues la heterocedasticidad y la correlación fuerte entre absorbancias e incremento de número de estadios son esperables.

Las muestras de plasma incluidas en el trabajo de campo de la escala abarcan un espectro suficiente para probar esta escala (KMO=0,71). Es decir, se basa en un cúmulo de casos posibles que representan la mayoría de los casos esperables cuando se aplique en otro entorno; en cuyo supuesto poder identificar cada caso y exponerlo a través de la clasificación del 1 al 7. De la misma manera, se observa la unidimensionalidad de la escala elaborada por las variables de estadios y media aritmética de absorbancias, lo que pone de manifiesto el correcto abordaje del constructo de hemólisis y sus magnitudes en una única dimensión.

En lo que refiere a la validez de criterio, la proporción de concordancias global se considera satisfactoria. Dichas concordancias se distribuyen de manera no proporcional entre sus estadios, pero, a excepción del estadio 4, todos los demás alcanzan un valor satisfactorio (mayor o igual del 70%). El estadio 4, a pesar de no alcanzar un resultado satisfactorio, no sólo resulta en un valor cercano, si no que el valor de 0,70 se encuentra entre los posibles valores de concordancias recogidos en el intervalo del estadio 4 en la muestra estudiada con una probabilidad de acierto del 95%. Además, el estadio 4 mantiene una relación fuerte entre evaluación visual y análisis de absorbancia, lo que sugiere una robusta orientación de los parámetros potencialmente alterados al alcanzar la intensidad de hemólisis correspondiente al estadio 4. Todos los estadios son útiles para la detección de la ausencia de hemólisis con impacto clínico; especificidad de 100% y falsos positivos de 0%. La sensibilidad ≥ 70% excepto el estadio 4 y 6. La tasa de falsos negativos es pequeña, excepto en los estadio 4 y 6. Todos los estadios predicen la magnitud de hemólisis correspondiente, adecuadamente (VPP ≥ 70%). A pesar de la baja predicción de ausencia de hemólisis en muestras de plasma globalmente (VPN ≤ 70%), probablemente influenciada por la baja prevalencia, en los estadios del 2 al 7 incluidos es satisfactoria (VPN ≥ 70%). El cociente de probabilidad de que una muestra hemolizada no se identifique como tal y su magnitud es baja, excepto en el estadio 4, el cual no se ha hallado una característica discriminativa. Además, a medida que aumentan los estadios la probabilidad de cribaje en la identificación de muestras hemolizadas frente a no hemolizadas es mayor, aunque el aumento no es lineal.

En la validez de constructo se obtienen unas concordancias del 71,3% en un intervalo de confianza al 95% de (61,1 %-81,4%) no se encuentra el 85% prefijado entre sus valores desde un punto de vista de la escala global. En cada uno de los estadios, todos alcanzan una validez de constructo, excepto el estadio 4; probable responsable de no alcanzar la validez de constructo global. Por este motivo, no es posible rechazar la hipótesis nula, ésta se mantiene.

Todas las correctas clasificaciones contienen, al menos, el 70% entre sus valores de intervalos de confianza al 95%; lo que corresponde con una clasificación considerada teóricamente como adecuada.

La escala refleja una validez de criterio, no así de constructo, para el tamaño muestral abordado; podría ser por una capacidad insuficiente en el trabajo de campo. Sin embargo, está íntimamente relacionado con el límite superior del intervalo de confianza de tal valor calculado.

Limitaciones

No se calcula la covarianza entre estadios, pues todos los estadios se delimitan por el número de absorbancia inmediatamente consecutivo; por lo que no aplica.

No es posible conocer el cociente de verosimilitud positivo por la presencia de una especificidad completa en el trabajo de campo.

No es posible conocer la validez de constructo a través de una prueba de hipótesis por ser unimuestral y, por lo tanto no aplica el p-valor.

No es posible calcular una validez divergente o fiabilidad de no bioequivalencia entre las escalas, puesto que no aplica.

Tampoco se puede conocer la validez discriminativa en lipemia y bilirrubinemia, porque se han eliminado posibles interferencias a través de pruebas analíticas para un control de bilirrubina en rango de normalidad y la extracción de muestras en ayunas, preferiblemente, además de aplicar el factor de corrección de la lipemia.

Conclusión

En la detección de hemólisis visual, con bilirrubina en rango de normalidad controlada y corregido en lipemia, la escala degradada de intensidad de hemólisis es una herramienta útil que refleja la realidad del constructo teórico subyacente con un impacto de beneficios clínicos suficientemente satisfactorios.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección visual del grado de aptitud de una muestra aislada de sangre para su validación en análisis clínicos en función del grado de hemólisis de la muestra, que incluye:

- la obtención del plasma de la muestra,

- la comparación del color del plasma de la muestra con una escala degrada de color que incluye toda la gama de intensidades de color desde los 55° a los 00° y de los 00° a los 351°, siendo 00° el color rojo en el círculo cromático de un doble cono y en la que dicha gama de intensidades está dividida en 7 intervalos de igual tamaño que se corresponden con los siguientes estadios: estadio 1: 55°-44°, estadio 2: 43°-38°; estadio 3: 37°-26°; estadio 4: 25°-16°; estadio 5: 15°-07°; estadio 6: 06°-01°; estadio 7: 00°-351°, cuya armonización en saturación y brillo, respetivamente, son: estadio 1:35% - 44%, 99%- 89%; estadio 2: 47%-50%, 90%-90%; estadio 3: 50% -60%, 93% - 89%; estadio 4: 68%-80%, 95% - 80%; estadio 5: 71%-81%, 91% - 78%; estadio 6: 68%-83%, 80% - 70%; estadio 7: 82%-88%, 70% - 55%,

- la asignación de la muestra a uno de los 7 estadios de la escala degradada.

2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que la escala degradada de color ocupa una superficie de 210 mm de alto por 297 mm de largo, correspondiendo a cada estadio un tamaño de 105 mm de alto por 41 mm de ancho, el conjunto de los colores de la escala ocupa 105 mm de alto por 287 de largo, con un margen de 52,5 mm en la parte superior como en la inferior y 5 mm en la parte derecha como izquierda en el que el color es blanco mate.

3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el dispositivo donde se incluye la escala degradada de color está fabricado en un material comprendido en el siguiente grupo: papel, cartón, cartón-pluma, plástico y/o metal.

4. Escala degradada de color para la detección visual del grado de aptitud de una muestra aislada de sangre para su validación en análisis clínicos en función del grado de hemólisis de la muestra, según el procedimiento definido en las reivindicaciones 1-3, que incluye toda la gama de intensidades de color desde los 55° a los 00° y de los 00° a los 351°, siendo 00° el color rojo en la rueda de colores y en la que dicha gama de intensidades está dividida en 7 intervalos de igual tamaño que se corresponden con los siguientes estadios: estadio 1: 55°-44º, estadio 2: 43°-38°; estadio 3: 37°-26°; estadio 4: 25°-16°; estadio 5: 15°-07°; estadio 6: 06°-01°; estadio 7: 00°-351°. Cuya armonización en saturación, y brillo respetivamente es: estadio 1:35% - 44%, 99%- 89%; estadio 2: 47%-50%, 90%-90%; estadio 3: 50% -60%, 93% - 89%; estadio 4: 68%-80%, 95% - 80%; estadio 5: 71%-81%, 91% - 78%; estadio 6: 68%-83%, 80% - 70%; estadio 7: 82%-88%, 70% - 55%.

5. Dispositivo para la detección visual del grado de aptitud de una muestra aislada de sangre para su validación en análisis clínicos en función del grado de hemólisis de la muestra que incluye la escala de color definida en la reivindicación 4, en el que la escala degradada ocupa una superficie de 210 mm de alto por 297 mm de largo, correspondiendo a cada estadio un tamaño de 105 mm de alto por 41 mm de ancho, el conjunto de los colores de la escala ocupa 105 mm de alto por 287 de largo, con un margen de 52,5 mm en la parte superior como en la inferior y 5 mm en la parte derecha como izquierda en el que el color es blanco mate.

6. Dispositivo según la reivindicación 5 fabricado en un material seleccionado del grupo: papel, cartón, cartón-pluma, plástico y/o metal.

Fig. 1

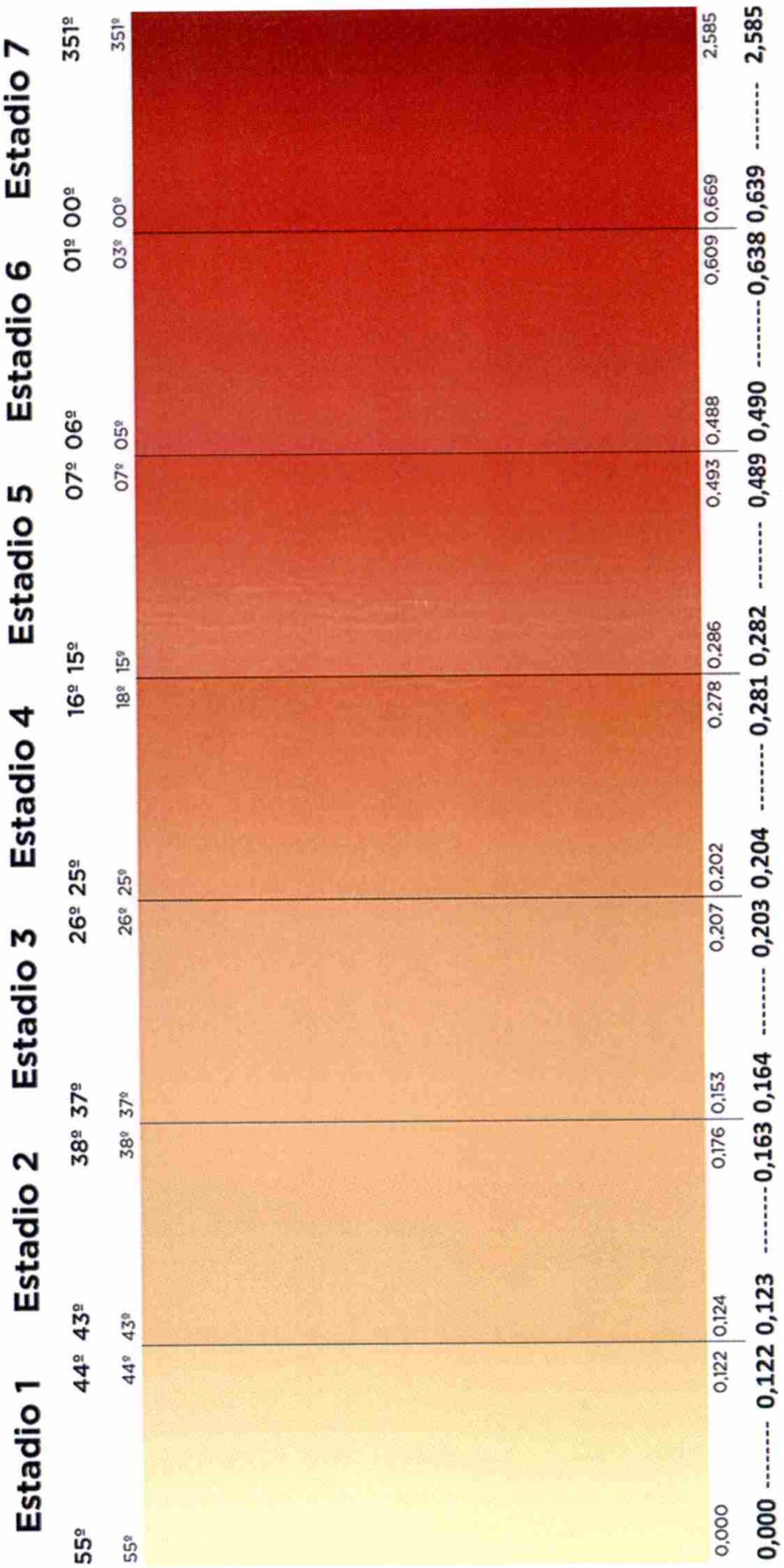
Estadio 1
Estadio 2
Estadio 3
Estadio 4
Estadio 5
Estadio 6
Estadio 7
55º
44º 43º
38º 37º
26º 25º
16º 15º
07º 06º
01º 00º
351º
55º
44º 43º
38º 37º
26º 25º
18º 15º
07º 05º
03º 00º
351º
0,000
0,122 0,124
0,176 0,153
0,207 0,202
0,278 0,286
0,493 0,488
0,609 0,669
2,585
0,000 ------- 0,122 0,123 -------0,163 0,164 ------- 0,203 0,204 ------- 0,281 0,282 ------- 0,489 0,490 -------0,638 0,639 ------- 2,585

Fig. 2

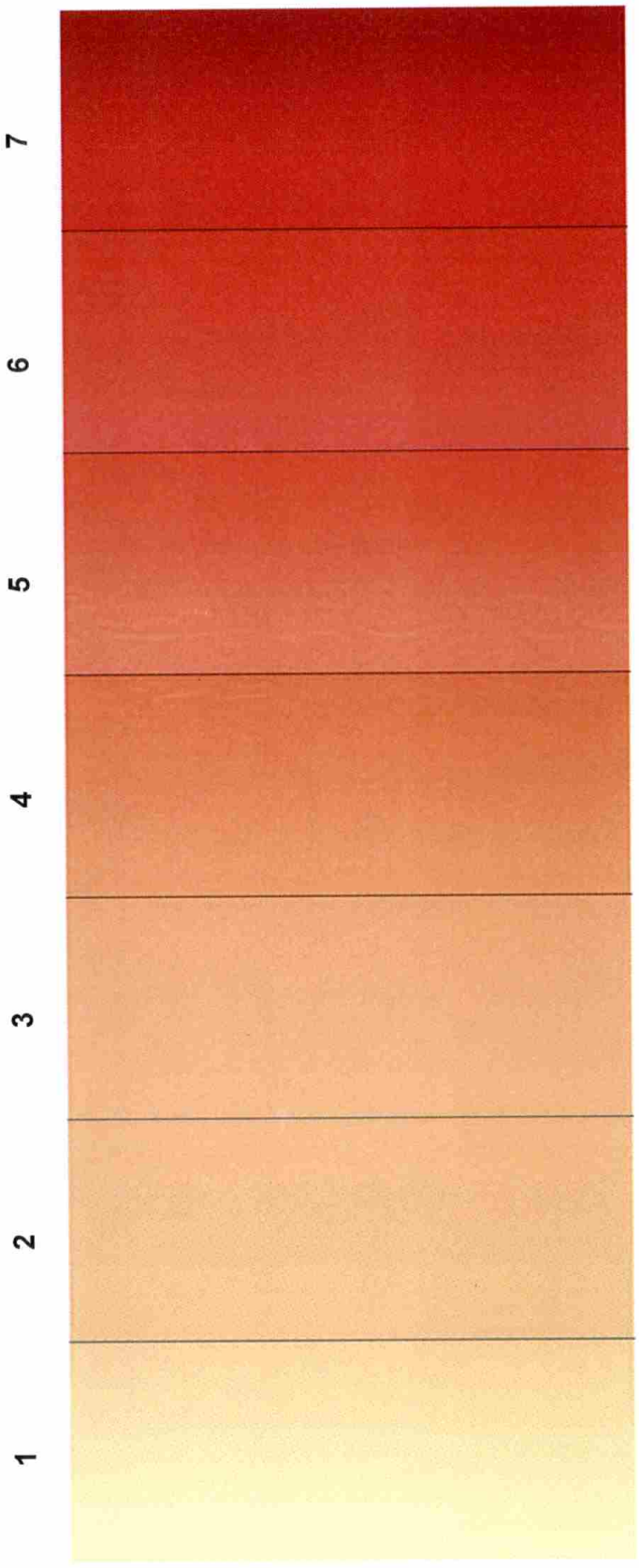
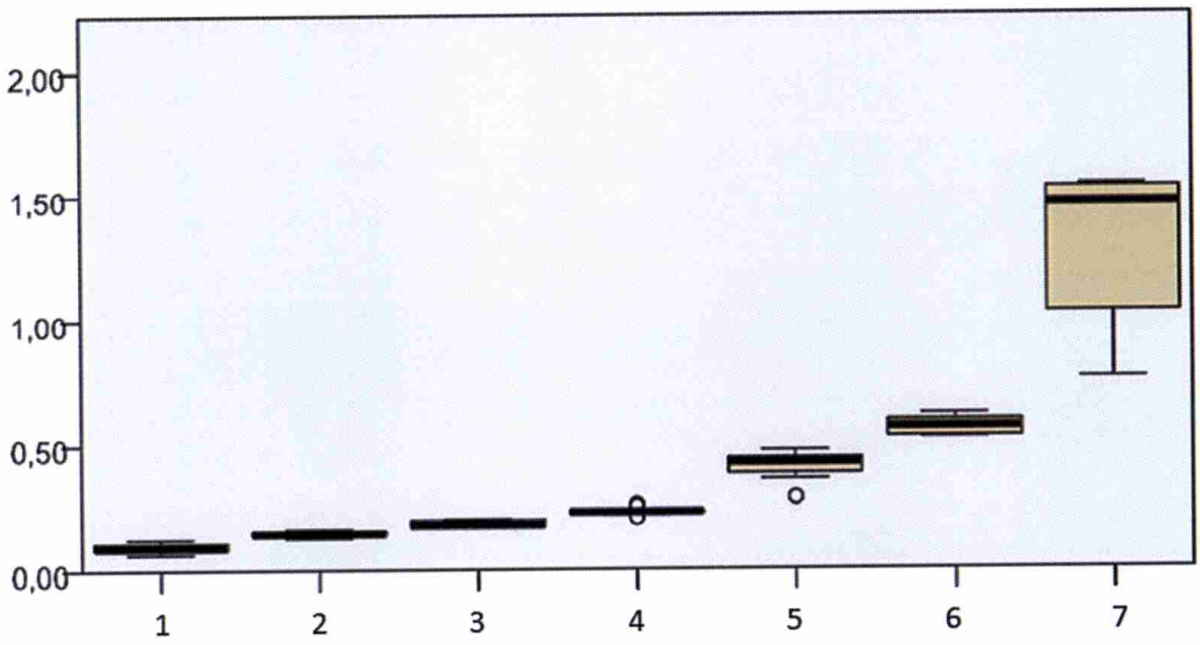
Fig. 3