

# Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación

MANUAL DE LABORATORIO

Segunda edición



Steve Kitchen  
Angus McCraw  
Marión Echenagucia

FEDERACIÓN MUNDIAL DE  
**HEMOFILIA**  
WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA  
FÉDÉRATION MONDIALE DE L'HÉMOPHILIE  
**Tratamiento para todos**



Publicado por la Federación Mundial de Hemofilia (FMH)

© Federación Mundial de Hemofilia, 2010

La FMH alienta la redistribución de sus publicaciones por organizaciones de hemofilia sin fines de lucro con propósitos educativos. Para obtener la autorización de reimprimir, redistribuir o traducir esta publicación, por favor comuníquese con el Departamento de Comunicación a la dirección indicada abajo.

Esta publicación está disponible en la página Internet de la Federación Mundial de Hemofilia, en [www.wfh.org](http://www.wfh.org). Puede solicitar copias adicionales a la FMH a:

Federación Mundial de Hemofilia  
1425 René Lévesque Boulevard West, Suite 1010  
Montréal, Québec H3G 1T7  
CANADÁ  
Tel.: (514) 875-7944  
Fax: (514) 875-8916

Correo electrónico: [wfh@wfh.org](mailto:wfh@wfh.org)  
Página Internet: [www.wfh.org](http://www.wfh.org)

# Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación

## MANUAL DE LABORATORIO

Segunda edición (2010)

### **Steve Kitchen**

Especialista en  
Capacitación de  
Laboratorio de la FMH  
Sheffield Haemophilia  
and Thrombosis Centre  
Royal Hallamshire  
Hospital  
Sheffield, U.K.

### **Angus McCraw**

Especialista en  
Capacitación de  
Laboratorio de la FMH  
Katharine Dormandy  
Haemophilia Centre  
and Thrombosis Unit  
The Royal Free Hospital  
London, U.K.

### **Marión Echenagucia**

(co-autor,  
Automatización)  
Banco Municipal de  
Sangre del D.C.  
Universidad Central de  
Venezuela  
Caracas, Venezuela

*en representación del*

## **COMITÉ DE CIENCIAS DE LABORATORIO DE LA FMH**

**Presidente (2010):** Steve Kitchen, Sheffield, U.K.

**Vicepresidente:** Sukesh Nair, Vellore, India

Esta edición ha sido revisada por los siguientes especialistas, quienes al momento de su redacción eran miembros del Comité de Ciencias de Laboratorio de la Federación Mundial de Hemofilia:

Mansoor Ahmed

Norma de Bosch

Ampaiwan Chuansumrit

Marión Echenagucia

Andreas Hillarp

Clarence Lam

Sukesh Nair

Alison Street

Alok Srivastava

Algunos capítulos también fueron revisados por miembros del Comité sobre la enfermedad de von Willebrand y trastornos de coagulación poco comunes de la Federación Mundial de Hemofilia.

*Reconocimiento:* Algunos de los métodos descritos se basan en procedimientos operativos estándar para laboratorio diseñados en el Centro de Hemofilia de Sheffield por Annette Bowyer, a quien agradecemos profundamente su aporte.

Los autores y la Federación Mundial de la Hemofilia están muy agradecidos a Pura Lawler por la revisión de esta traducción.

*Aviso importante:* Los productos comerciales que se mencionan en este manual deben entenderse como ejemplos pertinentes al momento de la redacción y no suponen el respaldo de la Federación Mundial de Hemofilia (FMH), los autores o el Comité de Ciencias de Laboratorio de la FMH. Tampoco significa que cualquier otro producto sea inadecuado o poco confiable. Los fabricantes de los materiales que se usan en las pruebas de laboratorio pueden modificar su composición, por lo que al momento de redactarse esta edición no se puede predecir el grado de confiabilidad de tales productos en el futuro.

### **Información de contacto de los autores**

steve.kitchen@sth.nhs.uk

amccraw@nhs.net



# Índice

1	Equipamiento de laboratorio.....	1
2	Verificación calibración de pipetas y balanzas .....	3
3	Seguridad en el laboratorio.....	5
4	Obtención de muestras y variables preanalíticas .....	11
5	Control interno de calidad y evaluación externa de calidad.....	14
6	Técnica de inclinación manual del tubo de ensayo.....	20
7	Preparación y calibración de un pool de plasma normal (PPN).....	22
8	Cómo determinar un rango de referencia normal.....	24
9	Reactivos .....	28
10	Recuento de plaquetas .....	30
11	Tiempo de sangrado.....	35
12	Tiempo de protrombina (TP).....	37
13	Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA).....	40
14	Ensayos de mezcla para una investigación exhaustiva de los TP y TTPA anormales .....	45
15	Tiempo de trombina.....	49
16	Tiempo de trombina en presencia de sulfato de protamina para la detección de heparina.....	51
17	Tiempo de reptilasa.....	52
18	Fibrinógeno (ensayo de Clauss modificado).....	55
19	Eliminación de la heparina del plasma .....	58
20	Ensayo de relación fibrinógeno-antígeno por inmunodifusión radial (IDR).....	60
21	Prueba de rastreo del factor XIII.....	62
22	Ensayos de factor basados en el tiempo de protrombina (factores II, V, VII o X).....	64
23	Ensayos de factor basados en el TTPA (ensayo de una etapa de los factores VIII:C, IX, XI y XII) .....	67

24	Ensayos de factor VIII:C en crioprecipitado .....	70
25	Ensayo de coagulación de dos etapas para el factor VIII:C.....	71
25.1	Producción del reactivo combinado para el ensayo de dos etapas de factor VIII:C .....	73
26	Ensayo por método cromogénico del factor VIII:C.....	76
27	Ensayo de una etapa para análisis de precalicreína y cininógeno de alto peso molecular en la vía intrínseca .....	79
28	Prueba de rastreo de los inhibidores de los factores de la coagulación basado en el TTPA .....	81
29	Ensayo de la actividad del cofactor ristocetina/ del factor von Willebrand (FvW:RCo o FvW:Act) .....	83
29.1	Preparación de plaquetas fijadas.....	85
30	Ensayo del antígeno del factor von Willebrand (FvW:Ag) por método ELISA.....	87
31	Ensayo de enlace al colágeno del factor von Willebrand (FvW:CB) .....	90
32	Ensayo de enlace del factor VIII para el diagnóstico de la variante Normandía de la enfermedad de von Willebrand .....	93
33	Análisis multimérico del FvW .....	99
34	Medición cuantitativa de los inhibidores del factor VIII.....	108
35	Ensayo de los inhibidores del factor IX.....	113
36	Ensayo de la actividad del factor XIII.....	114
37	Anticoagulantes lúpicos y anticuerpos antifosfolípidos .....	117
38	Tiempo de veneno de víbora Russell diluido (TVVRd) .....	120
38.1	Preparación de plaquetas lavadas para la prueba de TVVRd .....	123
39	Pruebas de la función plaquetaria .....	124
39.1	Retracción del coágulo.....	125
39.2	Medición de la agregación plaquetaria .....	126
40	Liofilización del plasma.....	135
41	Evaluación y uso de coagulómetros.....	137
42	Análisis de genética molecular .....	144

Todo laboratorio que se dedique al diagnóstico y tratamiento de los trastornos de la coagulación y que utilice todas las técnicas descritas en este manual, o algunas de ellas, requerirá, como mínimo, un equipamiento básico. La evaluación y el uso de coagulómetros semiautomáticos y totalmente automáticos se tratan en el capítulo 41.

## EL EQUIPAMIENTO BÁSICO DEBERÁ CONSTAR DE:

- Un refrigerador para almacenar reactivos a 4 °C  
Lo normal es mantener los reactivos a una temperatura de 2 °C a 8 °C, salvo indicación en contrario del fabricante. Un refrigerador doméstico de buena calidad puede cumplir este requisito.
- Un ultracongelador capaz de mantener una temperatura mínima de -35°C  
Para un almacenamiento prolongado es mejor una temperatura más baja, por ejemplo -70 °C. A esta temperatura los factores de coagulación se mantienen estables durante al menos seis meses (Woodhams et al., 2001). En general, los congeladores de -20 °C no sirven para almacenar plasmas y reactivos para muchas pruebas de hemostasia. No utilizar congeladores con autodescongelamiento.
- Baño de María (único o múltiple) regulado que pueda mantener temperaturas de 37 °C ± 0,5 °C  
Los bloques de calor seco pueden ser adecuados o no, depende de la unidad. Normalmente la temperatura se mantiene mejor en un baño de María.
- Un medidor de pH
- Una fuente de luz (por ejemplo, una lámpara Anglepoise)
- Cronómetro(s)
- Pipetas automáticas calibradas capaces de proporcionar volúmenes exactos y precisos de muestras y reactivos en un rango de 0 µl a 200 µl y hasta 1000 µl  
Es importante verificar su exactitud (ver capítulo 2).
- Una pipeta calibrada para proporcionar hasta 5 ml de volúmenes líquidos



- Una centrifugadora que genere una fuerza mínima de 1700 g  
Para la mayoría de los análisis de coagulación, es aceptable centrifugar a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C). (En algunas técnicas, se recomienda 2500 g y centrifugado a 4 °C.)
- Una báscula o balanza analítica calibrada que mida con exactitud los gramos hasta tres decimales.  
En el capítulo 2 se describe un procedimiento para verificar la exactitud.

Para algunos procedimientos se requiere un equipamiento adicional, que incluye:

- un lector de placas de microtitulación para desarrollar técnicas de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA);
- un agregómetro de plaquetas;
- el equipamiento indicado en determinadas hojas de método.

En países de temperatura elevada es una gran ventaja tener aire acondicionado en todas las salas.

En un laboratorio debe haber una cantidad adecuada de consumibles. Se debe evitar reutilizar los tubos de ensayo y las puntas de pipetas una vez lavados, ya que el material residual puede afectar negativamente los resultados, con el consiguiente desperdicio de reactivos y de tiempo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, and Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12:229-36.



Para una mejor gestión de la calidad, se recomienda verificar la calibración de las balanzas y del volumen de las pipetas en forma periódica: cada tres a seis meses. Todo aparato que no esté calibrado debe ser retirado de uso inmediatamente y no se debe volver a usar hasta que haya sido recalibrado. Las pipetas deben llevar un identificador único.

## MÉTODO PARA VERIFICAR LA CALIBRACIÓN DE PIPETAS

---

1 Las pipetas pueden ser de volumen único, de dos o tres volúmenes, o bien tener un rango continuo de volúmenes.

- Las pipetas con uno o dos niveles fijos se verifican en cada nivel.
  - Las pipetas con tres niveles fijos se verifican en los niveles mínimo y máximo.
  - En el caso de pipetas con un rango continuo de niveles de volumen: verificar el nivel máximo y también un volumen de alrededor del 25% del nivel máximo. Es decir:
    - pipeta de 10 ml – 10 ml y 2,5 ml;
    - pipeta de 5 ml – 5 ml y 1,25 ml;
    - pipeta de 1 ml – 1 ml (1000 µl) y 0,25 ml (250 µl);
    - pipeta de 0,2 ml – 0,2 ml (200 µl) y 0,05 ml (50 µl);
    - pipeta de 0,1 ml – 0,1 ml (100 µl) y 0,025 ml (25 µl);
    - pipeta de 50 µl – 50 µl y 15 µl.
- 

2 Verificar la calibración pesando cinco volúmenes repetidos de agua destilada (a temperatura ambiente) en una balanza. Cada pesaje se registra en gramos (hasta tres decimales). A los fines prácticos, 1,000 ml pesan 1,000 g.

---

## RESULTADOS

Se deben registrar tanto los resultados como las acciones de respuesta.

Cuando se demuestra que una pipeta es inexacta porque el volumen medio pipeteado difiere en más del 10% del volumen establecido, se debe retirar de uso inmediatamente y no se debe volver a usar hasta que haya sido

recalibrada siguiendo las instrucciones del fabricante. De ser posible, el nivel de exactitud de las pipetas debe estar muy por debajo del 10%.

*Importante: Si una pipeta tiene una inexactitud que supera los siguientes límites (el peso medio), se debe retirar de uso inmediatamente.*

#### MÉTODO PARA VERIFICAR BALANZAS

- **Pipeta de 10 ml**  
10 ml: de 9,000 g a 11,000 g  
2,5 ml: de 2,250 g a 2,750 g
- **Pipeta de 5 ml**  
5 ml: de 4,500 g a 5,500 g  
1,25 ml: de 1,125 g a 1,375 g
- **Pipeta de 1 ml**  
1 ml: de 0,900 g a 1,100 g  
0,25 ml: de 0,225 g a 0,275 g
- **Pipeta de 0,2 ml**  
0,2 ml: de 0,180 g a 0,220 g  
0,05 ml: de 0,045 g a 0,055 g
- **Pipeta de 0,1 ml**  
0,1 ml: de 0,090 g a 0,110 g  
0,25 ml: de 0,225 g a 0,275 g
- **Pipeta de 50 µl**  
50 µl: de 0,045 g a 0,055 g  
15 µl: de 0,013 g a 0,165 g

Para asegurarnos de su exactitud, pesar los pesos calibrados con intervalos de seis meses y registrar los valores.

- 1 Colocar la balanza en cero.
- 2 Pesar los tres pesos calibrados, uno por vez. Registrar los pesos hasta tres decimales (por ejemplo: 1,003 g).
- 3 Si alguno de los pesos está fuera de los límites establecidos (en >2%), retirar la balanza de uso hasta que se rectifique el problema.

Los laboratorios que manejan sustancias químicas y muestras biológicas son lugares de potencial peligro.

En los últimos años se ha tomado más conciencia de la importancia de usar prácticas de seguridad laboral, por razones ambientales y de salud. Con esta toma de conciencia, se ha puesto más énfasis en cuestiones como documentación de seguridad, capacitación del personal y evaluación de riesgos.

Es la responsabilidad de los empleadores proveer la ropa y los equipos de protección necesarios así como brindar capacitación en seguridad laboral.

Si se aplican las prácticas de seguridad laboral, se reducirá ampliamente la probabilidad de que el personal y el público en general sufran lesiones graves.

## **ENCARGADOS DE LA SEGURIDAD**

Es importante designar a uno o más encargados de la seguridad para cada unidad, quienes se ocuparán de implementar y mantener los procedimientos de seguridad. De todos modos, la responsabilidad recae sobre todo el personal del laboratorio.

## **MANUAL DE SEGURIDAD**

Debe haber un manual de seguridad integral que cubra todos los aspectos de las prácticas de seguridad laboral del sector.

Todo el personal debe leer el manual y firmar una declaración en el sentido de que lo ha entendido.

Los encargados de la seguridad deben guardar copias del manual, las que también estarán a disposición en lugares de fácil acceso para el personal.

## **MEDIDAS DE SEGURIDAD: PRECAUCIONES UNIVERSALES**

Según el sistema de precauciones universales, las buenas prácticas laborales permitirán evitar o minimizar todo peligro de infección, cualquiera sea su origen.

Se considera que las muestras de sangre, los productos sanguíneos (incluidos los reactivos plasmáticos y sus correspondientes equipos) y otros materiales del cuerpo humano constituyen un posible peligro de infección.

Al trabajar con cualquier material se deben tomar todas las precauciones posibles en materia de protección.

No se debe realizar ninguna otra clasificación de riesgo. Todos los fluidos corporales y los materiales, excepto la sangre, sean recogidos en la unidad o traídos a ella para su análisis o con cualquier otro fin, se deben tratar con el mismo cuidado que se le da a la sangre.

### *El laboratorio*

El laboratorio siempre debe estar limpio y ordenado. Los papeles se deben guardar lejos de las áreas donde se realizan los análisis. Intentar evitar usar el laboratorio para almacenar artículos a granel. Es la responsabilidad de todos mantener el laboratorio ordenado.

### *Indumentaria de protección*

Toda persona que entra al laboratorio, incluidas las visitas, debe usar una bata de laboratorio. Si la bata se contamina, se la debe reemplazar de inmediato.

### *Guantes descartables*

A muchas personas no les gusta usar guantes, pero las muestras que se manejan en el laboratorio son potencialmente peligrosas. Siempre se debe usar guantes al manejar material tóxico.

Es obvio que los guantes y las batas no protegen contra ciertos accidentes, como el pinchazo de una aguja, pero podrán evitar, por ejemplo, que una toxina o el suero de personas VIH positivas entre en contacto con cortaduras o escoriaciones cutáneas.

En caso de rotura o pinchadura de un guante, reemplazarlo de inmediato.

### *Lavado ocular*

Es muy fácil contraer una infección por contacto con las membranas mucosas de los ojos.

Si los ojos han entrado en contacto con un posible material infeccioso, lavarlos de inmediato con abundante agua fría del grifo.

### *Objetos cortopunzantes*

Los objetos cortopunzantes, en forma de agujas y vidrio roto, presentan un gran peligro: utilizar una caja para objetos cortopunzantes donde pueda colocarlos o guardarlos sin pincharse.

Han existido casos de personal que se ha infectado debido a la herida causada por el pinchazo de una aguja.

### *Aerosoles*

Evitar realizar en el laboratorio abierto aquellas prácticas que puedan causar salpicaduras o la diseminación de gotitas o polvillo en el aire.

Las actividades que producen aerosoles siempre se deben realizar en la correspondiente campana extractora de gases. Usar gafas de seguridad.

Los derrames se deben limpiar de inmediato, usando lejía o un agente neutralizante, según sea necesario.

### ***Sustancias tóxicas e inflamables***

Los materiales tóxicos o inflamables siempre se deben guardar en una campana extractora de gases o en una caja de seguridad adecuada.

### ***Equipos eléctricos***

Tener especial cuidado con los equipos que usan líquidos, como los tanques de electroforesis y los baños de agua.

Dejar que el personal calificado se ocupe de la instalación, el mantenimiento y las reparaciones de los equipos eléctricos.

### ***Objetos personales y normas de conducta***

No llevar al laboratorio objetos personales, como bolígrafos, carteras o peines.

Evitar poner las manos en contacto con la cara o las mucosas (de los ojos, de la nariz y de la boca) mientras esté en el laboratorio. Si se necesita hacer, siempre lavarse las manos antes.

No ingresar al laboratorio con comida, cigarrillos o cosméticos.

No llevarse la pipeta a la boca.

Siempre lavarse bien las manos antes de salir del laboratorio.

### ***Accidentes***

Todos los accidentes se deben denunciar de inmediato y se deben registrar en el libro de accidentes a cargo del encargado de la seguridad del sector. Esto es importante en especial en relación con las heridas causadas por pinchazos de aguja. En estas situaciones, se deben seguir los procedimientos de registro y denuncia que usa el hospital local y también las medidas que se recomiendan o exigen localmente.

## **NORMATIVA SOBRE CONTROL DE SUSTANCIAS PELIGROSAS PARA LA SALUD (COSHH, POR SU SIGLA EN INGLÉS)**

Esta legislación, que se usa en los laboratorios del Reino Unido, es una guía útil para identificar riesgos y peligros.

### ***Peligro y riesgo***

El peligro que presenta una sustancia es su potencial para causar daño. El riesgo de esa sustancia es la probabilidad de dañar a alguien en condiciones reales de uso.

### *Identificación de peligros*

Identificar peligros es un prerequisite esencial para la evaluación de riesgos. El tiempo que se usa para identificar peligros podrá variar de acuerdo con la sustancia.

### *Evaluación de riesgos*

Tener en cuenta lo siguiente:

- los peligros;
- las condiciones de uso;
- las cantidades a utilizar;
- los probables trayectos o lugares de exposición (inhalación, ingestión, piel u ojos).

El resultado de la evaluación de riesgos determinará:

- las condiciones de almacenamiento;
- los procedimientos de manipulación;
- los procedimientos de eliminación;
- la necesidad de monitoreo y vigilancia sanitaria;
- los procedimientos de emergencia.

Revisar la evaluación de riesgos en forma anual y actualizar, de ser necesario.

En las figuras 3.1 y 3.2, a continuación, se muestran ejemplos de cómo registrar información para la evaluación de riesgos, en estos casos usando el procedimiento de la Normativa sobre Control de Sustancias Peligrosas para la Salud (COSHH).

La finalidad de este formulario es identificar los peligros y las medidas de control relacionados con los equipos que se utilizan en un determinado procedimiento. Únicamente el personal competente debe realizar los procedimientos, y lo hará solo después de haber revisado la documentación sanitaria y de seguridad relativa a cada análisis específico.

**Figura 3.1. COSHH para el ensayo de tiempo de protrombina y los ensayos de factores de coagulación basados en el TTPA**

**Ensayos 1 según número de referencia COSHH  
Ensayo de una etapa de los factores II, V, VII, VIII, IX, X, XI y XII  
según ref. del laboratorio**

Título del procedimiento/experimento:

Sustancia	Cantidad aprox.	Peligro identificado
Tampón de glioxalina (imidazol), contiene (ver** )	<5 ml	Dañino si se ingiere.
**Imidazol	3,4 g/l	Corrosivo: causa quemaduras. Dañino si se inhala, se ingiere o es absorbido a través de la piel. Irrita los ojos.
**Cloruro sódico	5,85 g/l	Irrita los ojos y los pulmones. Evitar el contacto con la piel.
Plasma deficiente en factores	1 ml	Riesgo de infección.
Tromboplastina	2 ml	Bajo riesgo.
Reactivo TTPA	2 ml	Bajo riesgo.
Cloruro cálcico 0,025M	5 ml	Bajo riesgo.
Tampón de Owren	<500 ml	Contiene barbitona. Dañino si se traga. Puede causar sensibilización por contacto con la piel o inhalación.
Solución 1 para el lavado del equipo de análisis de coagulación	<50 ml	Causa quemaduras: dañino para los ojos, la piel, etc. No mezclar con otros desinfectantes. Corrosivo. El contacto con materiales combustibles puede provocar incendio. El contacto con ácido libera gas tóxico. Reacciona violentamente con sales amónicas; solvente orgánico. Riesgo de explosión.
Solución 2 para el lavado del equipo de análisis de coagulación	<50 ml	Contiene 0,16% de ácido clorhídrico y detergente. Irritante: puede dañar los ojos y la piel.
Plasma estándar/de control/ del paciente	<1000 µl	Riesgo de infección.



**Figura 3.2. COSHH para el ensayo de factor XIII**

Título del procedimiento/experimento:		
Sustancia	Cantidad aprox.	Peligro identificado
Reactivo de activación: trombina bovina; inhibidor de coagulación (0,01 de G GLI-PRO-ARG-ALA-AMIDA); cloruro cálcico; bromuro de hexadimetrina (40mG); albúmina bovina; tampón bicina (100M m/l); y 2,5 mg de azida sódica	Vial de 5 ml	Contiene azida sódica: altamente tóxica si se absorbe a través de la piel o se ingiere. Puede causar daño genético hereditario. Produce explosión con ciertos metales.
Reactivo NADH: 2 mg de NADH; albúmina bovina y 2,5 mg de azida sódica	Vial de 5 ml	Contiene azida sódica: altamente tóxica si se absorbe a través de la piel o se ingiere. Puede causar daño genético hereditario. Produce explosión con ciertos metales.
Reactivo de detección: péptido sintético; éster etílico de glicina (7 mg); alfa cetoglutarato (13,5 mg); albúmina bovina; tampón de HEPES; y 5 mg de azida sódica	Vial de 5 ml	Contiene azida sódica: altamente tóxica si se absorbe a través de la piel o se ingiere. Puede causar daño genético hereditario. Produce explosión con ciertos metales.
Plasma estándar/de control/del paciente	<1000 µl	Riesgo de infección.

## OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Los procedimientos para la obtención y el procesamiento de las muestras de sangre para los análisis de hemostasia están descritos en detalle en una serie de directrices (CLSI 2007, 2008a, 2008b).

De ser posible, deberá extraerse sangre venosa del pliegue del codo con la ayuda de un torniquete para facilitar la extracción. El torniquete debe aplicarse justo antes de la extracción. La aguja no debe tener un calibre superior a 21 para adultos, y la muestra debe tomarse con una jeringa y/o con un sistema de extracción al vacío que permita la rápida extracción de la muestra de sangre. La sangre debe ingresar lentamente en la jeringa. Para los bebés, puede ser necesario utilizar una aguja de calibre 22 o 23.

Toda muestra que no se obtenga de manera rápida mediante una punción venosa que resulte satisfactoria de inmediato deberá desecharse para evitar la posible activación de la coagulación. La sangre no debe volver a pasar por la aguja después de haber ingresado en la jeringa. La aguja debe retirarse antes de pasar la sangre de la jeringa al recipiente con anticoagulante. Tras la extracción, la mezcla con el anticoagulante debe hacerse sin demora.

Una vez que se mezclan la sangre y el anticoagulante, se deberá sellar el recipiente y mezclar el contenido mediante cinco inversiones suaves. Evitar agitar el recipiente enérgicamente. Algunos autores recomiendan no utilizar los primeros 5 ml de sangre extraída para los análisis de hemostasia.

Si el sistema utilizado para la extracción es por vacío, debe tenerse en cuenta que la mezcla por cinco inversiones suaves también es necesaria después de que la sangre ha entrado en contacto con el anticoagulante.

La sangre debe mezclarse con el anticoagulante citrato de sodio en una proporción de 9 partes de sangre por 1 parte de anticoagulante. Esto resultará en una concentración de 0,109M (citrato trisódico dihidratado al 3,2%) o similar (por ejemplo, en algunos sistemas al vacío se utiliza de forma satisfactoria el anticoagulante citrato con una concentración de 0,105 M). La solución anticoagulante puede ser almacenada a 4 °C hasta un máximo de tres meses. Antes de su uso, deberá ser inspeccionada y desechada si se encuentra material particulado en ella, lo que sucede, por ejemplo, cuando se contamina. El recipiente de la muestra no debe provocar activación por contacto (es decir, se deberán utilizar recipientes de plástico o cristal siliconizado). Si el paciente presenta un hematocrito bajo o, en particular, si el hematocrito es elevado, los resultados pueden verse afectados; por ello, el volumen de anticoagulante deberá ajustarse para contemplar la disminución del volumen plasmático.

La figura 4.1. que se muestra a continuación constituye una guía para determinar el volumen de anticoagulante necesario para una muestra de 5 ml.

**Figura 4.1. Volumen de sangre y anticoagulante necesario para muestras con anomalías en el hematocrito.**

Hematocrito	Volumen de anticoagulante	Volumen de sangre
25%–55%	0,5 ml	4,5 ml
20%	0,7 ml	4,3 ml
60%	0,4 ml	4,6 ml
70%	0,25 ml	4,75 ml
80%	0,2 ml	4,8 ml

Otra posibilidad es mantener constante el volumen de anticoagulante de 0,5 ml y variar el volumen de sangre añadida según el hematocrito. El volumen de sangre que debe añadirse (a 0,5 ml de 0,109 M citrato) se calcula según la siguiente fórmula:

$$\frac{60}{100-\text{hematocrito}} \times 4,5$$

### **CENTRIFUGACIÓN**

El plasma rico en plaquetas (PRP) que se utiliza para las pruebas de función plaquetaria se prepara mediante la centrifugación de la sangre anticoagulada a temperatura ambiente a 150–200 g durante 10 minutos. Se extrae el sobrenadante y se mantiene a temperatura ambiente en un vial con tapa durante su uso como máximo por dos horas.

El plasma pobre en plaquetas (PPP) se utiliza en la mayoría de las pruebas de coagulación. La muestra de sangre debe ser centrifugada a un mínimo de 1700 g durante al menos 10 minutos, lo que puede hacerse a temperatura ambiente, siempre que esta no supere los 25 °C. Si la temperatura es superior a ese valor, deberá utilizarse una centrifugadora refrigerada (4 °C).

Algunos procedimientos de prueba requieren que el plasma sea centrifugado dos veces. Para ello, se debe transferir el PPP de la primera centrifugación a un tubo plástico con tapón, para después centrifugarlo por segunda vez. Se deberá procurar no utilizar el plasma del fondo del tubo después de la segunda centrifugación, debido a que podría contener plaquetas que pueden haber quedado allí tras la primera centrifugación.

### **MUESTRAS PARA PRUEBAS INMEDIATAS**

De ser posible, las muestras deben ser analizadas en las primeras cuatro horas de haberlas tomado. Asimismo, para las pruebas de rastreo y los ensayos de los factores de coagulación debe evitarse un almacenamiento superior a dicho tiempo, si bien se ha demostrado que las muestras de sangre completa

almacenadas a temperatura ambiente pueden presentar resultados estables en la medición del tiempo de protrombina (Baglin y Luddington 1997). Las muestras para las pruebas de rastreo y el ensayo del factor VII deben mantenerse a temperatura ambiente, con el fin de evitar el riesgo de una activación por frío.

### MUESTRAS DE ALTO RIESGO

Todas las muestras de plasma se deberán manejar con sumo cuidado en vista del riesgo de transmisión de hepatitis, VIH y otros virus.

Consultar el capítulo 3, *Seguridad en el laboratorio*.

### ULTRACONGELACIÓN DEL PLASMA

Las muestras pueden ser almacenadas con ultracongelación para su análisis posterior. Es recomendable almacenarlas a  $-70^{\circ}\text{C}$  o a una temperatura inferior. Los factores de coagulación se mantienen estables a dicha temperatura durante por lo menos seis meses (Woodhams et al. 2001). Para la mayoría de las pruebas, lo más adecuado es el almacenamiento de las muestras por un período breve a  $-35^{\circ}\text{C}$ . Un almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  normalmente no resulta adecuado. Si las muestras se someten a ultracongelación, se debe utilizar la doble centrifugación (consultar el apartado anterior, Centrifugación) antes de someterlas al análisis del anticoagulante lúpico.

Se recomienda evitar la congelación y descongelación antes de la determinación del TTPA, debido a que los resultados obtenidos con algunas técnicas podrían verse afectados. El plasma congelado debe ser transferido de inmediato a un baño de agua a  $37^{\circ}\text{C}$ , descongelado entre cuatro y cinco minutos y mezclado por inversión suave antes de someterlo a análisis. Debe evitarse la descongelación lenta a una temperatura inferior a fin de impedir la formación de crioprecipitado, que disminuye el contenido de factor VIII:C, factor VW y fibrinógeno en el plasma sobrenadante.

### BIBLIOGRAFÍA

Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: implications for decentralised anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haem* 1997; 96:431-4.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: Approved standard*, 6th ed. 2007; Clinical and Laboratory Standards Institute Document H3-A6: 27(26).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Procedures and devices for the collection of diagnostic capillary blood specimens: Approved standard*, 6th ed. 2008 (a); Clinical and Laboratory Standards Institute Document H4-A6: 28(25).

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays: Approved guideline*, 5th ed. 2008 (b); Clinical and Laboratory Standards Institute Document H21-A5: 28(5).

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12:229-36.

# 5

## Control interno de calidad y evaluación externa de calidad

Aseguramiento de la calidad (AC) es un término general que puede utilizarse para describir al conjunto de acciones que sirven para garantizar la confiabilidad de las pruebas e informes de laboratorio. Estas acciones incluyen no solo elegir el tipo de prueba, obtener una muestra válida del paciente, analizarla y registrar los resultados en forma exacta y oportuna, sino además interpretar los resultados, si corresponde, y notificarlos al médico que solicitó el estudio.

El control interno de calidad (CIC) y la evaluación externa de calidad (EEC) (a veces denominados ensayos de aptitud) son dos componentes distintos y a la vez complementarios del programa de aseguramiento de la calidad en laboratorios. El CIC se utiliza para comprobar si los resultados de ciertas técnicas y procedimientos son coherentes en un determinado período de tiempo. Por lo tanto, se usa para garantizar coherencia en el trabajo diario del laboratorio. La EEC se utiliza para identificar el grado de concordancia entre los resultados de diferentes laboratorios.

En los programas amplios de EEC, el análisis retrospectivo de los resultados obtenidos por los laboratorios participantes permite identificar no solo aquellos laboratorios con desempeño deficiente sino también los reactivos y métodos que producen resultados poco confiables o que inducen a engaño.

La función básica de la EEC es comprobar la aptitud de los ensayos de cada laboratorio. El Esquema Internacional de Evaluación Externa de la Calidad (IEQAS por su sigla en inglés) de la Federación Mundial de Hemofilia incluye diversos análisis que son de particular importancia para el diagnóstico y tratamiento de los trastornos de la coagulación (para más información, contactar a la FMH). Los datos obtenidos de este programa se han publicado en la siguiente bibliografía:

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Development of a World Federation of Hemophilia External Quality Assessment Scheme: results of a pilot study. *Haemophilia* 1996; 2: 4-46.

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Laboratory performance of haemophilia centres in developing countries: 3 years' experience of the World Federation of Hemophilia External Quality Assessment Scheme. *Haemophilia* 1998; 4: 739-746.

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID, Preston FE. Laboratory performance in the WFH EQA programme 2003-2008. *Haemophilia*. 2009; 15:571-7.

## **INFORMACIÓN DE CONTACTO SOBRE EL PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD DE LA FMH (2010)**

Director: Prof. F. Eric Preston  
Director Científico: Dr. Steve Kitchen

Rutledge Mews  
3 Southbourne Road  
Sheffield  
S10 2QN  
Reino Unido  
Teléfono: + 44 - 114 - 267 3300  
Fax: + 44 - 114 - 267 3309  
Sitio web: [www.ukneqasbc.org](http://www.ukneqasbc.org)

Los programas más amplios de evaluación externa de la calidad pueden brindar información sobre los resultados relativos de los procedimientos analíticos, incluidos el fundamento del método, los reactivos y los instrumentos. La participación continua en programas de EEC está asociada con una mejora en el desempeño de los laboratorios, lo que se ve reflejado en cada laboratorio en particular y en el desempeño general, pues los resultados entre laboratorios han sido menos variables.

La evaluación del desempeño de cada laboratorio es un componente esencial de los programas de evaluación externa de calidad. El programa de evaluación externa de calidad de la FMH compara los resultados de los participantes con los resultados obtenidos en las mismas muestras cuando fueron analizadas en casi 700 centros de todo el mundo que participan del Programa Nacional del Reino Unido para la Evaluación Externa de Calidad (UK NEQAS por su sigla en inglés) de la Coagulación Sanguínea.

Son muchas las razones por las cuales un laboratorio podría producir resultados considerados no satisfactorios. Si bien en un principio la causa podría ser evidente, lograr identificar el problema subyacente no siempre es una tarea sencilla. Los programas más amplios permiten detectar problemas de desempeño específicamente relacionados con diferencias en los reactivos o en la metodología.

Una característica importante de todos los programas de EEC es su total confidencialidad. En el programa IEQAS antes mencionado, la información sobre el desempeño de cada laboratorio en particular se transmite solo al jefe designado del departamento y no se divulga salvo con autorización escrita.

### **CONTROL INTERNO DE CALIDAD**

El control interno de calidad se utiliza para comprobar si los resultados de ciertas técnicas y procedimientos son coherentes en un determinado período de tiempo. La expresión control de calidad describe el conjunto de procedimientos usados para verificar si los resultados de las investigaciones de laboratorio son confiables. La difusión de resultados confiables es útil para asistir en la toma de decisiones clínicas, seguimiento de terapias, y



diagnóstico de anomalías hemostáticas. La correcta aplicación de estos procedimientos permite controlar en forma inmediata y constante el modo de obtención de los resultados.

En el entorno de un laboratorio, existen muchos factores que influyen en la calidad de los resultados, entre ellos:

- la adecuada obtención y manipulación de las muestras;
- la selección de técnicas apropiadas y el mantenimiento de un manual de procedimientos operativos estándar actualizado;
- el uso de reactivos y materiales de referencia confiables;
- la correcta selección y mantenimiento de la automatización;
- los registros adecuados;
- un sistema de información de los resultados.

Asimismo, la calidad de los resultados obtenidos en la práctica de rutina se complementa y depende en gran medida de la selección, capacitación y motivación de personal idóneo.

El control interno de calidad es útil en particular para identificar el grado de precisión de una determinada técnica, entendiéndose como precisión el grado de concordancia entre las repetidas mediciones de una muestra. Es importante observar que una técnica precisa no es necesariamente exacta, entendiéndose por exactitud el grado de cercanía de un valor estimado al valor verdadero.

### **MATERIALES PARA EL CONTROL DE CALIDAD**

Para evaluar la precisión de un determinado método, es necesario realizar análisis repetidos de alícuotas de la misma muestra. Es importante incluir muestras de control de calidad (CC) con valores normales y anormales para garantizar que el método se controla a diferentes niveles de un determinado analito. Efectuar una prueba con valores anormales permite hacer más evidentes aquellos cambios poco significativos en un proceso analítico.

El material de control y las muestras de prueba deben tener propiedades similares y se deben analizar al mismo tiempo. Es más probable que los materiales de control de calidad de origen humano se asemejen más a las muestras de prueba humana. Todos los viales o alícuotas del material de control deben ser prácticamente idénticos, para evitar que toda variación en los resultados de la prueba sea una consecuencia de una variación en los viales.

También es importante que el material de control de calidad se mantenga estable durante el período previsto para su uso. En cuanto a las pruebas y ensayos hemostáticos, las muestras de plasma deben someterse a ultracongelación (de ser preferible, a  $-35^{\circ}\text{C}$  o menos) o liofilización para que se mantengan estables y se las pueda usar como material de CC. Para reconstituir las muestras liofilizadas, es importante colocarlas en agua destilada con un pH de entre 6,8 y 7,2, y dejarlas al menos cinco minutos.



Si se utiliza material de CC de tipo comercial, este se debe reconstituir de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando un sistema de pipeteado exacto. Si se utiliza material de control de calidad sometido a ultracongelación, este se debe descongelar rápidamente a 37 °C durante cinco minutos. Al seleccionar el material de CC, se debe tener en cuenta el riesgo de transmisión de virus en sangre. No usar material de alto riesgo.

Se debe incluir al menos un material de CC con cada grupo de ensayos o pruebas de rastreo. Para las pruebas de rastreo, lo más apropiado es incluir material de CC normal y probar materiales de CC anormales una vez por día o por turno, o bien cuando exista duda de si un método está bajo control. Para obtener una guía sobre cómo solucionar problemas relacionados con el tiempo de protrombina (TP) o problemas sobre el control interno de calidad en el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) cuando se analizan dos niveles diferentes, ver la figura 5.1 a continuación.

**Figura 5.1. Solución de problemas relacionados con el control interno de calidad**

CIC de TP Nivel 1	CIC de TP Nivel 2	CIC de TTPA Nivel 1	CIC de TTPA Nivel 2	Conclusión / Verificación
Fuera de nivel	Dentro del nivel	Dentro del nivel	Dentro del nivel	Material de CIC de TP Nivel 1
Fuera de nivel	Fuera de nivel	Dentro del nivel	Dentro del nivel	Reactivo de TP
Dentro del nivel	Dentro del nivel	Fuera de nivel	Dentro del nivel	Material de CIC de TTPA Nivel 1
Dentro del nivel	Dentro del nivel	Fuera de nivel	Fuera de nivel	Reactivo de TTPA
Fuera de nivel	Fuera de nivel	Fuera de nivel	Fuera de nivel	Instrumento

Se recomienda usar material de CC con nivel reducido en las pruebas de diagnóstico y monitoreo de estados de deficiencia congénita asociados con hemorragia.

En todos los casos, el material de control y las muestras de prueba deben recibir, en lo posible, exactamente el mismo tratamiento. Como necesariamente surgirá alguna variación debido a la variación biológica, técnica y analítica, cada resultado del control de calidad se debe registrar y evaluar comparándolo con el rango que se considera aceptable, según se describe a continuación.

### LÍMITES ACEPTABLES DE VARIACIÓN

Para el control interno de calidad de tipo comercial, los fabricantes de muestras proveen un rango esperado de valores aceptables. En el caso de pruebas de rastreo y ensayos ocasionales, los resultados dependerán de los

reactivos y del sistema de detección del punto final utilizados para realizar las pruebas. El rango esperado debe tener en cuenta estos efectos. Cuando no existe un rango esperado para una determinada técnica, se lo puede determinar en el laboratorio.

El material de CIC se prueba repetidas veces (como mínimo 10) en días diferentes cuando se sabe que el método está bajo control (como se indicó, por ejemplo, dentro de los resultados esperados y en un material de CC alternativo).

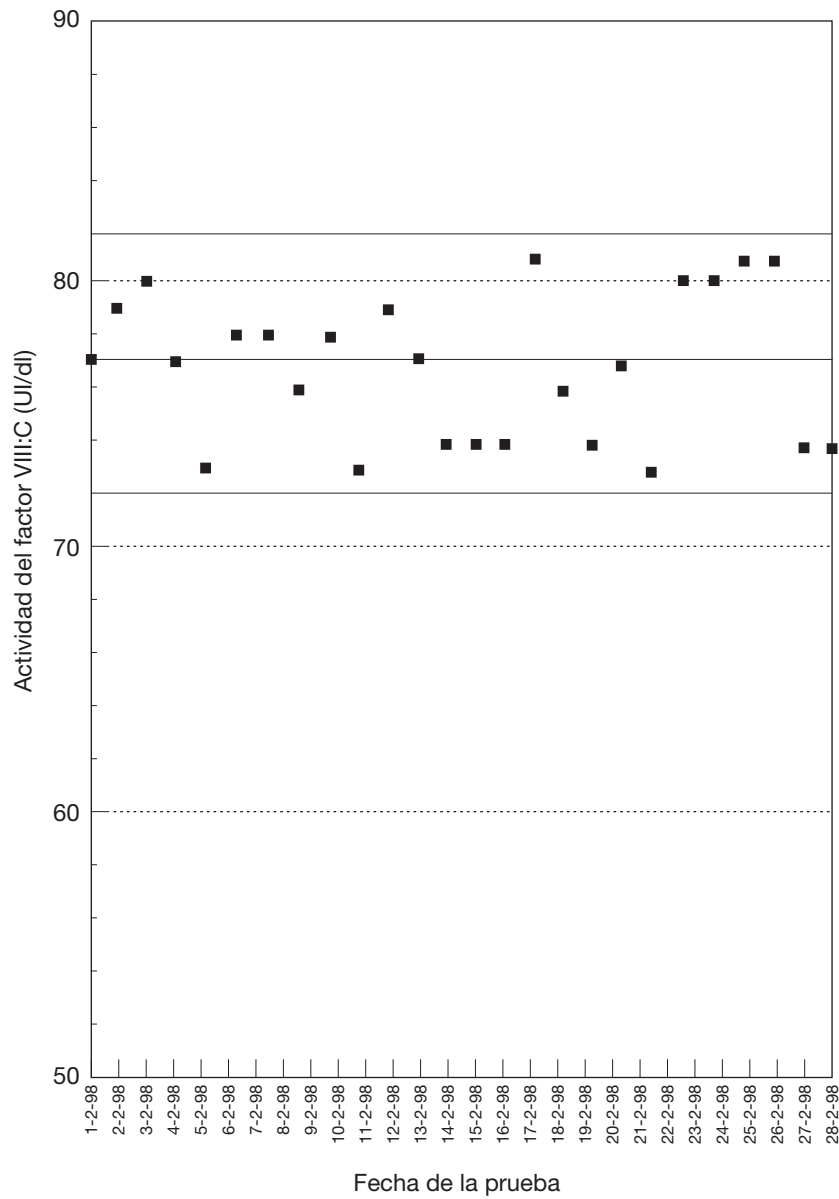
Luego se calculan la media y la desviación estándar (DE) de estos resultados. La DE es la raíz cuadrada de la suma de  $d^2$  dividida por  $n-1$ , donde  $d$  es la diferencia de los resultados individuales respecto de la media y  $n$  es la cantidad de determinantes. La DE se corresponde con el margen (*spread*) de resultados: cuanto más grande es la DE, mayor es el margen de resultados. Otro parámetro importante es el coeficiente de variación (CV), que es la DE expresada como un porcentaje de la media ( $CV = DE$  dividida por la media, multiplicado por el 100%). El coeficiente de variación de los resultados obtenidos en días diferentes para el tiempo de protrombina y los tiempos de tromboplastina parcial activada de una muestra de control de calidad siempre debe ser menos del 8% y, preferiblemente, inferior. Para ensayos como los factores VIII:C y factor IX, se deberían lograr coeficientes de variación de menos del 10% para pruebas realizadas a lo largo de varios días.

En la mayoría de los casos, los resultados obtenidos para una muestra de CIC mostrarán una distribución normal (de Gauss). Es una práctica común fijar el rango esperado para los resultados de CIC como la media  $\pm 2$  DE, pues esto abarcaría el 95% de los valores.

Los resultados individuales se deben registrar en un cuadro que identifique el rango esperado. En la figura 5.2 se muestra un ejemplo. Los valores futuros que estén dentro de estos límites se considerarán aceptables.

Los resultados que estén fuera de este rango indican que el material de control de calidad se ha deteriorado o se ha manipulado en forma incorrecta, o que el control del método no es el adecuado. En ese caso, la repetición de pruebas de más material de CC permitirá diferenciar entre estas dos posibilidades; si los resultados siguen dando fuera del rango, se confirma que el sistema de prueba está fuera de control. El desvío a mediano o largo plazo de los resultados, por ejemplo, por el deterioro o cambio de un instrumento o reactivo, se advertirá al examinar los cuadros acumulados de los registros.

**Figura 5.2. Resultados de los ensayos del factor VIII:C en una muestra de control interno de calidad sujeta a ensayo durante diferentes días**



Cada punto es un ensayo diferente en el mismo material. Las líneas continuas representan la media y se considera que las dos desviaciones estándar de 20 ensayos en este material representan los límites de resultados aceptables.

# 6

## Técnica de inclinación manual del tubo de ensayo

Si bien existen y se utilizan en todo el mundo muchos instrumentos diferentes para realizar pruebas de coagulación (ver el capítulo 41 sobre automatización), muchos centros continúan utilizando con éxito la técnica de inclinación manual del tubo de ensayo. Aun cuando se usa la automatización, puede ser necesario realizar algunas pruebas en forma manual debido a la incompatibilidad que puede surgir, en algunas ocasiones, entre una muestra y el instrumento específico en uso. Esto puede ocurrir en casos donde aparecen altísimas concentraciones de lípidos en plasma, durante el análisis de muestras ictericas o cuando existe una marcada diferencia entre el patrón de formación de coágulo de la muestra y el de las muestras normales, en especial cuando hay una marcada reducción de la concentración de fibrinógeno.

Las pruebas de coagulación manual se realizan mejor en tubos de ensayo de vidrio. El tamaño conveniente es de 75 mm × 10 mm. Hay diferentes tipos de vidrio que se pueden utilizar, pero pueden influir en los tiempos de coagulación obtenidos, en especial en las pruebas de rastreo, como la del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA). Si cambió el fabricante o la composición de los tubos de ensayo, es posible que ese cambio haya influido en los resultados. Se recomienda realizar unas pocas pruebas, como las de TTPA, con los dos tipos de tubo para comparar los resultados. Si surgen diferencias sistemáticas, se debe establecer un nuevo rango de normalidad. En lo posible, no lavar y reutilizar los tubos de ensayo.

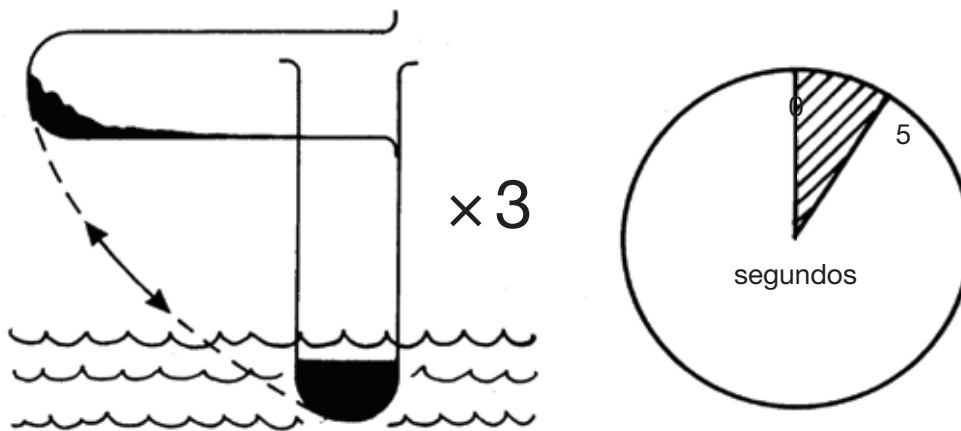
Debido a las muchas variables y posibles fuentes de contaminación asociadas con las técnicas manuales, estas pruebas se deben hacer por duplicado. En cualquier caso, si los tiempos de coagulación de las pruebas por duplicado difieren en más del 10%, la prueba se debe repetir.

Cuando se usa la técnica de inclinación manual del tubo de ensayo, es importante tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Los reactivos se deben precalentar a 37 °C durante al menos cinco minutos antes de usarlos en las pruebas de coagulación.
- El plasma y el reactivo de la prueba se deben mezclar de inmediato una vez que se añade el último de los componentes de la mezcla. Para ello se debe agitar el tubo de ensayo de manera rápida y controlada de uno a dos segundos, a la vez que se pone en marcha un cronómetro.

- Luego la mezcla se debe inclinar a 90° tres veces cada cinco segundos, observándola mientras se registra el tiempo de coagulación. Este procedimiento se muestra en la figura 6.1.
- Se debe sumergir el tubo de ensayo en un baño de María a 37°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ) entre cada inclinación de modo tal que la base del tubo de ensayo quede aproximadamente a 3 o 4 cm por debajo de la superficie. Esto permitirá mantener la temperatura de la mezcla de incubación lo más cerca posible de los 37°C.
- La mezcla de coagulación se debe examinar visualmente bajo una lámpara de luz blanca o fuente de luz similar y se debe registrar el tiempo de coagulación.

**Figura 6.1. Técnica de inclinación manual del tubo de ensayo para pruebas de coagulación**



Inclinar tres veces cada cinco segundos

# 7

## Preparación y calibración de un pool de plasma normal (PPN)

**Figura 7.1. Extracción de plasma normal de varios donantes**

<b>Donantes</b>	Como mínimo 20 personas sanas que no tomen medicación que pueda interferir con los factores de coagulación y la reacción de coagulación. Se admiten mujeres que tomen anticonceptivos orales. Es conveniente que sea aproximadamente la misma cantidad de hombres y mujeres, en un rango etario de entre 20 y 50 años.
<b>Anticoagulante</b>	Citrato de trisodio dihidratado 0,109M (3,2%) tamponado con ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano sulfónico (HEPES, por su denominación en inglés) a 5 g por 100 ml de citrato de trisodio.
<b>Extracción</b>	La sangre se debe extraer entre las 9:00 y las 11:00, utilizando jeringas de plástico desechables de 60 ml y agujas mariposa de 21 g.

### MÉTODO PARA PREPARAR UN POOL DE PLASMA NORMAL

- 1 Extraer 54 ml de sangre y mezclarla con 6 ml de anticoagulante en recipientes de plástico.
- 2 Conservar la muestra en hielo con agua mientras se prepara el pool de plasma.
- 3 Centrifugar a 4 °C durante 15 minutos a 2500 g.
- 4 Colocar el plasma de los distintos donantes en un recipiente de plástico libre de contacto.
- 5 Fraccionar en alícuotas de 0,5 ml y colocar en viales de plástico de 1,5 ml.
- 6 Congelar sumergiendo en hielo seco/CO<sub>2</sub> sólido, si hay. O bien, colocar de inmediato en una vitrina refrigerada a -70 °C.
- 7 Completar el procedimiento anterior dentro de las cuatro horas.
- 8 Se mantiene estable a -70 °C durante > seis meses.

El pool de plasma normal (PPN) preparado de esta forma tendrá niveles de factores II, V, VII, IX, X, XI, XII, cininógeno de alto peso molecular (KAPM) y precalicreína de alrededor de 1 U/ml o 100 U/dl, aun cuando los niveles de factor VIII y factor de von Willebrand (FvW) varían ampliamente en diferentes pools de plasma normal. Este PPN preparado en el laboratorio debe ser calibrado en unidades internacionales (UI), ya que actualmente disponemos de estándares internacionales para todos los factores de coagulación antes mencionados, excepto el factor XII. El pool se puede utilizar sin calibrar, asumiendo una potencia de 100 U/dl o 1 U/ml para el factor XII. Para calibrar en UI, es necesario obtener preparados calibrados según los estándares de referencia de la OMS (que se conservan en el National Institute for Biological Standards and Control, South Mimms, Potters Bar, Herts, Reino Unido) o bien adquirir un plasma de referencia adecuado, de tipo comercial, que haya sido calibrado en UI por el fabricante. Se debe tener en cuenta la necesidad de reemplazar dicho pool de plasma cada 12 a 18 meses, a menos que los resultados del control interno de calidad aseguren que se mantiene estable.

#### **MÉTODO PARA CALIBRAR PPN PREPARADO EN EL LABORATORIO (LOCAL)**

---

- 1** Obtener un estándar calibrado, por ejemplo, un Estándar Internacional (EI) de la OMS (WHO International Standard) (como mínimo dos viales).

---

- 2** En dos días diferentes, utilizar un vial de EI y cuatro alícuotas de PPN local.

---

- 3** El día uno analizar EI, local, local, local, local, EI y repetir usando diluciones frescas de cada plasma.

---

- 4** El día dos analizar local, local, EI, EI, local, local, y repetir usando diluciones frescas de cada plasma.

---

- 5** Calcular la potencia de cada alícuota de estándar local comparándola con el promedio de los resultados obtenidos con los dos estándares internacionales.

---

El resultado de la media de 4 alícuotas  $\times$  2 diluciones  $\times$  2 días ( $n = 16$ ) se establece como la potencia del estándar local.



# 8

## Cómo determinar un rango de referencia normal

Para interpretar correctamente el resultado de una prueba de laboratorio, es importante tener datos sobre los resultados de la prueba en personas aparentemente sanas. La salud no es un estado bien definido y en general es un concepto relativo. En algunos casos, el grupo ideal podría ser uno que concuerde lo más posible con la población que se está investigando en cuanto a edad, sexo y, en el caso de FVIII/FvW, grupo sanguíneo ABO.

Sin embargo, para muchas pruebas de coagulación no es necesario realizar una selección tan cuidadosa. En la práctica, seleccionar personas sanas para determinar un rango normal dependerá de cuestiones prácticas. Se puede recurrir a empleados del hospital sanos, que no estén recibiendo medicación, donantes de sangre sanos y familiares asintomáticos de pacientes adultos que estén bajo investigación. En cuanto a los rangos normales, existen varias cuestiones importantes, que se señalan más adelante.

El estado de las personas normales en el momento en que se extrae sangre puede influir en los resultados que se obtengan. Recientemente se revisaron algunas de estas variables preanalíticas en una guía de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH, por su sigla en inglés) que se refería a temas de salud femenina (Blomback et al. 2007). Se revisó evidencia respecto de los efectos del estrés físico (por ejemplo, el FVIII/FvW aumentó 2,5 veces y persistió hasta 10 horas), el estrés mental (el FVIII y FvW aumentaron luego de un episodio de estrés mental agudo), los efectos hormonales, las variaciones circadianas, los efectos de la postura y la dieta. Se dieron las siguientes recomendaciones generales, que no se limitan a la investigación de pacientes mujeres:

- Abstenerse del ejercicio físico intenso durante las 24 horas previas a la venopunción.
- Usar un ambiente con menor estrés físico y mental.
- Abstenerse de consumir grasas y de fumar en la mañana de la venopunción.
- Obtener las muestras a la mañana temprano (de 7:00 a 9:00), después de que la persona haya estado sentada en una posición relajada durante 20 a 30 minutos.

El rango normal siempre se determina en el laboratorio. Las publicaciones y la información del fabricante solo se deben usar como guía.

Las muestras normales se extraen, se procesan y analizan utilizando técnicas lo más idénticas posibles a las que se aplicaron en las muestras de los pacientes.

Para las pruebas de rastreo en particular (TP, TTPA), tener en cuenta la posibilidad de que un lote nuevo de reactivos del mismo fabricante tenga un rango normal diferente del material similar usado anteriormente. Se deben examinar cuidadosamente los datos de control interno de calidad que se superpongan con algún cambio. Los cambios indican la necesidad de establecer un rango normal diferente.

Para los ensayos, tener en cuenta que las publicaciones y la información del fabricante solo se deben usar como guía. Las técnicas de ensayo más adecuadas son aquellas en las que el rango normal determinado en el laboratorio es ampliamente similar al rango que aparece en las publicaciones.

Los rangos normales de algunas pruebas de coagulación son diferentes en los recién nacidos (nacidos en término o prematuros) y en los niños comparados con los adultos (Andrew et al. 1987, 1990, 1992).

Los rangos normales, en especial los de las pruebas de rastreo, se deben usar solo como complemento para la información clínica. En el caso de pacientes con una historia familiar y personal que amerita una prueba de rastreo, se requerirán más investigaciones si la prueba da resultados normales. En ciertos pacientes con pruebas de rastreo anormales, es posible que no se realicen más investigaciones cuando la causa de la anormalidad es evidente. Por lo tanto, los límites normales no siempre se correlacionan con los límites de decisión e intervención.

Existen razones estadísticas por las que se necesitan al menos 120 personas normales para construir un rango de referencia totalmente válido, pero a los fines prácticos se puede obtener una aproximación cercana haciendo una prueba con una cantidad mucho menor, que varios expertos en el campo consideren aceptable a los fines clínicos (*Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI 2008*). Para pruebas de hemostasia relacionadas con la investigación de trastornos de la coagulación, se debe elegir al menos 30 personas normales.

Cuando se construyen rangos normales, las muestras se deben extraer, procesar y analizar en el laboratorio utilizando técnicas idénticas a las utilizadas para analizar las muestras del paciente. Si la práctica normal es conservar las muestras sometidas a ultracongelación para luego analizarlas por lote, se debe hacer lo mismo con las muestras normales. Si las muestras de los pacientes son procesadas luego de una demora de varias horas en las que fueron transportadas al laboratorio, se deberá producir una demora similar entre la extracción y el análisis de las muestras de las personas normales, que servirá como intervalo de referencia. Las publicaciones y la información del fabricante del reactivo solo se deben usar como guía.

Para cada prueba, el rango de referencia normal se construye a partir de los resultados obtenidos de las muestras de personas de salud normal. La

distribución de los resultados de la mayoría de las pruebas que investigan los trastornos de la coagulación muestra una distribución normal o de Gauss. Es útil confirmarlo mediante la inspección visual de los datos en un gráfico, como se ve en la figura 8.1. Aquellos valores que, en forma clara y sorprendente, se alejan de todos los demás valores de referencia son probablemente atípicos, por lo que es conveniente excluirlos de los cálculos futuros.

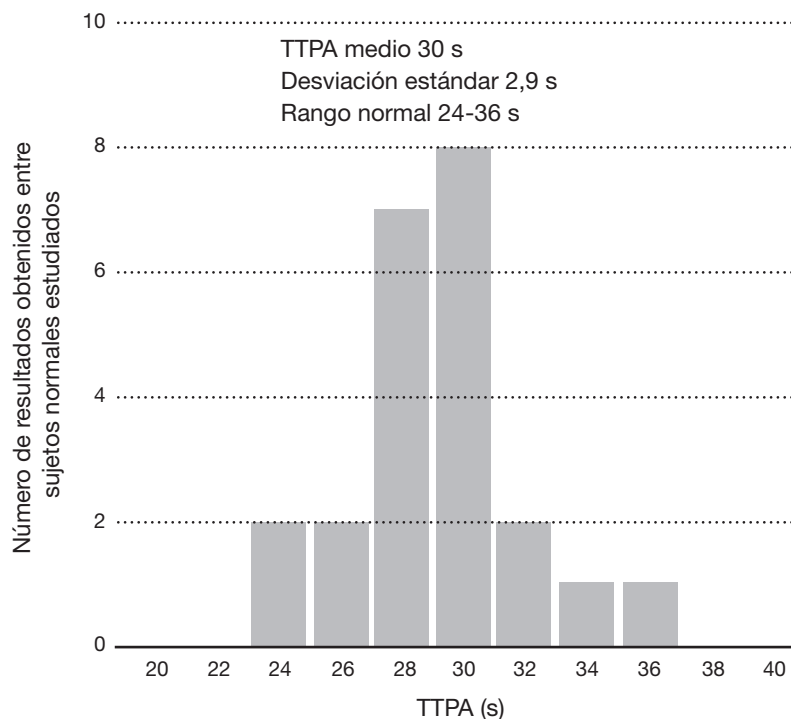
La convención más aceptada es que el rango normal o de referencia incluya el 95% de los valores centrales. Si la distribución difiere notablemente de lo que se ve en la figura 8.1 (por ejemplo, se ve sesgada en una dirección) será necesario tomar más muestras normales. Es conveniente excluir el 2,5% de los valores de cada extremo, dejando el 95% central.

Si la distribución es normal, es conveniente calcular la media y la desviación estándar de los valores normales (como se describe en el capítulo 5) y usar la media más 2 DE y la media menos 2 DE como límite superior y límite inferior, respectivamente.

Cualquiera sea el caso, el rango normal se debe utilizar solo como guía y ayuda a la interpretación clínica.

Para un tratamiento más completo sobre la determinación de rangos de referencia, consultar CLSI (2000).

**Figura 8.1. Distribución de los resultados del TTPA en personas aparentemente sanas**



Importante: Los datos muestran una distribución normal, con una distribución pareja a cada lado del valor de la media.

## BIBLIOGRAFÍA

- Andrew M, Paes B, Johnston M. Development of the hemostatic system in the neonate and young infant. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 1990; 12:95-104.
- Andrew M, Paes B, Milner R, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987; 70:165-72.
- Andrew M, Vegh P, Johnston, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992; 80:1998-2005.
- Blomback M, Konkle BA, Manco-Johnson MJ, Bremme K, Hellgren M, Kaaja R on behalf of the ISTH SSC on Women's Health Issues. Preanalytical conditions that affect coagulation testing, including hormonal status and therapy. *Thromb Haemost* 2007; 5:855-858.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: Approved guideline*, 2nd ed. 2000; Clinical and Laboratory Standards Institute Document C28-A2.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-stage prothrombin time (PT) test and activate partial thromboplastin time (APTT) test: Approved guideline*, 2nd ed. 2008; Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.

# 9

## Reactivos

### **CLORURO CÁLCICO**

Por ejemplo, el de la empresa BDH Chemicals. Solución molar.

Solución 25mM: diluir 25 ml de una solución 1M hasta completar 1 litro en un frasco volumétrico con agua destilada.

### **TAMPÓN BARBITÚRICO DE OWREN pH 7,35**

Dietilbarbiturato de sodio (barbital sódico) 5,875 g

Cloruro sódico 7,335 g

- 1 Colocar en un frasco volumétrico y disolver en aprox. 780 ml de agua destilada.
- 2 Añadir 215 ml de ácido hidroclicóricó 0,1M.
- 3 Ajustar el volumen hasta completar 1 litro con agua destilada.
- 4 Verificar el pH y ajustar el pH a 7,35, de ser necesario.

### **TAMPÓN SALINO DE OWREN**

Tampón barbitúricó de Owren 200 ml

Solución salina normal (0,9 g% cloruro sódico) 800 ml

### **TAMPÓN DE GLIOXALINA**

Glioxalina (imidazole) 2,72 g

Cloruro sódico 4,68 g

- 1 Colocar en un frasco volumétrico y disolver en aprox. 650 ml de agua destilada.
- 2 Añadir 148,8 ml de HCl 0,1M y ajustar el pH a 7,3.
- 3 Ajustar el volumen hasta completar 1 litro con agua destilada, de ser necesario.

## REACTIVOS PARA PRUEBAS DE RASTREO

En las primeras etapas de la investigación y diagnóstico de los trastornos de la coagulación, es sumamente importante seleccionar y aplicar los reactivos apropiados para las pruebas de rastreo, en especial para las pruebas de tiempo de protrombina (TP) y de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA). Existen muchos reactivos diferentes en todo el mundo. Cuando se dispone de una amplia selección, se debe tener en cuenta la variación que pueden producir en la sensibilidad. Al investigar un trastorno de la coagulación mediante pruebas de rastreo como TP y TTPA, se deben tener en cuenta las siguientes fuentes de información relacionadas con los probables resultados de un determinado reactivo:

- los datos comparativos en relación con otros reactivos, según surge de los programas de evaluación externa de la calidad, como el programa IEQAS (ver capítulo 5) ;
- los datos publicados;
- las pruebas de plasma realizadas en el laboratorio a pacientes con defectos conocidos;
- las hojas de datos de los fabricantes.

La producción de reactivos en el laboratorio para pruebas de TP y TTPA puede ser atractiva desde el punto de vista financiero, pero puede ocasionar dificultades con la estandarización, por lo tanto es mejor evitarla.

Algunos fabricantes ofrecen diferentes reactivos. Además, un reactivo puede cambiar periódicamente su composición y a la vez mantener el mismo nombre. Esto significa que no se pueden hacer recomendaciones sobre el uso de un determinado producto o material.

# 10 Recuento de plaquetas

## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La sangre se mezcla con un diluyente que hemoliza los glóbulos rojos. El líquido diluido se coloca en un hemocitómetro y luego se cuentan las plaquetas en el microscopio, usando contraste de fases, si es posible.

## MATERIALES/EQUIPAMIENTO

- Cámara de recuento delgada, de fondo plano (hemocitómetro de contraste de fases con grillas de Neubauer).
- Microscopio de contraste de fases equipado con condensador de fases de larga distancia de trabajo; si no, un microscopio óptico corriente.
- Pipeta de 20  $\mu$ l.
- Pipeta graduada de 2 ml.
- Tubo de 12  $\times$  75 mm.
- Mezcladora mecánica.

## REACTIVO

Fluido diluyente: oxalato de amonio 1% en agua destilada.  
Conservar en el refrigerador y siempre filtrar inmediatamente antes de usar.

## ESPÉCIMEN

Si la muestra se extrae por digitopunción, la punción debe ser limpia y la sangre debe fluir libremente. Desechar la primera gota de sangre. Si la muestra de sangre se obtiene por venopunción, se debe extraer con una jeringa seca de plástico (o de vidrio siliconado) con una aguja corta, mínimo calibre 21. La aguja se debe retirar antes de pasar la sangre a un recipiente de plástico con anticoagulante EDTA. La sangre y el anticoagulante se deben mezclar de inmediato y en forma suave para evitar que se forme espuma.

## MÉTODO

- 1 Pipetear 0,38 ml de fluido diluyente en un tubo de ensayo.
- 2 Llenar la pipeta de 20  $\mu$ l hasta la marca y limpiar la parte externa de la pipeta.



- 3 Volcar el contenido de la pipeta en el fluido diluyente y enjuagar la pipeta extrayendo la sangre y volcándola dentro del tubo varias veces. Mezclar durante al menos 10 minutos a mano o, de ser posible, con mezcladora mecánica.
- 4 Llenar el hemocitómetro, como se describe a continuación.
- 5 Cubrir la cámara con una placa de Petri de 10 a 20 minutos para permitir que las plaquetas se asienten. Dejar papel de filtro o algodón húmedo en la placa para evitar la evaporación.
- 6 Usando un microscopio, contar las plaquetas en los cuadrados grandes de 1 mm (= 0,1  $\mu$ l). Contar las plaquetas en todos los cuadrados que sean necesarios para llegar a contar al menos 100. Las plaquetas se ven redondas u ovaladas y debido a su estructura granular interna y su lustre púrpura es posible distinguirlas de los residuos. En el fondo se ven restos de glóbulos rojos que han sido descompuestos por el oxalato de amonio. Si no se dispone de contraste de fases, se puede utilizar un microscopio óptico corriente, siempre que se baje el condensador para disminuir la intensidad de la luz.
- 7 Calcular la cantidad de plaquetas por litro de sangre de acuerdo con la fórmula que aparece más abajo.

## EL HEMOCITÓMETRO

La cámara de recuento del hemocitómetro, con grilla de Neubauer o de Neubauer mejorada, está construida de modo tal que la distancia entre la cara inferior del cubreobjetos y la superficie de la cámara sea de 0,1 mm. La superficie de la cámara contiene dos áreas grilladas de dimensiones específicas tal como se ilustra en la figura 10.1. El área central de 1 mm<sup>2</sup> tiene líneas dobles o triples que marcan los bordes. En las áreas centrales hay 25 cuadrados en la grilla de Neubauer mejorada y 16 cuadrados en la grilla de Neubauer. Cada cuadrado tiene un área de 0,04 mm<sup>2</sup> (0,2 × 0,2 mm). Estos cuadrados, a su vez, están divididos en cuadrados más pequeños, cada uno de 0,0025 mm<sup>2</sup> (0,05 × 0,05 mm). Los cuadrantes externos del área grillada son de 1 mm<sup>2</sup> cada uno y están divididos en 16 cuadrados.

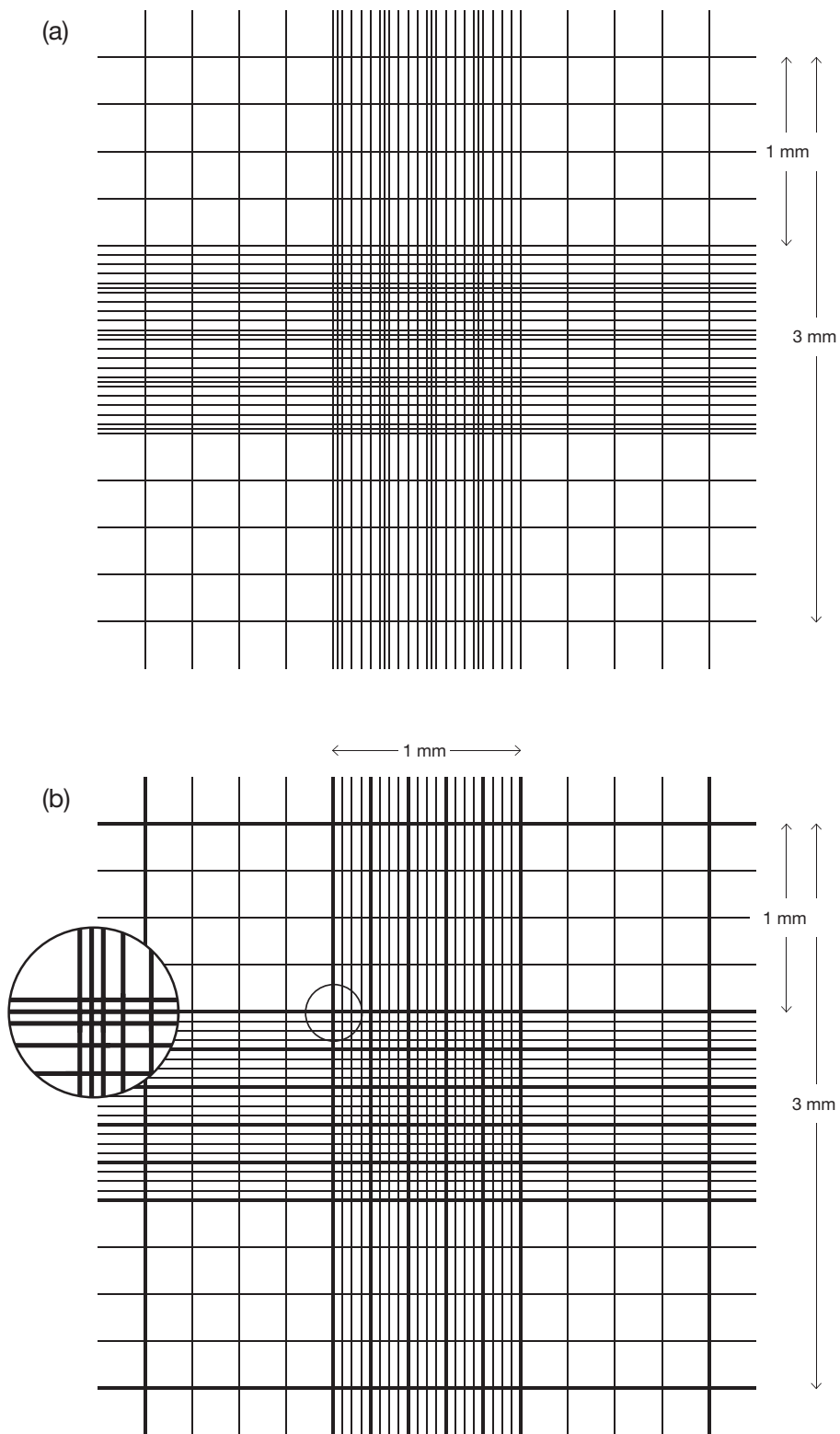
## CÁLCULOS

La fórmula para efectuar el recuento plaquetario es la siguiente:

$$\text{Recuento (células/l)} = N \times D/A \times 10 \times 10^6$$

- Donde
- N = cantidad total de células contadas
  - D = dilución
  - A = área total contada (en mm<sup>2</sup>)
  - 10 = factor para calcular el volumen en  $\mu$ l desde el área (en mm<sup>2</sup>) y la profundidad de la cámara (0,1 mm)
  - 10<sup>6</sup> = factor para convertir el recuento/ $\mu$ l en recuento/l

Figura 10.1. Cámara de recuento del hemocitómetro (a) Neubauer y (b) Neubauer mejorado



## FUENTES DE ERROR EN EL RECuento DE CÉLULAS

Cuando se utiliza sangre capilar, se debe obtener una gota que fluya libremente.

Cuando se utiliza sangre anticoagulada, se debe mezclar el espécimen cuidadosamente invirtiendo el tubo de sangre al menos 20 veces antes de tomar la muestra. No sacudir el tubo, porque al sacudirlo se produce espuma, que impedirá usar la pipeta con exactitud. Inclinar el tubo bien mezclado a un ángulo de 45° o apenas más, y con la pipeta tomar la muestra desde el borde del tubo, siguiendo los mismos procedimientos que para la sangre capilar.

Las pipetas para la toma de muestras de sangre deben estar limpias y secas.

Llenar la pipeta aspirando la sangre rápidamente y con exactitud, mediante un mecanismo de succión que se sujeta a la pipeta, hasta alcanzar la línea deseada. Si se sobrepasa levemente la línea, la sangre en exceso se puede eliminar apoyando el borde de la pipeta sobre papel de filtro o papel tisú suave. Si se sobrepasa mucho la línea, usar una pipeta limpia.

No debe haber burbujas de aire en la columna de sangre.

Se debe limpiar la parte externa de la pipeta para que no quede sangre (con cuidado de que no caiga sangre del borde) antes de introducirla en el fluido diluyente.

Una vez que se ha descargado el contenido de la pipeta en el diluyente, se debe succionar la mezcla a la pipeta varias veces, con succión pareja, para asegurarse de que se ha descargado toda la sangre en el fluido.

Sacudir ligeramente el tubo con la sangre diluida durante al menos dos minutos a mano o, de ser posible, en un agitador mecánico. Una vez que se ha agitado el tubo, se procederá de inmediato a llenar la cámara mediante una pipeta Pasteur o un tubo capilar.

La cámara se llena por acción capilar, regulando el paso del fluido desde la pipeta o tubo capilar de modo de lograr un llenado rápido y suave. Debe llenarse por completo, pero sin que el fluido rebase y caiga en los fosos. Dejar asentar las células en el área de recuento de 10 a 20 minutos, y luego proceder a contarlas.

La cámara del hemocitómetro y el portaobjetos deben estar limpios y secos antes de usarlos. Las marcas de huellas digitales o una película grasosa pueden causar errores importantes.

Se debe contar una cantidad suficiente de células para reducir el margen de error que puede producir una distribución de células aleatoria. En la práctica, se deben contar al menos 100 células. Al verificar otra vez la correcta distribución de las células en la cámara, la cantidad de células que se cuenta en cada área (es decir, en los cuadrados grandes) no debería diferir en más del 10%.

## CONTROLES

Se deben realizar dos diluciones y tomar la media de los dos recuentos; los dos recuentos deben coincidir dentro del 10%.

## FUENTES DE ERROR EN EL RECuento DE PLAQUETAS

Es preferible usar sangre obtenida mediante venopunción que sangre capilar, porque las plaquetas se adhieren a la herida y no siempre es posible reproducir las sucesivas diluciones de sangre obtenida por digitopunción.

Hasta aquí se describieron los errores generales en el uso de la pipeta y en hemocitometría. También se debe prestar especial atención a la cámara de recuento y asegurarse de que esté completamente limpia, ya que la suciedad y los residuos se podrían contar como plaquetas. Lavar la cámara con agua jabonosa, enjuagar con agua destilada, dejar que desagüe completamente y secar con papel tisú que no deje pelusa. Asegurarse de que el portaobjetos esté limpio antes de usarlo.

La presencia de cúmulos de plaquetas impide que el recuento sea confiable. Si la muestra contiene cúmulos, se debe tomar una nueva muestra.

El oxalato de amonio que se usa como diluyente se debe mantener refrigerado y desechar si hay evidencia de contaminación bacteriológica.

El espécimen se debe contar dentro de las tres horas de la extracción.

## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

El tiempo de sangrado es el tiempo que tarda en dejar de sangrar un corte estándar de la piel de determinada profundidad y longitud.

El tiempo de sangrado se alarga en pacientes con trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand, trombastenia de Glanzmann, síndrome de Bernard-Soulier, enfermedad del pool de almacenamiento y otros trastornos plaquetarios. Para que el tiempo de sangrado sea normal se requiere fibrinógeno y se ha sugerido que el factor V también juega un papel importante. Por lo tanto, el tiempo de sangrado puede alargarse en pacientes con deficiencia de fibrinógeno o de factor V y también en algunos pacientes con enfermedades renales, disproteinemias, o trastornos vasculares.

## MATERIALES/EQUIPAMIENTO

- Tensiómetro
- Hisopos
- Dispositivo de tiempo de sangrado
- Papel de filtro de 1 mm de grosor
- Cronómetro

## MÉTODO

- 1 El brazalete del tensiómetro se coloca alrededor de la parte superior del brazo y se infla hasta alcanzar 40 mm de mercurio. Mantener esta presión durante toda la prueba.
- 2 Se limpia la superficie dorsal del antebrazo y se coloca el dispositivo de tiempo de sangrado firme contra la piel sin presionar. Se aprieta el disparador y se pone en marcha el cronómetro.
- 3 Evitar las venas superficiales, las cicatrices y los moretones.
- 4 A intervalos de 30 segundos, tapar el flujo de sangre con papel de filtro. Acercar el papel de filtro a las incisiones sin tocar el borde de la herida.
- 5 Registrar el tiempo desde la punción hasta que se detuvo el sangrado.

## INTERPRETACIÓN

El rango normal en adultos es hasta ocho minutos pero puede variar de acuerdo con el método que se utilice.

## OBSERVACIONES

- Al momento de redactar esta edición, existen en el mercado dos dispositivos descartables para tomar el tiempo de sangrado. Se debe determinar un rango normal en el laboratorio, independientemente del dispositivo que se utilice.
- La incisión se debe realizar en dirección paralela a la longitud del brazo. Los cortes perpendiculares sangran más tiempo.
- Repetir los resultados anormales.
- No es necesario registrar los extremos si el sangrado continúa más de 20 minutos.
- Tener en cuenta el efecto de los medicamentos y su interferencia con la función plaquetaria. Por ejemplo, los que contienen aspirina pueden alargar el sangrado. Por eso se recomienda, en lo posible, no tomar medicamentos los siete días previos a la prueba.
- Existe la posibilidad de que quede una cicatriz en el lugar de la incisión. Se debe avisar a los pacientes antes de realizar la incisión.

## BIBLIOGRAFÍA

Mielke CH. Measurement of the bleeding time. *Thromb Haemost* 1984; 52:210-211.

## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Este ensayo establece la eficacia global de la vía extrínseca. Es sensible a los cambios de los factores V, VII y X y, en menor medida, del factor II (protrombina). No resulta adecuada para detectar cambios menores en el nivel de fibrinógeno. Sin embargo, el tiempo puede resultar anormal ante un nivel de fibrinógeno muy bajo o ante la presencia de un inhibidor. La sensibilidad del ensayo se ve influenciada por el reactivo y la técnica utilizados. Es por ello que es importante establecer un rango de referencia dentro del laboratorio.

La figura 12.1 muestra la vía que mide el tiempo de protrombina. El reactivo del TP, a menudo denominado *tromboplastina*, contiene factor tisular y fosfolípidos.

Existen diversos reactivos de venta comercial que pueden utilizarse. El capítulo 9 incluye la información necesaria para elegir los reactivos correctos.

## REACTIVOS

- Tromboplastina (que puede contener cloruro cálcico).
- Cloruro cálcico 25 mM (solo es necesario si el reactivo de tromboplastina no contiene calcio).

## MÉTODO: MANUAL

- 1 En los primeros dos tubos, colocar 0,1 ml de plasma normal y calentar hasta los 37 °C durante 2 minutos.
- 2 Añadir 0,2 ml del reactivo de tromboplastina (si el reactivo contiene calcio) precalentado (hasta los 37 °C).
- 3 Poner en marcha el cronómetro, mezclar y registrar los tiempos de coagulación.
- 4 Repetir para cada muestra de prueba.
- 5 Anotar el tiempo de coagulación del paciente en segundos.



Si se emplea la técnica manual, realizar todas las pruebas por duplicado. Los tiempos de coagulación duplicados no deben diferir entre sí en más del 10 %. Si se emplean métodos automatizados con un CV inferior al 5% de un ensayo a otro, por lo general bastará con efectuar una sola prueba siempre y cuando se controlen los resultados prolongados.

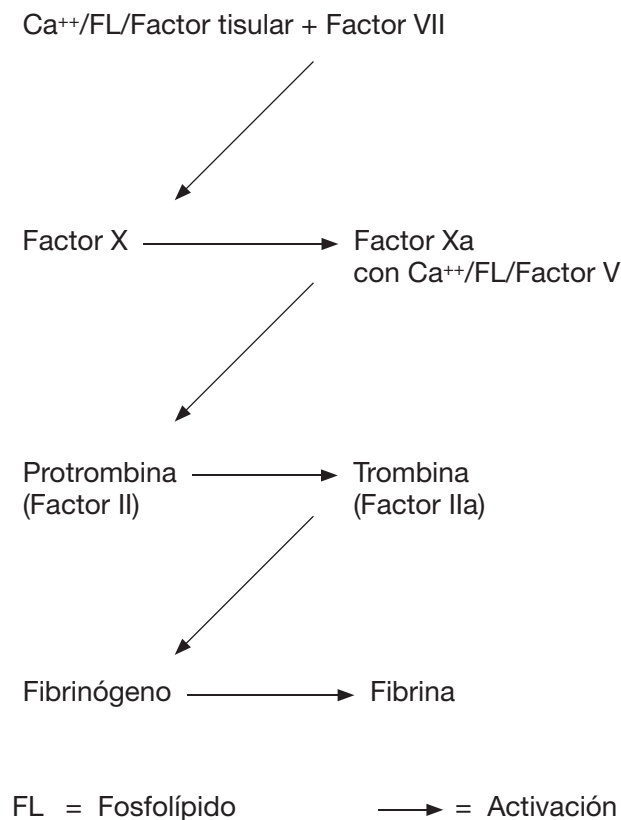
### OBSERVACIONES

- Si el reactivo de tromboplastina no contiene calcio, el procedimiento de la prueba se hará con 0,1 ml de plasma y 0,1 ml de tromboplastina y se coagulará con 0,1 ml de cloruro cálcico 25 mM precalentado.
- La activación del factor IX, mediante el factor tisular:FVII se produce *in vivo*. En las condiciones de la mayoría de las pruebas de TP, la activación del factor X es tan potente, que el ensayo no resulta sensible a la deficiencia de los factores IX u VIII.
- La tromboplastina o el cloruro cálcico deben ser precalentados entre 5 y 30 minutos antes de su uso.
- Los tiempos de coagulación por lo general varían según el coagulómetro que se emplee y en función de cómo y cuándo detecta el punto final. Esto subraya la importancia de establecer rangos normales para el método que se esté empleando en el laboratorio.
- Ante la presencia de una deficiencia leve de factores II, V, VII o X, el nivel de prolongación puede ser mínimo. En el caso de una deficiencia de factor II, el TP puede estar dentro del rango normal.
- Determinados reactivos del TP pueden verse afectados por la presencia de anticoagulantes lúpicos o anticuerpos antifosfolípidos, y ciertos tipos de anticuerpos poco comunes pueden prolongar el TP sin prolongar el TTPA. Es más probable que los reactivos afectados sean aquellos que tengan una concentración menor de fosfolípidos, incluso determinados reactivos que se constituyen lipidificando el factor tisular recombinante.
- La presencia de factor VII activado, ya sea como consecuencia de un tratamiento con recombinante VIIa o por activación del factor VII nativo, puede reducir el TP. El efecto depende del reactivo de factor tisular empleado. Los reactivos que contienen factor tisular bovino son especialmente susceptibles a dicho efecto (Kitchen et al. 1992). Las muestras de sangre no deben almacenarse entre 2 °C y 8 °C antes de la determinación del TP debido a que podría producirse la activación por frío del factor VII.
- La sangre completa para la determinación del TP puede permanecer estable durante al menos 24 horas, en función del reactivo empleado (Baglin y Luddington 1997).
- Los TP que se determinan con reactivos que contienen factor tisular humano pueden diferir de aquellos obtenidos con reactivos que contienen

factor tisular de otras especies, como el de conejo. En dichos casos, el resultado obtenido con los reactivos de factor tisular humano puede ser un claro indicio de riesgo hemorrágico.

- Para acceder a un análisis completo de los temas relacionados con la determinación del TP, consultar la norma CLSI (2008).

**Fig 12.1. Vía evaluada por la prueba del tiempo de protrombina**



## BIBLIOGRAFÍA

Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: implications for decentralised anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haem* 1997; 96:431-4.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-Stage Prothrombin time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test: Approved guideline*, 2nd ed. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.

Kitchen S, Malia RG, Preston FE. A comparison of methods for the measurement of activated factor VII. *Thromb Haemost* 1992; 68:301-5.

# 13

## Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA)

### FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La prueba de TTPA consiste en un análisis no específico de la vía intrínseca. Si el TTPA se mide junto con el tiempo de protrombina normal, resulta la prueba de rastreo más útil para detectar la deficiencia de los factores VIII, IX, XI y XII.

El TTPA será prolongado ante cualquier deficiencia que involucre a las vías comunes (deficiencias de factores V, X, II y, en menor medida, de fibrinógeno) y ante la presencia de inhibidores. La presencia de algunos inhibidores terapéuticos de la coagulación, como la heparina, también prolonga el TTPA. Es importante descartar la posibilidad de que estos tratamientos hayan sido empleados en la investigación inicial de los TTPA prolongados.

El TTPA también resulta prolongado ante la deficiencia de precalicreína (PKK) o de cininógeno de alto peso molecular (KAPM), a menos que la prueba utilice un reactivo que contenga ácido elágico como activador. En ese caso, el TTPA será normal, incluso ante la ausencia total de dichos factores.

La figura 13.2 muestra la vía medida por el TTPA.

### REACTIVOS

- Reactivo de TTPA
- Cloruro cálcico 25 mM

### MÉTODO

- 1 Colocar un tubo con cloruro cálcico a 37 °C, durante cinco minutos, antes de su utilización.
- 2 Pipetear 0,1 ml de reactivo de TTPA en dos tubos de coagulación de cristal a 37 °C.
- 3 Pipetear 0,1 ml de plasma control en el primer tubo.
- 4 Poner en marcha el cronómetro principal. Mezclar.
- 5 Añadir 0,1 ml de plasma control al segundo tubo. Mezclar.

- 6 Después de transcurrido el tiempo de incubación recomendado\*, añadir 0,1 ml de cloruro cálcico a un tubo después del otro y poner en marcha otro cronómetro para cada tubo. Mezclar. Anotar el tiempo de formación del coágulo.

Si se emplea la técnica manual, realizar todas las pruebas por duplicado. Los tiempos de coagulación duplicados no deben diferir entre sí en más del 10%. Para las pruebas automatizadas que presenten un coeficiente de variación entre ensayos inferior al 5%, normalmente será suficiente realizar una única réplica, siempre y cuando se verifiquen los resultados prolongados.

\*Deberán seguirse las recomendaciones del fabricante del reactivo. Por lo general, indican un rango de entre dos y cinco minutos. Es fundamental tomar exactamente el tiempo de incubación, debido a que las desviaciones en este sentido con frecuencia afectan los resultados, con lo cual las incubaciones más extensas dan como resultado tiempos de coagulación más breves con cualquier tipo de reactivo.

## INTERPRETACIÓN

Debe establecerse un rango normal para el ámbito local.

Un TTPA prolongado con un TP normal indica una posible deficiencia de factores VIII, IX, XI, XII, cininógeno de alto peso molecular, precalicreína, o la presencia de un inhibidor. En casos con TTPA prolongado, se deberá analizar una mezcla igual de plasma normal y plasma de prueba (es decir, una mezcla de 1 parte de plasma de prueba y 1 parte de plasma normal, a lo que se denomina *mezcla 50:50* más abajo). Si el TTPA corrige en más del 50% la diferencia existente entre los tiempos de coagulación del plasma normal y el plasma de prueba, indica la deficiencia de un factor. Una mala corrección sugiere la presencia de un inhibidor, posiblemente de uno de los factores de la coagulación del sistema, o del tipo no específico, como el anticoagulante lúpico (consultar el capítulo 25).

### Figura 13.1. Ejemplo de interpretación del TTPA

Muestra	Resultado
TTPA de control	35 segundos
Prueba	60 segundos
Mezcla 50:50	42 segundos (la corrección es buena, es decir que probablemente exista deficiencia de un factor)
Mezcla 50:50	52 segundos (la corrección es mala, lo que indica la probable presencia de un inhibidor)

## OBSERVACIONES

- Existe una gran cantidad de reactivos comerciales que resultan adecuados, entre los que se incluyen materiales con diferentes sensibilidades. La sección 9 incluye notas referentes a la selección de reactivos.
- Con respecto al TP, los tiempos de coagulación pueden verse influenciados por el uso del coagulómetro.
- En los plasmas de prueba, un nivel alto de un factor de coagulación puede compensar un nivel inferior de otros factores. Por ejemplo, un nivel muy elevado de factor VIII durante la fase aguda de reacción puede llevar a un TTPA normal ante la disminución del factor IX u XI, lo que puede ser de relevancia clínica. Si un paciente tiene una historia personal propia o familiar que sugiere algún trastorno de la coagulación, será razonable proceder a realizar investigaciones más complejas, como los ensayos de factor específicos, aunque el TTPA sea normal, en especial si el resultado se encuentra en la parte superior del rango de referencia.
- La concentración de fosfolípidos presenta notables variaciones de un reactivo a otro. Esta es una de las razones por las que la sensibilidad de los reactivos varía notablemente ante la presencia de anticoagulantes lúpicos. Si se emplea un reactivo sensible al lupus para el TTPA inicial, resultará útil llevar a cabo una segunda prueba de TTPA empleando un reactivo como Actin FS (Dade Behring, Marburg, Alemania), que tiene una concentración de fosfolípidos muy alta (Kitchen et al. 1999). Si la prolongación con el primer reactivo es provocada por el anticoagulante lúpico, el segundo TTPA resultará casi siempre normal, debido a que son muy pocos los anticoagulantes lúpicos que prolongan el TTPA cuando se utiliza Actin FS.

## INVESTIGACIÓN DE TTPA PROLONGADO AISLADO

Para los pacientes que tengan un tiempo de protrombina normal y un TTPA prolongado, la secuencia normal de investigación será la siguiente:

- 1 Determinar el tiempo de trombina (consultar el capítulo 15). Si es normal, continuar con los pasos 2 y 3. Si es prolongado, repetir con la presencia de sulfato de protamina (consultar el capítulo 16). Si el tiempo de trombina corrige hasta un parámetro normal, indica la presencia de heparina y las pruebas que se mencionan a continuación no resultarán necesarias. Si se desconoce si el paciente recibe algún tipo de heparina, se solicitará una muestra repetida.
- 2 Determinar el TTPA en mezclas de plasma normal y plasma del paciente (consultar el capítulo 14) utilizando una proporción de 1:1 (50%) de normal:paciente. La incapacidad de la mezcla al 50% de corregir el TTPA a un tiempo normal indica la presencia de un inhibidor.

- 
- 3 Determinar el TTPA con un segundo reactivo que contenga una alta concentración de fosfolípidos, como Actin FS (Dade Behring). Si el TTPA inicial es claramente prolongado (de al menos tres segundos por sobre el límite superior del tiempo normal correspondiente) y el de Actin FS es normal, es probable que la causa sea el anticoagulante lúpico. Esta probabilidad puede confirmarse más adelante mediante pruebas específicas como el tiempo del veneno de víbora diluido de Russell (DRVVT) (consultar el capítulo 38), si bien normalmente no resulta necesario ante la ausencia de requisitos de investigar el posible anticoagulante lúpico (AL) como factor de riesgo de la trombosis. En muy pocos casos, la deficiencia de precalicreína es otra de las causas posibles de un TTPA normal con Actin FS y un TTPA notablemente prolongado con un reactivo que utiliza sílice o caolín como activador. Al igual que en la mayor parte de los casos de AL, esta circunstancia no está relacionada con ningún riesgo hemorrágico. Por ende, nuevamente, la confirmación podría no ser necesaria.

---

  - 4 Si el TTPA inicial es notablemente prolongado (tres segundos o más) y el TTPA con Actin FS es normal, no será necesario llevar a cabo ensayos de factor.

---

  - 5 Si ambos TTPA son prolongados, realizar ensayos de factor VIII:C, IX y XI según sea necesario (consultar el capítulo 23). De ser necesario, se podrá realizar un ensayo de factor XII, debido a que la deficiencia es relativamente frecuente y su detección puede explicar la prolongación del TTPA. Ello no resulta necesario para descartar la presencia de un trastorno hemorrágico, debido a que la deficiencia de factor XII no está relacionada con un riesgo hemorrágico elevado.

---

  - 6 Los reactivos como Actin FS, que utilizan ácido elálgico como activador por contacto, se vinculan a resultados normales, incluso ante una deficiencia grave de precalicreína.
- 

En los casos que sea necesario, los pasos 1 a 3 pueden realizarse en forma simultánea para ahorrar tiempo.

### OBSERVACIONES

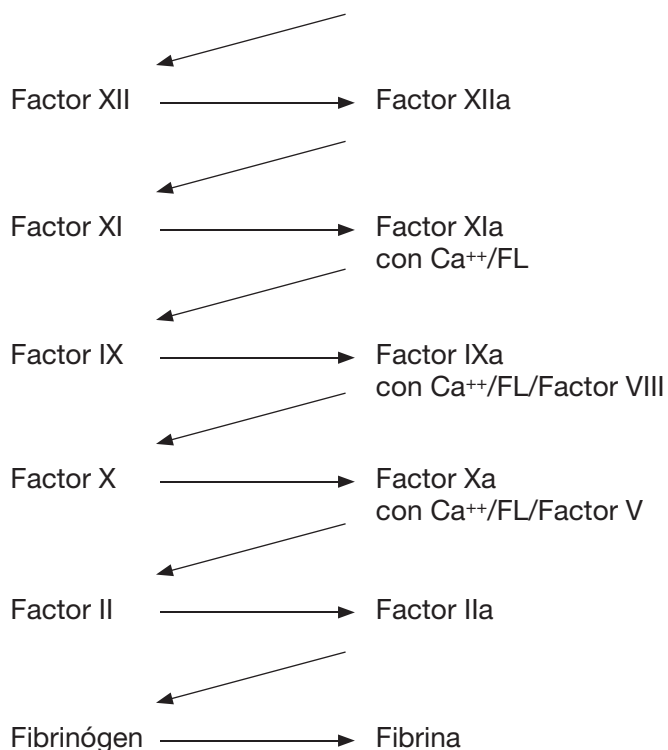
- Un TTPA normal con Actin FS, combinado con un TTPA inicial prolongado (Synthasil/IL), normalmente descarta la deficiencia de factor VIII, IX o XI, y en este caso, no hay necesidad de realizar ensayos de factor.
- Rara vez, un TTPA normal con cualquier reactivo puede presentarse con los factores IX o XI están levemente reducidos (30-50 U/dl) y el factor VIII está notoriamente elevado.
- El TTPA con Actin FS por lo general es normal con la disminución del factor XII en el rango de 20 U/dl-50 U/dl y el TTPA con activación por caolín o sílice es levemente elevado. Este defecto no tiene relevancia clínica.

- Son escasos los anticoagulantes lúpicos potentes que prolongan el TTPA con Actin FS.
- Los anticuerpos específicos al factor VIII (o al factor IX o XI) prolongan el TTPA, independientemente del reactivo.

Para conocer un análisis completo de los temas relacionados con la determinación del TTPA, consultar CLSI (2008).

### Figura 13.2. Vía medida por la TTPA

Activación por contacto, que incluye precalicreína, cininógeno de alto peso molecular y expuestos a superficie con carga negativa



FL = Fosfolípido       $\longrightarrow$  = Activación

### BIBLIOGRAFÍA

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *One-Stage Prothrombin time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test: Approved guideline*, 2nd ed. 2008. Clinical and Laboratory Standards Institute Document H47-A2.

Kitchen S, Cartwright I, Woods TA, Jennings I, Preston FE. Lipid composition of 7 APTT reagents in relation to heparin sensitivity *Br J Haematol* 1999; 106:801-8.



# Ensayos de mezcla para una investigación exhaustiva de los TP y TTPA anormales

14

## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Las muestras de plasma que presenten resultados anormales en las pruebas de rastreo, es decir TP y TTPA, pueden estudiarse con mayor profundidad a fin de determinar la causa de la anomalía mediante ensayos de mezcla (o de corrección) (*mixing tests*). En primer lugar, es importante verificar que el defecto del plasma de un paciente se corrige con plasma normal a fin de descartar la presencia de un inhibidor. Si la anomalía se corrige mediante el añadido de uno de los reactivos descritos abajo es muy probable que ese reactivo contenga la sustancia deficiente en la muestra de prueba.

Las pruebas de rastreo que arrojan resultados anómalos se repiten con mezclas de igual volumen (a las que se denomina 50:50 más adelante) de plasma de prueba y aditivo.

Los siguientes agentes pueden ser utilizados para los ensayos de mezcla:

- plasma normal;
- plasma envejecido;
- plasma adsorbido;
- plasma deficiente en factor VIII;
- plasma deficiente en factor IX.

## PLASMA ENVEJECIDO

- 1 Añadir oxalato de sodio 0,1 M a sangre venosa normal en una proporción de 1/9.
- 2 Centrifugar la sangre para obtener plasma pobre en plaquetas, hacer la separación en condiciones de esterilidad e incubar a 37 °C entre 2 y 3 días.
- 3 Con tromboplastinas sensibles, el tiempo de protrombina al final de ese período debería ser superior a 90 segundos.
- 4 Fraccionar el plasma en alícuotas en envases plásticos y almacenarlos a -35 °C (o a una temperatura inferior).

El plasma envejecido es deficiente en factores V y VIII.

## PLASMA ADSORBIDO

---

- 1 Preparar gel de hidróxido de aluminio (alúmina) mezclando 1 g de gel húmedo con 4 ml de agua destilada hasta obtener una suspensión uniforme.
  - 2 Tomar plasma citratado pobre en plaquetas de 5 donantes normales y preparar un pool.
  - 3 Añadir hidróxido de aluminio al plasma precalentado en una proporción de 1/10, mezclar e incubar durante 3 minutos a 37 °C.
  - 4 Centrifugar la mezcla inmediatamente (a 1700 g durante 3 minutos, a temperatura ambiente) para sedimentar el gel.
  - 5 Colocar el plasma sobrenadante en envases plásticos. Puede almacenarse a -35 °C durante varias semanas.
- 

El plasma adsorbido es deficiente en los factores II, VII, IX y X (factores dependientes de la vitamina K). Con un reactivo sensible, debería arrojar un tiempo de protrombina > 60 segundos.

*Importante: El tiempo de adsorción debe medirse cuidadosamente, ya que una sobreadSORCIÓN dará lugar a la pérdida de otros factores de la coagulación.*

## PLASMA DEFICIENTE EN FACTORES VIII O IX

El plasma obtenido de pacientes con deficiencias graves aisladas (<1 UI/dl) de factores VIII o IX resulta muy útil para los ensayos de mezcla. Cuando sea posible, se preferirá el uso de este tipo de plasma en lugar del plasma envejecido y del plasma adsorbido. El plasma seleccionado para este propósito debe tener un TP normal, lo que indica que es probable que los demás factores de la coagulación sintetizados en el hígado estén dentro de los niveles normales.

Este tipo de plasma puede ser liofilizado para su almacenamiento a largo plazo o almacenado como plasma a -35 °C (o a una temperatura inferior) durante por lo menos tres meses.

Para describir una anomalía puede emplearse una mezcla 50:50 de aditivo y plasma del paciente.

En caso de que haya una prolongación aislada del TTPA, se recomienda el uso de plasma deficiente en factor VIII en lugar de plasma envejecido. Del mismo modo, el plasma deficiente en factor IX es preferible al plasma adsorbido.

**Figura 14.1. Patrón de resultados de los ensayos de mezcla en presencia de deficiencias de un único factor**

Deficiencia del plasma de prueba	TTPA	Plasma envejecido o deficiente en factor VIII	Plasma adsorbido o deficiente en factor IX	Plasma normal
FVIII	prol.	no corr.	corr.	corr.
FIX	prol.	corr.	no corr.	corr.
FXI/FXII	prol.	corr.	corr.	corr.
Inhibidor	prol.	no corr.	no corr.	no corr.

Deficiencia del plasma de prueba	TP	TTPA	Plasma envejecido	Plasma adsorbido	Plasma normal
FII	prol.	prol.	corr.	no corr.	corr.
FV	prol.	prol.	no corr.	corr.	corr.
FVII	prol.	normal	corr.	no corr.	corr.
FX	prol.	prol.	corr.	no corr.	corr.

prol. = prolongado; no corr.= no corrige; corr. = corrige

### OBSERVACIONES

- El hidróxido de aluminio puede adquirirse en BDH, Poole, BH15 ITD, Inglaterra.
- Si bien los inhibidores no específicos que afectan el TTPA (como el anticoagulante lúpico) por lo general muestran una falta de corrección, el plasma normal puede corregir parcialmente un plasma con inhibidores más débiles o de bajo título.
- La falta de corrección inmediata del TTPA con el añadido de plasma normal puede indicar la presencia de inhibidores específicos del factor VIII. En otros casos existe una corrección inmediata con plasma normal, seguida de un alargamiento del TTPA en la mezcla con el paso del tiempo. Se puede analizar una mezcla de plasma de prueba y plasma normal tras una hora a 37 °C al tiempo que se hacen las determinaciones del TTPA sobre el plasma normal y el plasma de prueba que han sido incubados por separado pero al mismo tiempo.

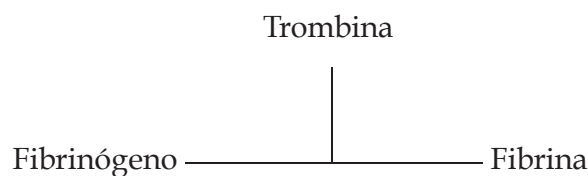
- No es frecuente que se presenten inhibidores específicos de otros factores de la coagulación pero puede ocurrir. No se puede generalizar acerca de su comportamiento en los experimentos de mezcla, excepto con los inhibidores del factor IX que normalmente son de acción rápida.
- La figura 14.2 presenta algunos ejemplos del TTPA en pacientes con hemofilia A adquirida en los que se indica el título del anticuerpo anti-factor VIII y el efecto que tiene el agregado de 20% y 50% de un pool de plasma normal. El método de TTPA empleado tiene un tope máximo del rango normal de 37 segundos, lo que indica que en presencia de dicho anticuerpo anti-factor VIII, puede haber una corrección total en una mezcla 50:50 de plasma del paciente y de un pool de plasma normal en algunos casos. Si dichas mezclas se incuban a 37 °C, se observará un incremento progresivo del TTPA, debido a que el anticuerpo anti-factor VIII inhibe el factor VIII.

**Figura 14.2. Ensayos de mezcla en casos de hemofilia A adquirida**

Título de Bethesda (U/ml)	TTPA (segundos)	TTPA + 20% de plasma normal (segundos)	TTPA + 50% de plasma normal (segundos)
1,0	210	137	77
1,1	83	52	38
2,0	82	43	34
6,6	107	51	37
8,4	150	55	39
21	145	62	48
23	123	127	55
120	69	50	38

## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

El tiempo de trombina muestra la reacción que se produce entre la trombina y el fibrinógeno.



Se prolonga cuando el nivel de fibrinógeno es muy bajo (inferior a 1,0 g/l), en presencia de heparina y de sustancias similares a la heparina, en presencia de otros inhibidores, como por ejemplo, los productos de degradación de fibrina (fibrinógeno) (PDF) y cuando el fibrinógeno resulta anormal en términos cualitativos (disfibrinogenemia), lo que incluye tanto defectos congénitos como adquiridos como consecuencia de enfermedad hepática.

## REACTIVO

Solución de trombina que induce a la coagulación del plasma normal en alrededor de 15 segundos.

El uso de soluciones más fuertes trae como consecuencia tiempos de coagulación más breves y puede dar resultados normales en presencia de defectos leves.

## MÉTODO: MANUAL

- 1 Pipetear 0,2 ml de plasma en un tubo de coagulación de vidrio.
- 2 Calentar hasta 37 °C.
- 3 Añadir 0,2 ml de trombina.
- 4 Poner en marcha un cronómetro. Anotar el tiempo de coagulación.
- 5 Establecer un rango normal dentro del laboratorio.
- 6 Hacer la prueba por duplicado.

## OBSERVACIONES

- La concentración de trombina usada debe ser tal que dé un tiempo de coagulación de alrededor de 15 segundos con el pool de plasma normal (de control). Si se usa trombina concentrada, diluir en solución salina hasta completar aproximadamente 10 a 15 U/ml, y luego, diluir según sea necesario hasta obtener el tiempo control que corresponda.
- La trombina reconstituida puede almacenarse a  $-35^{\circ}\text{C}$  o a una temperatura inferior y debe diluirse antes de su uso.
- No dejar la trombina diluida a temperatura ambiente para evitar que se malogre.
- En cada grupo de prueba deberá incluirse un control de un pool de plasma normal.

## Tiempo de trombina en presencia de sulfato de protamina para la detección de heparina

16

La presencia de heparina no fraccionada y algunos tipos de heparina de bajo peso molecular pueden provocar una prolongación del tiempo de trombina.

Las formas mayores de heparina, que prolongan el tiempo de trombina, pueden ser neutralizadas con el agregado de sulfato de protamina (SP). El sulfato de protamina puede conseguirse en las farmacias de muchos hospitales, en los que se lo emplea como agente terapéutico para revertir los efectos de la heparina.

La concentración de la droga de las preparaciones terapéuticas por lo general es mucho mayor que la que se utiliza en las pruebas de laboratorio. Por ende, de ser necesario, se diluirá la droga en solución salina hasta alcanzar una concentración de 40 mg% que se usará como solución de trabajo. La solución de trabajo de trombina con SP se preparará mezclando nueve partes del reactivo de trombina con una parte de SP al 40mg%. Esta solución se utilizará en reemplazo de la solución de trombina descrita en el capítulo 15 y se analizará un plasma normal de control. Si el tiempo de trombina es prolongado pero se corrige hasta dentro de los dos segundos del resultado de control, se confirmará la presencia de heparina.



# 17

## Tiempo de reptilasa

### FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

El reptilasa es un veneno de serpiente que se obtiene de la especie *Bothrops atrox*. Consiste en una enzima similar a la trombina que actúa directamente sobre el fibrinógeno transformándolo en fibrina. No es inhibido por la antitrombina, de manera que no se ve afectado por la presencia de heparina. En consecuencia, puede ser empleado para evaluar la tasa de conversión fibrinógeno → fibrina en presencia de heparina.

Resulta útil para verificar si el alargamiento del tiempo de trombina es provocado por la presencia de heparina en la muestra. Si el tiempo de trombina es prolongado y el de reptilasa resulta normal, la causa más probable de ello será la presencia de heparina. De existir disfibrinogenemia, el tiempo de reptilasa puede resultar más sensible (es decir, más prolongado) que el tiempo de trombina.

### REACTIVOS

- Reptilasa (Sigma Aldrich, código V5375) disuelto en una concentración de 25 mg en 15 ml de tampón de Owren. El veneno crudo es peligroso, por lo que se deberá evitar inhalar el polvo y el operador deberá utilizar guantes y máscara mientras lo manipula. La solución madre deberá conservarse en ultracongelación a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  en alícuotas de 0,5 ml. En dichas condiciones, se mantiene estable durante por lo menos dos años.

Para dejar el reactivo listo para usar, descongelar y diluir el reactivo madre (*stock*) en una proporción de 1/10 en tampón de Owren; fraccionar en alícuotas y volver a congelar a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su uso posterior. El reactivo listo para usar permanece estable en estas condiciones durante por lo menos tres meses.

Las alícuotas congeladas listas para usar deben descongelarse en un baño de María a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante por lo menos tres minutos. De esta manera, permanecerán estables para poder utilizarlas durante por lo menos 12 horas a una temperatura ambiente de entre  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- Plasma normal: pool de plasma normal preparado según se describe en el capítulo 7. Descongelar sumergiendo en agua a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente tres minutos.

## MÉTODO

Realizar todas las pruebas por duplicado.

- 1 Colocar una cantidad suficiente de tubos de coagulación de vidrio de  $75 \times 10$  mm en un baño de María a  $37^{\circ}\text{C}$  (dos por paciente más dos para el control).
- 2 Pipetear 0,3 ml de plasma (de control o del paciente) en los tubos de coagulación precalentados.
- 3 Calentarlo durante uno o dos minutos.
- 4 Añadir 0,1 ml de la dilución de reptilasa y poner en marcha el cronómetro.
- 5 Inclinar tres veces para mezclar y, luego, tres veces más cada cinco segundos hasta que se forme el coágulo.
- 6 Registrar el tiempo de coagulación.
- 7 El tiempo de control debe estar entre los 15 y los 18 segundos (si es menor, ajustarlo diluyendo más el reactivo reptilasa con el tampón de Owren).
- 8 Si no se produce la coagulación, registrar como  $>90$  segundos.

## RANGO NORMAL

El tiempo del paciente debería estar dentro de los tres segundos del tiempo de control. El tiempo de control debe informarse junto con el tiempo del paciente.

## OBSERVACION

En el mercado pueden conseguirse varios reactivos de reptilasa con una concentración lista para usar. La ventaja de estos reactivos es que evitan la necesidad de tener que manipular el veneno crudo, con los riesgos que ello implica para la salud y la seguridad. Si se utiliza alguno de estos reactivos, se deberán seguir las indicaciones de uso del fabricante. El rango normal puede diferir del indicado anteriormente, pero para la interpretación de los resultados puede emplearse la figura 17.1. En los casos en los que el reptilasa resulte un reactivo de costo muy elevado, podrá emplearse el método de neutralización de protamina o del tiempo de trombina (capítulo 16) para confirmar la presencia de heparina en la muestra de prueba.

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Figura 17.1. Interpretación del tiempo de trombina prolongado

Tiempo de trombina	Tiempo de reptilasa	Causa	Comentarios
Prolongado	Igualmente prolongado	Hipofibrinogenemia o afibrinogenemia	Medir el fibrinógeno
Prolongado	Marcadamente prolongado	Disfibrinogenemia	Congénita o adquirida
Prolongado	Normal	Heparina	
Prolongado	Levemente prolongado	Heparina y algún tipo de hipofibrinogenemia o disfibrinogenemia	Un caso poco frecuente de disfibrinogenemia podría presentar este patrón
Prolongado	Igualmente prolongado	Coagulación intravascular diseminada (CID)	Medir los dímeros D

## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Se preparan diluciones de plasma normal estándar con contenido conocido de fibrinógeno en tampón de glioxalina. El tiempo de coagulación se mide tras el añadido de trombina y se elabora un gráfico.

El tiempo de coagulación es proporcional a la concentración de fibrinógeno y se toma la dilución 1/10 como valor de la preparación estándar. El plasma de prueba se diluye en una proporción de 1/10, y se hace una lectura del resultado de la línea estándar.

## REACTIVOS

- Plasma estándar o de referencia con concentración conocida de fibrinógeno.
- Trombina: de 30 U/ml a 100 U/ml (la concentración puede variar en función del producto que se emplee).
- Tampón de imidazol (glioxalina) o tampón de Owren (pH 7,35).

## MÉTODO

- 1 Preparar diluciones con una proporción de 1/5, 1/10, 1/15 y 1/20 de plasma estándar en tampón de imidazol.
- 2 Pipetear por duplicado 0,2 ml de cada dilución en tubos de coagulación de vidrio.
- 3 Calentar hasta los 37 °C durante dos minutos.
- 4 Añadir 0,2 ml de trombina (de 30 U/ml a 100 U/ml) y tomar el tiempo de formación del coágulo.
- 5 Si se emplea la técnica manual, realizar las pruebas por duplicado. Este requisito no es necesario para la mayoría de los coagulómetros si el proceso está automatizado.
- 6 Graficar el tiempo de coagulación promedio contra la concentración de fibrinógeno en una hoja para escalas logarítmicas, tomando la dilución de 1/10 como valor estándar.

- 7 Diluir el plasma de prueba en una proporción de 1/10, determinar el tiempo de coagulación y leer el valor que entrega el gráfico.

El rango normal deberá establecerse dentro del laboratorio pero por lo general se encuentra aproximadamente entre 1,5 g/l y 3,5 g/l.

Para la mayoría de las técnicas de Clauss, la relación entre el tiempo de coagulación y la concentración de fibrinógeno es lineal dentro de un rango limitado de tiempos de coagulación, por lo general entre 10 y 25 segundos.

- Para los plasmas de prueba normales, puede emplearse una dilución de 1/10.
- Para las concentraciones más bajas (por ejemplo, de 0,75 g/l a 1,5 g/l), diluir el plasma en una proporción de 1/5; leer el valor en el gráfico y multiplicarlo por 5/10.
- Para los valores <0,75 g/l, diluir el plasma de prueba en una proporción de 1/2; leer el valor del gráfico y multiplicarlo por 2/10.
- Para los valores más altos (>4 g/l), diluir el plasma de prueba en una proporción de 1/20; leer el valor del gráfico y multiplicarlo por 20/10.

La prueba no se ve afectada por la presencia de heparina a los niveles que se utilizan para el tratamiento del tromboembolismo venoso. Sin embargo, los niveles de heparina más elevados que se emplean en los bypass cardiopulmonares pueden prolongar los tiempos de coagulación, lo que lleva a una subestimación de fibrinógeno, a menos que el reactivo contenga neutralizadores de heparina que contrarresten este efecto.

### DATOS FRECUENTES DE CALIBRACIÓN

*Importante: deberá establecerse una curva de calibración con los reactivos que se empleen en el laboratorio.*

Plasma estándar: fibrinógeno 2,1 g/l

**Figura 18.1. Ejemplo de calibración de fibrinógeno**

Dilución del estándar	Concentración de fibrinógeno (g/l)	Tiempo de coagulación (segundos)
1/5	4,2	8,5
1/10	2,1	14
1/15	1,4	19,5
1/20	1,05	24,5

Ejemplos:

Plasma de prueba 1: diluido 1:10; tiempo de coagulación: 15 segundos.

fibrinógeno = 1,9 g/l (según gráfico de calibración)

Plasma de prueba 2: diluido 1:5; tiempo de coagulación: 16 segundos.

fibrinógeno = 1,8 g/l según gráfico de calibración  $\times$  5/10  
(debido a que la dilución es 1/5 en lugar de 1/10)  
= 0.9 g/l

Existen diversos equipos de análisis de coagulación capaces de estimar el nivel de fibrinógeno durante la determinación del tiempo de protrombina. Dicha estimación es posible debido a que el cambio en la dispersión o transmisión de la luz que se produce como consecuencia de la formación del coágulo es proporcional a la concentración inicial de fibrinógeno. Con frecuencia, el nombre que reciben dichos métodos de determinación es *ensayos de fibrinógeno derivados del TP*.

La mayoría de los métodos derivados del TP presentan ciertas limitaciones. En particular, los resultados que se obtienen por lo general son mucho más altos que aquellos que se obtienen por medio del ensayo de Clauss cuando se presentan niveles muy bajos (<1,5 g/l) o elevados (por sobre los 5 g/l) de fibrinógeno. Los resultados suelen ser normales en presencia de disfibrinogenemia. Para obtener más información al respecto, consultar Mackie et al. (2003).

Existen algunos métodos de Clauss para determinación de los niveles de fibrinógeno que son útiles para analizar plasma de prueba no diluido, pero los resultados pueden no servir para cruzarlos con los datos de los ensayos de Clauss que utilizan plasma de prueba diluido que son de mayor uso (Jennings et al. 2009).

## BIBLIOGRAFÍA

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Differences between multifibrin U and conventional Clauss fibrinogen assays: data from the UK National External Quality Assessment scheme. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20:388-90.

Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GD. Guidelines on fibrinogen assays. *Br J Haematol* 2003; 121: 396-404.

# 19

## Eliminación de la heparina del plasma

### FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La heparinasa 1 (componente activo de Hepzyme®) es específica para la heparina, a la que segmenta en múltiples sitios por molécula, produciendo oligosacáridos que han perdido su efecto antitrombótico. Hepzyme® es un tipo de heparinasa 1 bacteriana purificada producida a partir de *Flavobacterium heparinum*. Es capaz de eliminar hasta 2 UI de heparina por ml de plasma. Hepzyme® puede ser utilizado para neutralizar el efecto de la heparina en una muestra, de manera que puede evaluarse el estado de coagulación subyacente. Se emplea específicamente para casos de contaminación con heparina.

### REACTIVO

Hepzyme®, vial que contiene una preparación en polvo de heparinasa 1 con estabilizantes.

Fabricante: Dade Behring.

Almacenamiento: a 4 °C.

Estabilidad: hasta la fecha de vencimiento indicada por el fabricante. Cada vial se utiliza únicamente para un paciente/prueba.

### MÉTODO

- 1 Añadir 1,0 ml de plasma citratado pobre en plaquetas a un vial de Hepzyme®.
- 2 Volver a tapar e invertir suavemente entre 5 y 10 veces.
- 3 Dejar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 4 Transferir a un envase plástico para muestras de 2 ml, y dejar reposar unos instantes hasta que desaparezcan las burbujas que pueda haber.
- 5 Realizar el ensayo correspondiente.

Incluir el tiempo de trombina a fin de verificar que se haya eliminado la totalidad de la heparina.



Las pruebas deberán llevarse a cabo cuanto antes (es decir, siguiendo los lineamientos indicados para ese procedimiento).

### **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Esta enzima no elimina ningún factor de coagulación (a diferencia de otras técnicas para la eliminación de la heparina), de manera que la disminución significativa de los tiempos de coagulación en la prueba de TTPA, del tiempo de trombina o del TP después del tratamiento con Hepzyme® indicará que había heparina. Tanto la heparina no fraccionada como la de bajo peso molecular se degradan mediante la acción de dicha enzima.

## Ensayo de relación fibrinógeno-antígeno por inmunodifusión radial (IDR)

### INTRODUCCIÓN

Si el resultado del ensayo de Clauss para la determinación del nivel de fibrinógeno es notablemente inferior a los resultados de los ensayos de fibrinógeno derivados del tiempo de protrombina o de relación fibrinógeno-antígeno, puede indicar que existe disfibrinogenemia (deficiencia de fibrinógeno de tipo II).

El ensayo de Clauss determina el nivel de fibrinógeno al establecer la tasa de formación de fibrina después del agregado de trombina con una concentración alta, mientras que el ensayo derivado mide la densidad óptica o la dispersión de la luz a través de un coágulo de fibrina formado después de que se ha producido la coagulación total.

El ensayo de relación fibrinógeno-antígeno detecta la disfibrinogenemia por la baja actividad en el ensayo de Clauss en presencia de un nivel normal de antígeno.

La afibrinogenemia puede estar relacionada con trastornos hemorrágicos por deficiencias de coagulación del plasma y en la función plaquetaria. Existen diversas deficiencias que pueden provocar la disfibrinogenemia, que puede caracterizarse por insuficiencias en la liberación de fibrinopéptidos A/B y en la polimerización de los monómeros de fibrina. Las deficiencias de tipo II pueden ser asintomáticas, pero se ha observado que existen algunas variantes con una predisposición a hemorragias o trombosis. La tendencia hemorrágica o trombótica de un paciente puede no estar relacionada con la disfibrinogenemia, que podría detectarse por un hallazgo casual.

### MATERIALES

Placa para IDR Fibrinógeno NOR-Partigen (NOR-Partigen Fibrinogen R.I.D. Plate).

Fabricante: Dade Behring.

Cada placa contiene 12 pocillos.

### REACTIVOS

- Plasma de calibración con una concentración conocida de fibrinógeno con el que se pueda establecer un paralelo con un estándar internacional de la OMS referido al fibrinógeno.

- Plasma de prueba: el plasma citratado normalmente se prueba sin diluir o diluido en solución salina para que entregue un nivel de aproximadamente 2,5 g/l si se prevé que el nivel será superior a 5 g/l. Los resultados menores a 0,5 g/l se informarán como <0,5 g/l (límite inferior de sensibilidad).

## MÉTODO

---

- 1 Dejar que la placa de IDR tome temperatura ambiente; luego, retirar la tapa y dejar abierta durante 5 minutos para que se evapore el exceso de humedad.
  - 2 El plasma estándar se prueba puro y diluido en solución salina al 75%, 50% y 25%.
  - 3 Añadir *exactamente* diluciones de 5µl de plasma estándar, de control de calidad y del paciente (preferentemente por duplicado) a los pocillos. Es fundamental contar con una pipeta con una exactitud suficiente para manipular los pequeños volúmenes que se necesitan.
  - 4 Apenas las muestras se hayan dispersado en el gel (a más tardar cinco minutos después de la aplicación), volver a colocar la tapa y ubicar la placa en posición horizontal en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante aproximadamente 48 horas.
  - 5 Los resultados podrán estimarse pasadas las 18 horas, siempre y cuando ningún diámetro supere los 5,5 mm. Los resultados finales deben informarse pasados dos días, a menos que algún diámetro sea superior a los 8 mm, en cuyo caso la placa se dejará otro día más para que se complete la difusión. Un diámetro >9,3 mm indicará que el nivel de fibrinógeno es mayor que el nivel de sensibilidad del ensayo. De ser así, la muestra se diluirá en solución salina para volver a analizarla.
  - 6 Medir los diámetros de precipitación empleando el dispositivo de lectura de placas de Behring (que se provee con las placas). Medir el valor que esté más próximo a 0,5 mm y hacer una lectura doble (de diámetros a 90 ° uno del otro).
  - 7 En una hoja para escalas lineales representar la curva estándar: diámetro<sup>2</sup> contra concentración.
  - 8 Hacer una lectura del nivel del control de calidad y del paciente de esta curva.
  - 9 Registrar los resultados en g/l si el control de calidad se encuentra dentro del rango meta.
-

# 21

## Prueba de rastreo del factor XIII

### FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La trombina y el calcio son necesarios para activar el factor XIII de modo tal que entrelaza la fibrina y actúa como factor estabilizante. Si bien en este método se usa plasma citratado, todavía hay suficientes iones de calcio disponibles para activar el factor XIII.

Se usa plasma normal anticoagulado con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para control. En este plasma, el EDTA ocasiona una quelación completa de los iones de calcio, lo que significa que el factor XIII no podrá entrelazar la fibrina. Si se agrega ácido acético al 2% o urea 5M se produce la disolución de los coágulos no entrelazados, mientras que el plasma citratado con más de 10 U/dl de actividad del factor XIII tiene un coágulo indisoluble. En general la prueba es más sensible si se emplea ácido acético (en vez de urea), ya que el coágulo se disolverá a niveles más altos de factor XIII en presencia del ácido acético (Jennings et al. 2003).

### MATERIALES/REACTIVOS

- Tubos de vidrio de 75 × 10 mm.
- Solución salina al 0,9%.
- Trombina 30 U/ml.
- Plasma normal con EDTA.
- Ácido acético al 2%.

### MÉTODO

- 1 Agregar 0,2 ml de plasma citratado de prueba hasta alcanzar 0,2 ml de solución salina al 0,9% en un tubo de vidrio. Para un control positivo, repetir con 0,2 ml de plasma de EDTA. Para un control negativo, repetir con 0,2 ml de plasma normal citratado.
- 2 Agregar 0,1 ml de 30 U/ml de trombina. Mezclar.
- 3 Dejar durante 30 minutos a 37 °C.
- 4 Golpetear los tubos para separar los coágulos de las paredes.

- 
- 5 Agregar 5 ml de ácido acético al 2% y colocar un tapón al tubo. Dejar a temperatura ambiente durante 12 horas.
- 

## RESULTADOS

- El plasma de EDTA no debe tener ningún coágulo visible.
- El plasma normal citratado debe tener un coágulo intacto y visible.
- Si el coágulo no está visible, la persona tiene deficiencia del factor XIII.

## RANGO NORMAL

Las personas normales tienen un coágulo visible luego de 12 horas en ácido acético al 2%.

## OBSERVACIONES

- Se puede usar urea 5M en lugar de ácido acético al 2%. Entonces el tiempo de incubación para que se disuelva el coágulo es de 18 horas. Este método es menos sensible que si se usa ácido acético (descrito anteriormente).
- Si el coágulo se forma con calcio y luego se disuelve con urea se producen resultados anormales solo cuando los niveles de factor XIII están por debajo de 5 U/dl. Por comparación, si el coágulo se forma con 30 U/ml de trombina y luego se disuelve con ácido acético al 2%, se producen resultados anormales a niveles por debajo de 10 U/dl (Jennings et al. 2003).
- Ocasionalmente, los pacientes con niveles de factor XIII por encima de 5 U/dl pueden tener hemorragia (para más información ver Bolton-Maggs et al. 2004).

## BIBLIOGRAFÍA

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders - review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Problems relating to the diagnosis of FXIII deficiency. *Thromb Haemost* 2003; 1: 2603-8.

# 22

## Ensayos de factor basados en el tiempo de protrombina (factores II, V, VII o X)

### FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Para analizar los factores II, V, VII y X, se puede recurrir a un ensayo de una etapa basado en el tiempo de protrombina. Básicamente, el ensayo consiste en comparar la capacidad que tienen las diluciones de plasma estándar o de referencia con las de plasma de prueba de corregir el tiempo de protrombina de un plasma que se conoce que es totalmente deficiente en el factor de coagulación que se está midiendo. Por ejemplo, en un ensayo de factor V, como se describe más adelante, el plasma es deficiente en factor V pero contiene cantidades normales de factores II, VII, X y fibrinógeno. Los factores de coagulación II, VII y X se pueden analizar de la misma forma, reemplazando el plasma deficiente respectivo con plasma deficiente en factor V, como en el ejemplo que se cita más adelante y usando el plasma de referencia apropiado con una concentración conocida del factor que se está analizando.

### REACTIVOS

- Plasma deficiente en factor V  
Puede ser por una deficiencia congénita o artificial (plasma envejecido) de factor V.
- Tampón salino de Owren (OBS)  
OBS o tampón de glioxalina (consultar el capítulo 9).
- Plasma citratado pobre en plaquetas: de prueba y estándar.  
Para el estándar, usar un pool de plasma normal de 20 donantes (mantenido a  $-70^{\circ}\text{C}$  o a una temperatura inferior) o un plasma comercial de referencia o estándar.
- Tromboplastina o calcio (al igual que en las pruebas de TP).

### MÉTODO

- 1 Tanto para el plasma de prueba como para el estándar, preparar diluciones en tubos de plástico, tal como se indica en la figura 22.1.

*Importante: Mezclar bien la dilución 1/10 antes de usarla para preparar la dilución 1/20. A su vez, mezclar bien la dilución 1/20 antes de usarla para preparar la dilución 1/40. Analizar las diluciones de plasma inmediatamente después de su preparación. Si la temperatura ambiente supera los  $25^{\circ}\text{C}$ , podría resultar necesario mantener las diluciones en hielo antes de someterlas a análisis.*

**Figura 22.1. Preparación de las diluciones de plasma de prueba y estándar**

Dilución	Plasma (ml)	OBS (ml)
1/5	0,1	0,4
1/10	0,1	0,9
1/20	0,5 (1/10)	0,5
1/40	0,5 (1/20)	0,5

2 Analizar cada dilución de plasma de referencia o estándar de la siguiente forma:

- i. Pipetear 0,1 ml de cada dilución en un tubo de vidrio de 75 × 10 mm.
- ii. Añadir 0,1 ml de plasma deficiente en factor V.
- iii. Calentar hasta 37 °C durante 2 minutos.
- iv. Añadir 0,2 ml de reactivo de tromboplastina o calcio precalentado.
- v. Poner en marcha el cronómetro y mezclar.

*Importante: Si el reactivo de tromboplastina no contiene calcio, añadir 0,1 ml de tromboplastina a la mezcla de la dilución y el plasma deficiente. Esperar de 1 a 2 minutos mientras se calienta la preparación hasta 37 °C y coagular con 0,1 ml de calcio precalentado (hasta 37 °C).*

3 Anotar el tiempo de coagulación.

4 Repetir el procedimiento para las diluciones de plasma de prueba.

Para los plasmas de prueba que se prevé que serán normales, analizar diluciones 1/10, 1/20 y 1/40. Para los plasmas de prueba que se prevé que tendrán niveles reducidos, analizar diluciones 1/5, 1/10 y 1/20.

También se deberá analizar una muestra testigo con lo siguiente:

- 1 ml de OBS;
- 0,1 ml de plasma deficiente en factor V;
- 0,2 ml de reactivo de tromboplastina o calcio.

El tiempo de coagulación de la muestra testigo refleja la calidad del plasma deficiente que debería estar por debajo del 1%.

## RESULTADOS

Representar el tiempo de coagulación del plasma control y del plasma de prueba contra la concentración del factor V en una hoja para escalas logarítmicas de 3 ciclos × 2 ciclos (en el capítulo 23 se puede ver un ejemplo de tal gráfico (para un ensayo de factor VIII)). A la dilución 1/10 se le asigna arbitrariamente un valor del 100% y, en consecuencia, la dilución 1/5 será equivalente a 200%, y así sucesivamente. Otra alternativa consiste



en representar la concentración en una escala logarítmica y el tiempo de coagulación en una escala lineal.

La cantidad relativa de factor V en el plasma del paciente comparado con el plasma normal o con el material de referencia estándar se obtiene de los gráficos. Un ejemplo de ello se muestra en el capítulo sobre los ensayos basados en el TTPA (figura 23.1). El tiempo de coagulación equivalente al 100% de la prueba (el punto donde la línea de la prueba cruza el 100% de actividad) se lee de la línea estándar (es decir, la concentración del estándar que podría dar ese tiempo de coagulación específico). Así se obtiene la concentración de la prueba como porcentaje del estándar. Este porcentaje se multiplica por la concentración del factor de coagulación del estándar (en UI/dl) con lo que se obtiene la concentración de la prueba (en UI/dl).

### OBSERVACIONES

- El rango normal de cada uno de los factores de coagulación se determinará en el laboratorio pero por lo general, el límite inferior será de 50 a 70 UI/dl para los factores V, VII y X. El límite inferior de la normalidad para el factor II es mayor. Un estudio llevado a cabo en individuos normales de familias con antecedentes de deficiencia de factor II y en otros individuos normales, registró niveles de factor II en el rango de 84 a 130 UI/dl (Girolami et al. 1998). Otro centro informó un rango diferente de entre 84 y 132 UI/dl (Bolton Maggs et al. 2004).
- Los individuos que presenten un nivel bajo de factor V también deberían someterse a un ensayo de factor VIII a fin de descartar que existe una deficiencia conjunta de los factores V y VIII.
- En ciertos casos de deficiencia de factor VII, puede haber una discrepancia en los niveles de factor VII:C que se obtienen, en función del origen de la tromboplastina. Por ende, se recomienda el uso de tromboplastina humana teniendo en cuenta que es más probable que los resultados reflejen la actividad *in vivo*. Para más información, consultar Bolton-Maggs et al. (2004). En determinados casos poco frecuentes, el resultado puede ser muy bajo si se emplea tromboplastina de conejo, pero puede ser normal si el ensayo utiliza tromboplastina humana. Esta podría ser la razón por la que algunos casos de aparente deficiencia grave de factor VII no presentan síntomas hemorrágicos.

### BIBLIOGRAFÍA

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders - review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628.

Girolami A, Scarano L, Saggiorato G, Girolami B, Bertomoro A, Marchiori A. Congenital deficiencies and abnormalities of prothrombin. *Blood Coagul Fibrinol* 1998; 9: 557-569.



# Ensayos de factor basados en el TTPA (ensayo de una etapa de los factores VIII:C, IX, XI o XII)

23

## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Este capítulo describe el ensayo de una etapa del factor VIII. El ensayo compara la capacidad de las diluciones de plasma estándar y plasma de prueba para corregir el TTPA de un plasma que se sabe que es totalmente deficiente en factor VIII pero que contiene todos los demás factores necesarios para una coagulación normal. Para los factores IX, XI y XII el ensayo es básicamente el mismo y se realiza reemplazando el plasma deficiente en factor VIII por el plasma deficiente relevante, una vez que se haya seleccionado el plasma de referencia adecuado.

## REACTIVOS

- Plasma estándar y de prueba citratado pobre en plaquetas  
Para el plasma estándar, se preparará un pool en el laboratorio que se conservará a  $-70^{\circ}\text{C}$  o a una temperatura inferior, o bien se adquirirá un plasma estándar comercial. En cualquiera de los casos, dicho plasma de referencia se deberá calibrar en función de un estándar internacional para el factor VIII. No se debe suponer que un pool de plasma normal tiene 100 U/dl de factor VIII:C.
- Plasma deficiente en factor VIII  
Se podrá utilizar uno comercial o se extraerá de un donante cuyo nivel de factor VIII sea inferior a 1 U/dl, que no tenga anticuerpos anti-factor VIII, no haya recibido ningún tratamiento en las dos semanas anteriores y presente resultados normales en las pruebas de función hepática. La función hepática anormal puede causar la disminución de otros factores de la coagulación, lo que afectaría la especificidad del ensayo. Este plasma puede almacenarse en alícuotas a  $-37^{\circ}\text{C}$ . Es preferible usar plasma deficiente en factor VIII producido por inmunodepleción del factor VIII a partir de plasma normal usando un anticuerpo monoclonal. Este tipo de material está a la venta y tiene la ventaja de que ofrece seguridad viral comparado con el plasma de pacientes con hemofilia tratados con productos plasmáticos. Sin embargo, no todo el plasma inmunodepletado tiene  $<1$  U/dl por lo que es fundamental verificarlo. Algunos expertos sostienen que la presencia de una concentración normal de FvW en el plasma deficiente en factor VIII puede resultar beneficiosa, teoría que se sustenta en los ensayos de factor VIII que se llevan a cabo como parte de la determinación del inhibidor de factor VIII.
- Reactivo de TTPA

- Tampón salino de Owren (OBS o tampón de glioxalina; ver el capítulo 9)
- $\text{CaCl}_2$  25 mM

## MÉTODO

- 1 Diluir el plasma estándar y de prueba en tubos de plástico en solución salina tampón en una proporción de 1/10 (si se prevé que el plasma de prueba tendrá un nivel muy bajo de factor VIII, empezar con una dilución 1/5).
- 2 Usando volúmenes de 0,2 ml, hacer diluciones 1:2 de plasma estándar y plasma de prueba en OBS desde 1/10 hasta 1/40 en tubos de plástico (mezclar bien cada dilución antes de transferirla al siguiente tubo). Analizar las diluciones de plasma inmediatamente después de su preparación. Si la temperatura ambiente supera los 25°C podría resultar necesario mantener las diluciones en hielo antes de someterlas a análisis.
- 3 Pipetear 0,1 ml de cada dilución estándar en un tubo de vidrio de 75 × 10 mm.
- 4 Añadir 0,1 ml de plasma deficiente en factor VIII y transferirlo a un baño de María a 37 °C.
- 5 Añadir 0,1 ml de reactivo de TTPA e incubar durante 5 minutos.
- 6 A los 5 minutos, añadir 0,1 ml de  $\text{CaCl}_2$  y registrar el tiempo de coagulación.

Además, preparar una muestra testigo de la siguiente forma:

- 0,1 ml de OBS;
- 0,1 ml de plasma deficiente en factor VIII;
- 0,1 ml de reactivo de TTPA;
- incubar durante 5 minutos;
- 0,1 ml de  $\text{CaCl}_2$ .

El tiempo de coagulación de la muestra testigo debe ser mayor que el tiempo del 1% de la actividad del factor VIII del plasma estándar según el gráfico de calibración. Si el tiempo es menor, el plasma sustrato no es totalmente deficiente en factor VIII, por lo que no resulta adecuado para la prueba.

## RESULTADOS

Representar los resultados como se describe en el capítulo 22, sobre una hoja para escala logarítmica doble o logarítmica/lineal.

A la dilución 1/10, se le asigna arbitrariamente un valor de 100%, a la dilución de 1/20, un valor de 50% y a la dilución de 1/40, un valor de 25%.

Se deberían obtener líneas rectas y paralelas entre sí.

Hacer una lectura de la concentración de la muestra de prueba como se indica en la figura 22.1 (ver el capítulo 22). En ese ejemplo, la concentración de factor

VIII en la muestra de prueba es del 7% del estándar. Si el estándar tiene una concentración de 85 UI/dl, la concentración de la muestra de prueba será equivalente a  $85 \text{ UI/dl} \times 7\% = 6 \text{ UI/dl}$ .

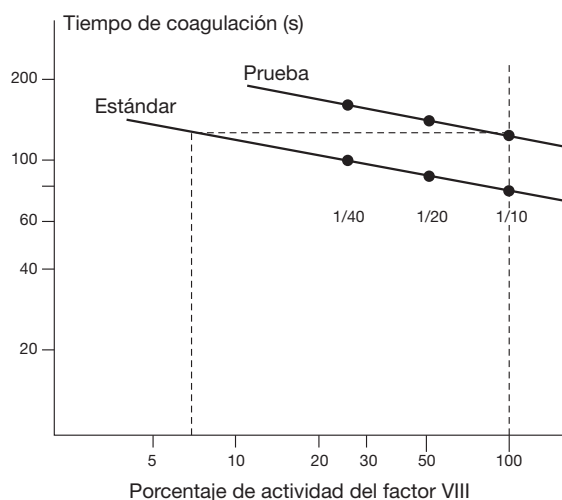
Si las líneas no son paralelas se deberá repetir el ensayo.

Las líneas no paralelas pueden deberse a un error técnico. Si se descartan los errores técnicos, la causa de las líneas no paralelas puede ser la presencia de un inhibidor, específico del factor VIII, o bien de tipo lúpico, caso en el cual se presentaría un patrón convergente. Las líneas divergentes son características de una muestra activada.

## OBSERVACIONES

- Si la concentración de factor VIII (o de factor IX, XI o XII) en el plasma de prueba tiene un valor cercano a cero (es decir, si los tiempos de coagulación de todas las diluciones son similares a la muestra testigo) pueden aparecer líneas no paralelas.
- El rango normal debe establecerse en el laboratorio pero, por lo general, el límite inferior se ubica entre 50 y 65 UI/dl para el caso de los factores IX u XI.
- Con respecto al factor XI, la unidad internacional (UI) se estableció en forma reciente. Al momento de redacción de este manual, existen pocos datos sobre los niveles normales de factor XI en la UI. Las publicaciones anteriores al establecimiento de UI indican que el límite inferior de normalidad para el factor XI se encuentra en el rango de 63 a 80 U/dl (para más información, consultar Bolton-Maggs et al. 2004).

Figura 23.1. Gráfico del ensayo de factor VIII



## BIBLIOGRAFÍA

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders - review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia* 2004; 10(5): 593-628.

## 24 Ensayos de factor VIII:C en crioprecipitado

Las condiciones de ensayo que describe el capítulo 23 son adecuadas cuando las muestras de prueba tienen un nivel normal o casi normal de factor VIII:C. Si el nivel es superior a 150 UI/dl, por lo general, es necesario modificar esas condiciones para que la estructura del ensayo sea válida.

Los niveles de factor VIII:C en el crioprecipitado varían de un donante a otro, pero por lo general se encuentran en un rango entre 200 y 1000 UI/dl. Con estos niveles, habrá que diluir previamente el material de prueba a fin de reducir la concentración antes de comenzar el ensayo. Para la mayoría de las unidades de crioprecipitado, una dilución previa de 1 en 5 o de 1 en 10 basta para disminuir la concentración hasta un nivel tal que el material diluido puede utilizarse en la estructura del ensayo que describe el capítulo 23 (es decir, el material diluido previamente vuelve a diluirse en el tampón del ensayo en una proporción de 1/5, 1/10 y 1/20, tal como se indicó).

Si el crioprecipitado no se diluye previamente hasta alcanzar una concentración adecuada, es probable que no se obtenga una línea recta a través de las diluciones de la muestra de prueba y que esa línea sea paralela a la curva de calibración. El ensayo sería inválido y los resultados no serían exactos.

La dilución previa del crioprecipitado debe hacerse inmediatamente antes de comenzar el ensayo de factor VIII:C. Algunos centros utilizan el tampón empleado en el ensayo de factor VIII:C (por ejemplo, el tampón de Owren o bien imidazol o glioxalina), mientras que otros emplean plasma deficiente en factor VIII:C para este propósito. En general, las diluciones previas resultan más estables si se preparan con plasma deficiente en factor VIII:C, por lo que se recomienda el uso de este diluyente.

La precisión de los ensayos de factor VIII en crioprecipitado entre los centros de análisis es similar a la precisión que se alcanza en los ensayos de las muestras de plasma (Jennings et al. 2009).

### BIBLIOGRAFÍA

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID, Preston FE. Laboratory performance in the World Federation of Hemophilia EQA programme 2003–2008. *Haemophilia* 2009; 15: 571–7.

# Ensayo de coagulación de dos etapas para el factor VIII:C

25

## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Este ensayo fue descrito por primera vez en 1955 como una modificación del ensayo de tromboplastina diluida. El ensayo de dos etapas del factor VIII:C se basa en el principio que establece que la cantidad de factor VIII presente en el sistema tiene un efecto limitante durante la coagulación de una mezcla de prueba que contiene factor X, factor IX activado, fosfolípido, calcio y un exceso de factor V. Con la adsorción del plasma por parte del hidróxido de aluminio se eliminan los factores activados y los factores dependientes de la vitamina K, proceso que es necesario para eliminar la protrombina de manera que no quede absolutamente nada en la mezcla de incubación inicial. Sin este paso, la mezcla tendría todos los componentes necesarios para la formación de fibrina, y por ende, se coagularía.

Las diluciones de plasma estándar y plasma de prueba adsorbidos se incuban con un reactivo combinado en la primera etapa, lo que genera factor Xa. En la segunda etapa, se añaden protrombina y fibrinógeno del pool de plasma normal, lo que permite la formación del coágulo. El tiempo de coagulación resultante depende de la cantidad inicial de factor VIII:C.

## REACTIVOS

- Reactivo combinado (ver *Producción del reactivo combinado* en la página 73.)
- Tampón veronal de Owren
- Pool de plasma normal (plasma sustrato): conservar en ultracongelación
- Plasma estándar o de referencia
- Plasma de control interno de calidad (CIC)
- $\text{CaCl}_2$  0,0125M (por ejemplo, dilución de 1 en 2 de  $\text{CaCl}_2$  0,025M tal como se utiliza en la prueba de TTPA)
- Suspensión de hidróxido de aluminio (por ej., de SIGMA. Código de catálogo A8222): almacenar a temperatura ambiente.

## REQUISITOS DE LA MUESTRA

Plasma citratado, que, de ser necesario, se puede conservar congelado hasta la realización de la prueba.

## MÉTODO

- 1 Reconstituir el plasma estándar con agua destilada durante 10 minutos antes de utilizarlo y el reactivo combinado con 3 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,0125M durante 15 minutos, como mínimo, antes de utilizar.
- 2 Preparar el plasma CIC y el plasma sustrato. Si alguno de ellos estuviera congelado, descongelar a 37 °C durante 5 minutos antes de utilizarlos.
- 3 Etiquetar una cantidad suficiente de tubos de plástico desechables para las muestras, el plasma CIC y el plasma estándar.
- 4 Colocar 0,45 ml de plasma estándar, el plasma CIC y del paciente en cada tubo de plástico.
- 5 Añadir 50 µl de hidróxido de aluminio, bien homogeneizado, a cada tubo. Mezclar bien.
- 6 Para los volúmenes de plasma más pequeños, utilizar 0,225 ml de plasma y 25 µl de óxido de aluminio.
- 7 Incubar a 37 °C durante 3 minutos, luego centrifugar a 5000 g durante 2 minutos en una centrifugadora adecuada.
- 8 Transferir inmediatamente el plasma sobrenadante a las tasas o tubos de plástico compatibles con el equipo analizador que se esté utilizando. Evitar remover el hidróxido de aluminio sedimentado.

*Importante: Los siguientes pasos se han formulado en base a un equipo analizador Sysmex serie CA pero el ensayo puede llevarse a cabo con instrumentos de otros fabricantes. Uno de los coautores de este manual ha llevado a cabo ensayos en equipos analizadores de Instrumentation Laboratory con resultados satisfactorios. Es muy probable que el método que se detalla aquí sea compatible con otros tipos de analizadores. Por ende, el método específico que se menciona a continuación se incluye a modo ilustrativo.*

- 9 Cargar el reactivo combinado, el tampón del ensayo y el pool de plasma normal (o el sustrato) en el analizador automático.
- 10 Los plasmas adsorbidos se presentan en el siguiente orden para su análisis: estándar, CIC, del paciente y, por último, un segundo plasma estándar. Las muestras con una concentración normal de factor VIII por lo general se analizan empleando tres diluciones diferentes en un rango entre 1/50 y 1/400.

Para los niveles bajos de factor VIII (< 0,05 UI/dl) puede ser necesario recurrir a diluciones de 1/10, 1/20 y 1/50. Para los niveles elevados (>1,5 UI/dl), puede ser necesario emplear diluciones de 1/800 a 1/3200. De lo contrario, las líneas de respuesta a la dosis del paciente podrían no ser paralelas a la línea estándar.



## RESULTADOS

Representar los resultados y cálculos de actividad del factor VIII de la forma que se describe para el ensayo de una etapa (capítulo 23).

### 25.1 Producción del reactivo combinado para el ensayo de dos etapas de factor VIII:C

Tomar una cantidad suficiente de factor V y fosfolípido para generar un volumen con una proporción de 5:1:1 con suero envejecido diluido (es decir, 5 partes de suero por 1 parte de factor V y 1 parte de fosfolípido). Por ejemplo, 240 ml de suero diluido, 48 ml de factor V y 48 ml de fosfolípido (o 180 ml:36 ml:36 ml).

#### REACTIVOS

- Suero envejecido
  - 1 10 ml de sangre de 6 donantes normales, como mínimo, en tubos comunes de vidrio (sin aditivos);
  - 2 incubar durante 4 horas a 37 °C y luego durante toda la noche a 4 °C;
  - 3 centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos;
  - 4 separar y mezclar el sobrenadante en un recipiente de vidrio no siliconado (se puede conservar congelado).
- Factor V bovino (Diagnostic Reagents Ltd., Thame, Oxfordshire, Inglaterra)  
Reconstituir cada uno con 1 ml de tampón de glioxalina.
- Fosfolípido (reactivo Bell and Alton, Diagnostic Reagents Ltd., Oxford, Inglaterra)  
Reconstituir cada uno con 1 ml de tampón de glioxalina (es decir, usando una concentración de 5x).
- Tampón de glioxalina
- Ácido HEPES (N-2 hidroxietil piperazina.N'-2-etano sulfónico) (Sigma H3375)

#### MÉTODO

- 1 Diluir el suero envejecido en el tampón de glioxalina en una proporción de 1/10.
- 2 Activar el suero diluido durante una hora añadiendo una perla de vidrio por ml y colocar en un agitador rotativo durante una hora cubriendo con papel film para laboratorio. (Nota: 100 perlas pesan 3,7 g).

*Importante: para los pasos 3 a 8, proceder con la mayor celeridad posible.*

- 3 Reconstituir el plasma con factor V en 1 ml de tampón de glioxalina.
- 4 Reconstituir el fosfolípido en 1 ml de tampón de glioxalina.
- 5 Mezclar el suero activado diluido, el factor V y el fosfolípido en una proporción de 5:1:1.
- 6 Mezclar bien y añadir el polvo de HEPES para obtener una concentración del 1% a fin de estabilizar el pH en 7,0 (por ej., si la cantidad de fluido es de 300 ml, añadir 3 g de HEPES).
- 7 Repartir en volúmenes de 0,5 ml.
- 8 Se podrá liofilizar las muestras (ver el capítulo 40 sobre liofilización).
- 9 Verificar que el nuevo reactivo esté en óptimas condiciones, como se describe a continuación.

#### **EVALUACIÓN DE LA MESETA DE GENERACIÓN DEL FACTOR XA**

Para obtener la meseta de generación del factor Xa, es necesario evaluar sistemáticamente la dilución óptima de la muestra, el tiempo de incubación, el volumen total del ensayo, el volumen de reconstitución con  $\text{CaCl}_2$  0,0125M, la duración de la reconstitución y la estabilidad del reactivo combinado reconstituido.

El orden y alcance que se indican a continuación no son fijos, sino que pueden modificarse en función del lote. Es recomendable utilizar las mismas condiciones que emplee el lote en uso y luego ir cambiando un parámetro por vez.

- Volumen de reconstitución con  $\text{CaCl}_2$  0,0125M: 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml, 2,5 ml, 3 ml, 3,5 ml.
- Duración de la reconstitución antes del uso y estabilidad posterior a la reconstitución: inmediatamente antes del uso, a los 5 minutos, a los 10 minutos, a los 30 minutos, a los 60 minutos, a los 120 minutos.
- Tiempo de incubación: 5 minutos, 6 minutos, 7 minutos, 8 minutos, 9 minutos, 10 minutos.
- Dilución de la muestra: 1/20, 1/50, 1/80, 1/100.
- Volumen del reactivo combinado para el ensayo: 20  $\mu\text{l}$ , 30  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$ , etc.

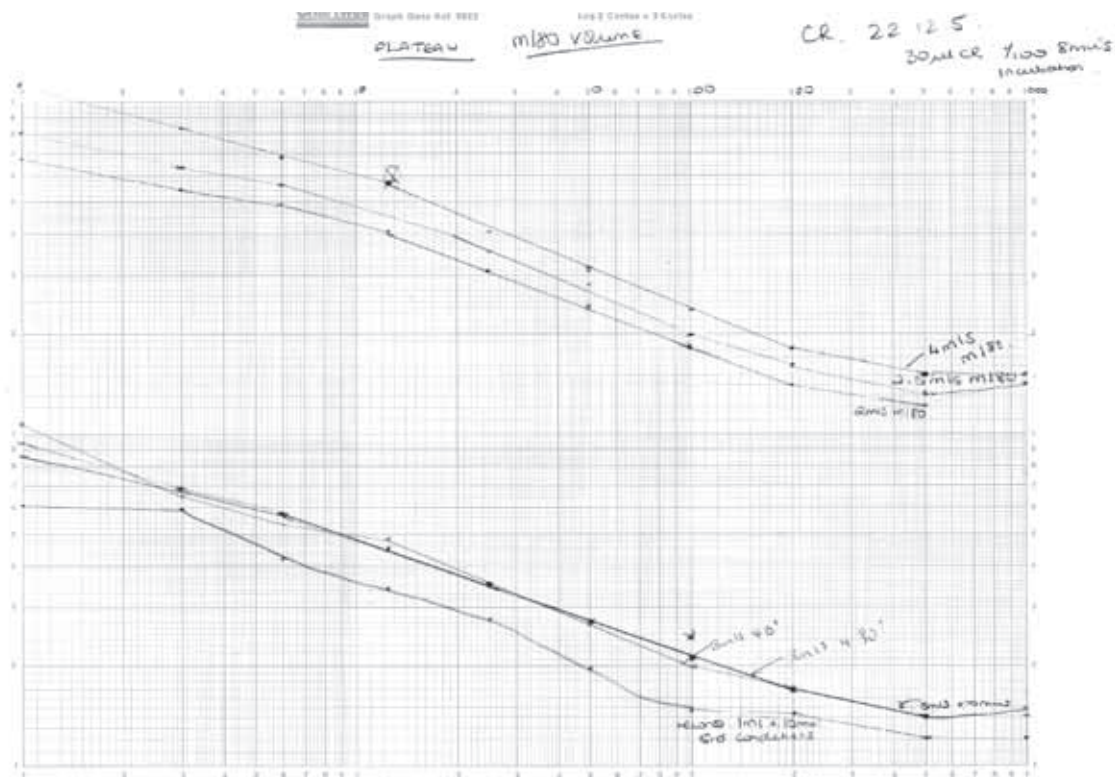
Para cada ensayo realizado, graficar todos los resultados en una hoja para escalas logarítmicas dobles, como se muestra en la figura 25.1. Seleccionar las diluciones y condiciones que tengan la mayor cantidad de puntos en la parte lineal de la curva. En condiciones ideales, los tiempos de coagulación van de 20 a 30 segundos para la primera dilución.



### OBSERVACIONES:

- El pool de plasma normal o el sustrato se prepararán a partir de plasma residual normal que tenga resultados normales en las pruebas de rastreo de coagulación o que provenga de individuos normales y sanos.
- Los plasmas constituyentes deberían tener un TP normal y un TTPA normal.
- El pool de plasma normal puede almacenarse en pools de 3 ml o 5 ml en viales de plástico a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante por lo menos seis meses.

Figura 25.1. Ejemplo de la meseta de generación del factor Xa



### INTRODUCCIÓN

Durante años, el ensayo más común para analizar el factor VIII:C en todo el mundo fue el ensayo de una etapa que se describe en el capítulo 23.

No obstante, dicho ensayo tiene limitaciones como la interferencia que puede provocar la presencia del anticoagulante lúpico. Pero lo que es más importante, es que con el ensayo de una etapa la detección de un nivel normal de factor VIII:C no excluye la hemofilia A leve. Varios grupos han informado que un subgrupo de pacientes con hemofilia A leve presentó discrepancias entre los resultados de los distintos tipos de ensayos que analizan la actividad del factor VIII (Parquet-Gernez et al. 1988, Duncan et al. 1994, Keeling et al. 1999). Más del 20% de los pacientes con hemofilia A leve presentan esta discrepancia, que se estableció en una diferencia del doble entre los resultados obtenidos con los distintos sistemas de ensayo (Parquet-Gernez et al. 1988).

En algunos casos, el resultado del ensayo de una etapa puede ser cinco veces superior al resultado del ensayo de coagulación de dos etapas o por método cromogénico (Parquet-Gernez et al. 1988). Por lo general, el resultado del ensayo de una etapa es de más del doble que el obtenido en el ensayo de coagulación de dos etapas o por método cromogénico. En más de las tres cuartas partes de los pacientes, todos los resultados de los ensayos se encuentran por debajo del límite inferior del rango de referencia, de manera que el diagnóstico que se haga será confiable, independientemente del método de análisis utilizado.

Sin embargo, en un pequeño número de pacientes, los resultados del ensayo de una etapa se encuentran dentro del rango normal pero en el ensayo de coagulación de dos etapas o por método cromogénico indican un nivel reducido (Keeling et al. 1999, Mazurier et al. 1997). Dichos pacientes tienen antecedentes hemorrágicos compatibles con los bajos niveles obtenidos en el ensayo de coagulación de dos etapas o por método cromogénico.

En muchos casos, se logra identificar el defecto genético, de manera que no quedan dudas respecto de que dichos individuos efectivamente padecen hemofilia (Rudzi et al. 1996, Mazurier et al. 1997). Según lo publicado, entre el 5% y el 10% de los pacientes con hemofilia A leve confirmada genéticamente presentan un resultado normal en el ensayo de una etapa. Debido a que la actividad del factor VIII es normal en el ensayo de una etapa basado en el TTPA, no es sorprendente que estos pacientes también presenten un TTPA normal. Esto significa que los pacientes con una historia clínica compatible

con hemofilia A deben someterse a un ensayo de coagulación de dos etapas (ver el capítulo 25) o a un ensayo por método de sustrato cromogénico, incluso si el TTPA y el ensayo de una etapa dan resultados normales.

Existen en el mercado varios kits para realizar el ensayo por método cromogénico del factor VIII. Muchos de ellos son útiles para el diagnóstico de la hemofilia A incluso cuando el ensayo de una etapa da un resultado normal de actividad del factor VIII. La figura 26.1 presenta ejemplos de los resultados de los pacientes antes mencionados. Si bien el ensayo cromogénico empleado fue un kit comercial de Siemens/Dade Behring, su mención no indica que es superior a los otros ensayos de características similares, que podrían emplearse con buenos resultados en este contexto.

**Figura 26.1. Ejemplos de pacientes con hemofilia A leve confirmada genéticamente y discrepancias en los resultados de los ensayos**

Caso	Ensayo de una etapa (UI/dl)	Ensayo de coagulación de dos etapas (UI/dl)	Ensayo por método cromogénico (UI/dl)
A	101	34	13
B	88	15	28
C	63	30	40
D	55	24	40
E	58	21	33
F	72	21	36
G	84	19	45

Existen casos de hemofilia A leve que muestran una actividad disminuida en el ensayo de una etapa, pero resultados normales en el ensayo de dos etapas o por método cromogénico (Mumford et al. 2002, Lyall H et al. 2008). En gran parte de esos casos, aunque no en todos, el fenotipo clínico guarda relación con el resultado del ensayo de coagulación de dos etapas o por método cromogénico en cuanto a que no existen antecedentes hemorrágicos personales ni familiares y a que no ha sido necesario recurrir a la terapia de reemplazo de factor VIII (Lyall H et al. 2008).

Teniendo en cuenta estos resultados, se ponen de relieve las ventajas que tendría que todos los centros de tratamiento de hemofilia pudieran realizar ensayos por métodos cromogénicos o de coagulación de dos etapas. Estos ensayos se deberán llevar a cabo en individuos con antecedentes personales o familiares de hemofilia leve y que presenten resultados normales en el TTPA y en la actividad de factor VIII según el ensayo de una etapa.

Por otra parte, se ha descrito un ensayo por método cromogénico modificado (una versión modificada del ensayo Coamatic de Instrumentation Laboratory Ltd.). Resulta adecuado para el análisis de niveles muy bajos de factor VIII

(Yatuv et al. 2006) y se ha informado que el método de ensayo permite una medición exacta y precisa del factor VIII en el rango de 0,1 a 2 UI/dl (0,1 a 2% de factor VIII o 0,001 a 0,02 UI/ml).

### PRINCIPIO DE ANÁLISIS

En gran parte de los ensayos cromogénicos, aunque no en todos, la totalidad del factor VIII presente en la muestra es activada por la trombina. El factor VIII activado acelera la conversión de factor X en factor Xa en presencia de factor IX activado, fosfolípidos e iones de calcio. La actividad del factor Xa es evaluada mediante la hidrólisis de un sustrato p-nitroanilina específico del factor Xa. La tasa de liberación inicial de la p-nitroanilina (de color amarillo) medida en 405 nm es proporcional a la actividad del factor Xa y, por ende, a la actividad del factor VIII en la muestra. Para más información, consultar Lundblad et al. (2000).

### BIBLIOGRAFÍA

- Duncan EM, Duncan BM, Tunbridge LJ, Lloyd JV. Familial discrepancy between the one-stage and two-stage factor VIII assay methods in a subgroup of patients with haemophilia A. *Br J Haematol* 1994; 87: 846-848.
- Keeling DM, Sukhu K, Kemball-Cook G, Waseem N, Bagnall R, and Lloyd JV. Diagnostic importance of the two stage FVIII:C assay demonstrated by a case of mild haemophilia associated with His1954 → Leu substitution in the FVIII A3 domain. *Br J Haematol* 1999; 105: 1123-6.
- Lundblad RL, Kingdon HS, Mann KG, White GC. Issues with the assay of FVIII activity in plasma and FVIII concentrates. *Thromb Haemost* 2000; 84:942-8.
- Lyall H, Hill M, Westby J, Grimley C, Dolan G. Tyr346 → Cys mutation results in factor VII:C assay discrepancy and a normal bleeding phenotype: Is this mild haemophilia A? *Haemophilia* 2008; 14:78-80.
- Mazurier C, Gaucher C, Jorieux S, Parquet-Gernez A. Mutations in the FVIII gene in seven families with mild haemophilia A. *Br J Haematol* 1997; 96:426-7.
- Mumford AD, Laffan M, O'Donnell J, McVey JH, Johnson DJD, Manning RA, Kemball-Cook G. A Tyr346→Cys substitution in the interdomain acidic region a1 of FVIII in an individual with FVIII:C assay discrepancy. *Br J Haematol* 2002; 118:589-594.
- Parquet-Gernez A, Mazurier C, Goudemand M. Functional and immunological assays of FVIII in 133 haemophiliacs: Characterisation of a subgroup of patients with mild haemophilia A and discrepancy in 1- and 2-stage assays. *Thromb Haemost* 1998; 59:202-206.
- Rudzi Z, Duncan EM, Casey GJ, Neuman M, Favaloro RJ, Lloyd JV. Mutations in a subgroup of patients with mild haemophilia A and familial discrepancy between one-stage and two-stage factor VIII:C methods. *Br J Haematol* 1996; 94:400-406.
- Yatuv R, Dayan I, Baru M. A modified chromogenic assay for the measurement of very low levels of FVIII activity (FVIII:C). *Haemophilia* 2006; 12:253-257.

# Ensayo de una etapa para análisis de precalicreína y cininógeno de alto peso molecular en la vía intrínseca

27

## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

El cininógeno de alto peso molecular (KAPM o factor Fitzgerald) y la precalicreína (PK o factor Fletcher) son factores de la coagulación que se encuentran en la vía de contacto. Una disminución de cualquiera de los dos causa un TTPA marcadamente prolongado con la mayoría de los reactivos de TTPA, en función del activador empleado. Ante la ausencia total de cininógeno de alto peso molecular o precalicreína (<1 U/dl), el TTPA por lo general es >200 segundos y es mayor que el TTPA obtenido con el mismo sistema de ensayo ante una deficiencia total de los factores VIII o IX. Los reactivos de TTPA que emplean ácido elálgico como activador (por ejemplo, Actin FS) darán resultados completamente normales ante cualquier deficiencia. En consecuencia, no pueden utilizarse dichos reactivos en el ensayo de una etapa de estos factores.

La curva de respuesta a la dosis del ensayo de una etapa de dichos factores es más pronunciada para ciertos reactivos. El método que se presenta a continuación describe el uso de un reactivo específico para el cual la curva de respuesta a la dosis es especialmente pronunciada, lo que lleva a obtener resultados más precisos y exactos en el ensayo.

## REACTIVOS

- Reactivo para TTPA Dapttin (Technoclone, Viena, Austria)  
Conservar entre 2 °C y 8 °C, según las instrucciones del fabricante.
- CaCl<sub>2</sub> 25mM  
Conservar entre 2 °C y 8 °C.
- Tampón veronal de Owren  
Conservar entre 2 °C y 8 °C.
- Plasma deficiente en precalicreína (factor Fletcher)  
Por ejemplo: Plasma liofilizado (Technoclone, Viena, Austria).  
Conservar entre 2 °C y 8 °C.
- Plasma deficiente en KAPM (factor Fitzgerald)  
Por ejemplo: Plasma liofilizado (Technoclone, Viena, Austria).  
Almacenar entre 2 °C y 8 °C.
- Plasma de referencia (por ejemplo, se puede usar un pool de plasma normal. Ver el capítulo 7.)
- Muestra de control interno de calidad

## MÉTODO

---

- 1 La estructura del ensayo es la misma que para los ensayos de una etapa del factor VIII descritos en el capítulo 23 (es decir, con 3 diluciones de plasma estándar y 3 diluciones de plasma de prueba).
  - 2 Hacer las diluciones con tampón de Owren.
  - 3 Las diluciones más adecuadas para el ensayo en general son mayores que las que se utilizan en los ensayos de una etapa de los factores VIII o IX antes descritos.
  - 4 Para el análisis y la construcción de la curva de calibración, así como para el cálculo de los resultados del ensayo, proceder de la misma manera que con los ensayos de una etapa del factor VIII (capítulo 23).
- 

Los rangos normales que se desprenden de lo informado en las publicaciones son los siguientes:

Cininógeno de alto peso molecular: 0,70 a 1,20 U/ml (70 a 120 U/dl)

Precalicroína: 0,70 a 1,20 U/ml

Al momento de redacción de este manual, no hay estándares internacionales referidos a cininógeno de alto peso molecular ni a precalicroína.



# Prueba de rastreo de los inhibidores de los factores de la coagulación basado en el TTPA

28

## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Los inhibidores de la coagulación que afectan al TTPA pueden ser de acción inmediata o de acción progresiva. El plasma de prueba que contenga un inhibidor de acción inmediata, mostrará una corrección escasa o nula del tiempo de coagulación cuando se mezcle con plasma normal. Por el contrario, el plasma con un inhibidor de acción progresiva requerirá un período de incubación con plasma normal antes de que se lo pueda detectar.

Se incuban el plasma normal y el plasma de prueba a 37 °C entre 1 y 2 horas, tanto por separado como en una mezcla 50:50. Luego, se determina el TTPA del plasma normal, del plasma de prueba y de la mezcla incubada y también de una mezcla preparada con volúmenes iguales de plasma de prueba y plasma normal después de haberlos incubado por separado (mezcla para prueba inmediata). A continuación se compara el nivel de corrección del TTPA de cada mezcla.

Una mala corrección en la mezcla preparada después de la incubación por separado será un indicio de la presencia de un inhibidor de acción inmediata, mientras que una mala corrección en la mezcla incubada indica la presencia de un inhibidor de acción progresiva.

## REACTIVOS

- Plasma normal: pool de 20 donantes
- Plasma de prueba
- Reactivos para TTPA

## MÉTODO

- 1 Preparar 3 tubos de plástico: A, B y C.
- 2 Poner 0,5 ml de plasma normal en el tubo A, 0,5 ml de plasma de prueba en el tubo B y 0,2 ml de plasma normal y 0,2 ml de plasma de prueba en el tubo C.
- 3 Incubar entre 1 y 2 horas a 37 °C.

- 4 Hacer una mezcla 50:50 de los tubos A y B que se colocará en el tubo D y servirá como mezcla para la prueba inmediata.
- 5 Realizar la prueba de TTPA por duplicado en los tubos A, C, D y B (en ese orden).

## RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

**Figura 28.1. Ejemplo de una prueba de rastreo de los inhibidores de los factores de coagulación basado en el TTPA**

Muestra	1	2	3
A: Plasma normal	40	40	40
B: Plasma de prueba	90	90	90
C: Prueba + normal (incubados después de mezclarlos)	45	70	70
D: Prueba + normal (incubados por separado antes de mezclarlos)	45	48	70

Muestra 1: plasma con un defecto intrínseco pero sin inhibidores.

Muestra 2: plasma con un inhibidor de acción progresiva.

Muestra 3: plasma con un inhibidor de acción inmediata.



## INTRODUCCIÓN

El ensayo del cofactor ristocetina es esencial para el diagnóstico de la enfermedad de von Willebrand (EvW). Si bien la prueba de agregometría plaquetaria inducida por ristocetina (en el plasma rico en plaquetas) puede llevarse a cabo cuando se realizan los estudios de agregometría plaquetaria, dicha prueba no es lo suficientemente sensible, de manera que podría detectar una agregación deficiente en los trastornos distintos de la EvW. El ensayo FvW:RCo es especialmente útil para la detección de la EvW de tipo 2A, 2B y 2M en las que el antígeno del FvW (FvW:Ag) puede resultar normal o casi normal mientras que el FvW:RCo es notablemente bajo.

## ENSAYO DE COFACTOR RISTOCETINA

El método que se describe a continuación combina un método de ensayo macroscópico y la técnica de fijación de plaquetas de Evans y Austen.

## REACTIVOS

- Plasma de referencia
- Plaquetas fijadas lavadas  
Las plaquetas humanas normales fijadas con formaldehído se preparan a partir de concentrados plaquetarios, como los usados para el tratamiento de pacientes con alteraciones plaquetarias, mediante el método de Evans y Austen (1977). Ver el apartado *Preparación de plaquetas fijadas* en la página 85.
- Ristocetina (Ristocetin A SO4 Macrofarm Ltd., Third Floor, 27 Cockspur Street, Trafalgar Square, Londres, SW1Y 5BN)  
Diluir 100 mg de polvo en 3,3 ml de solución salina. Colocar 0,1 ml en tubos de plástico con tapa y conservar a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La solución madre (*stock*) preparada tiene una concentración de 30 mg/ml. La concentración final necesaria en el tubo de ensayo es de 1,0 mg/ml. Para la dilución de 1 en 4 que requiere el ensayo será necesaria una solución que tenga una concentración de 4,0 mg/ml. Para obtener dicha concentración, añadir 0,65 ml de solución salina a 0,1 ml de solución madre con una concentración de 30 mg/ml. (plaquetas 0,2 + ristocetina 0,1 ml + tampón 0,1 debería dar un tiempo testigo  $>60$  segundos).

- Tampón salino-citrato-albúmina 6g%  
Preparar el citrato con la solución salina (1 parte de citrato trisódico 0,11 M: 5 partes de solución salina normal) y añadir 1,2 g de albúmina de suero bovino.

## MÉTODO

---

- 1 Usando el tampón salino-citrato-albúmina, diluir el plasma normal y el plasma de prueba de la siguiente forma:
  - Plasma estándar: 1/2, 1/4, 1/8;
  - Plasma de prueba: 1/2, 1/4, 1/8.
- 2 Probar cada dilución a temperatura ambiente de la siguiente forma:
  - i. En un tubo de coagulación de vidrio colocar:
    - 0,2 ml de plaquetas fijadas lavadas (concentración de  $800 \times 10^9/l$  en solución de suspensión).
    - 0,1 ml de plasma diluido.
  - ii. Mezclar bien, procurando evitar que se generen burbujas. Añadir 0,1 ml de ristocetina (4,0 mg/ml, para alcanzar una concentración final de 1,0 mg/ml).
  - iii. Poner en marcha el cronómetro e inclinar enérgicamente el tubo de un lado a otro contra un fondo oscuro y con una lámpara que enfoque el tubo.
  - iv. Anotar el tiempo que tarda en formarse un agregado de un tamaño notorio.

Probar cada dilución por duplicado y por triplicado si la diferencia entre los duplicados es >10%.

---

## CÁLCULO

Representar el tiempo que tardan en aglutinarse las diluciones de plasma normal contra la dilución/concentración en una hoja para escala logarítmica doble de 2 ciclos. Representar los tiempos obtenidos con las diluciones del plasma de prueba. Los gráficos deben mostrar líneas rectas y paralelas.

Hacer una lectura de la concentración del cofactor ristocetina en el plasma de prueba a partir del estándar y corregir la dilución y el valor del estándar de la forma que se indicó para los ensayos de una etapa de factor VIII (ver el capítulo 23).

El rango normal deberá establecerse dentro del laboratorio, pero por lo general se encuentra aproximadamente entre 50 y 150 UI/dl.

## 29.1 Preparación de plaquetas fijadas

**Figura 29.1. Reactivos para la preparación de plaquetas fijadas**

Solución de EDTA al 0,2%	2 g de EDTA disódico, 8,5 g de NaCl, agua destilada hasta completar 1 litro (pH: 6,4)
Solución fijadora	20 ml de solución de formaldehído al 40% (o 22,2 ml de formaldehído al 36%). 0,2 g de EDTA disódico, 8,5 g de NaCl, 0,4 de fosfato hidrogenado disódico, 1,1 g de dihidrógeno fosfato de sodio dihidrato, agua destilada hasta completar 1 litro (pH: 6,4)
Solución de lavado	1 parte de solución de citrato trisódico (3,8%) 5 partes de solución salina (pH: 6,4)
Solución de suspensión	Igual que la solución de lavado, pero con un pH de 7,4.
Solución conservadora	0,2 g de EDTA disódico, 8,5 g de NaCl, 0,10 g de azida de sodio, agua destilada hasta completar 1 litro (pH: 6,4)

### MÉTODO

- 1 Emplear plaquetas lo más frescas posibles conservadas en citrato-fosfato-dextrosa (al igual que en la extracción de productos sanguíneos) o colocar sangre en citrato 0,109 M y preparar plasma rico en plaquetas (PRP).
- 2 Dejar el PRP en un recipiente de plástico tapado a temperatura ambiente durante una hora y luego a 37 °C durante otra hora. Mezclar nueve partes de PRP con una parte de la solución de EDTA. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- 3 Añadir un volumen igual de solución fijadora a 4 °C y dejar durante toda la noche a 4 °C.
- 4 Centrifugar a 280 g durante 20 minutos. Retirar el sobrenadante y dejar escurrir el pellet plaquetario.
- 5 Añadir la solución de lavado en una cantidad equivalente al 2% del volumen inicial del PRP y resuspender las plaquetas.
- 6 Volver a diluir al 25% del volumen del inicial PRP y dejar a 4 °C durante 1 hora.
- 7 Centrifugar a 280 g durante 20 minutos, dejar escurrir y resuspender en la solución de suspensión para su uso inmediato o en la solución conservadora a 4 °C para su uso posterior.

- 
- 8 Resuspender hasta alcanzar una concentración de aproximadamente  $800 \times 10^9/l$ .
- 

Las plaquetas se asentarán durante su conservación y formarán sedimentos sueltos. Antes de dar inicio a un ensayo, retirar la solución conservadora de la parte superior de las plaquetas y sustituir con el mismo volumen de solución de suspensión. Las plaquetas permanecerán estables durante al menos 2 meses.

### **BIBLIOGRAFÍA**

Evans RJ, Austen DE. Assay of ristocetin cofactor using fixed platelets and a platelet counting technique. *Brit J Haemato* 1997; 37: 289-94.

# Ensayo del antígeno del factor von Willebrand (FvW:Ag) por método ELISA

30

## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Se recubre la superficie plástica de los pocillos de una placa de microtitulación con un anticuerpo policlonal contra el factor von Willebrand (FvW) humano. Se añaden diluciones del plasma de prueba y del plasma estándar y se incuban, proceso durante el cual el anticuerpo se unirá al FvW. Se añade un segundo anticuerpo marcado con enzimas, que a su vez se une al FvW. La cantidad de anticuerpo unido, y por tanto de FvW presente, se cuantifica añadiendo un sustrato enzimático, lo que provoca la aparición de un color.

## TAMPONES

- Tampón de carbonato 0,05 M (pH: 9,6)  
Para 1 litro: 1,59 g de carbonato de sodio  
2,93 g de carbonato hidrogenado de sodio  
0,20 g de azida sódica
- Tampón de fosfato salino (PBS) 0,01 M (pH: 7,2)  
Para 1 litro: 0,345 g de fosfato dihidrogenado de sodio  
2,680 g de fosfato hidrogenado disódico  $12\text{H}_2\text{O}$   
8,474 g de cloruro sódico  
Tween PBS 20, 1 ml/1  
Tween PBS 20, 0,5 ml/1
- Tampón citrato fosfato 0,1 M (pH: 5,0)  
Para 1 litro: 7,30 g de ácido cítrico  
23,87 g de fosfato hidrogenado disódico  $12\text{H}_2\text{O}$

## SOLUCIÓN SUSTRATO

Disolver 80 mg de 1,2 dicloruro de ortofenilendiamina en 15 ml de tampón citrato fosfato. Añadir 10  $\mu\text{l}$  de peróxido de hidrógeno de 20 vol.

*Importante: Preparar solución fresca al momento de utilizarla.*

## OTROS MATERIALES

- Anticuerpo anti-FvW  
Por ejemplo: FvW antihumano de conejo de DAKO A/S (Produktionsvej, DK-2600 Glastrup, Dinamarca).

- Anticuerpo anti-FvW, conjugado con enzima peroxidasa (también de DAKO).

*Importante: Se pueden utilizar anticuerpos de otros fabricantes con los mismos resultados. La dilución del anticuerpo sugerida más adelante puede variar en función del fabricante y del número de lote del anticuerpo utilizado.*

- Placas de microtitulación desechables y lector de placas.
- Solución de ácido sulfúrico al 10%.

## MÉTODO

- 1 En cada pocillo a utilizar añadir 100 µl de anticuerpo diluido en el tampón de carbonato en una proporción de 1/1000. Incubar la placa durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- 2 Lavar los pocillos llenándolos con Tween PBS 0,5 ml/l. Colocar las placas boca abajo y sacudir ligeramente sobre papel *absorbente*. Repetir la operación 4 veces.
- 3 Diluir el plasma estándar (1/20, 1/30, 1/40, 1/50, 1/80, 1/160, 1/320) y el plasma de prueba (1/20, 1/40, 1/80 y 1/160 si se esperan resultados normales y 1/5 si se esperan resultados bajos) en Tween PBS 1 ml/l.
- 4 Añadir 100 µl de cada dilución a los pocillos, incubar durante 1 hora y lavar la placa. La incubación y el lavado se harán de la misma forma que se indica más arriba.
- 5 Añadir 100 µl del anticuerpo anti-FvW conjugado con la peroxidasa de DAKO (diluido en 1/1000 en Tween PBS 1 ml/l) a cada pocillo e incubar como se indica más arriba.
- 6 Preparar el sustrato y protegerlo de la luz cubriendo el agitador universal con papel de aluminio. Mezclar hasta que se disuelvan los cristales o la tableta (añadir peróxido de hidrógeno al momento de utilizar el sustrato).
- 7 Encender el lector de placas.
- 8 Lavar los pocillos dos veces en Tween PBS 0,5 ml/l y una vez en tampón de citrato fosfato 0,1 M.
- 9 Añadir 100 µl de solución de sustrato fresca a cada pocillo e incubar la placa en cámara húmeda a temperatura ambiente durante aproximadamente 6 minutos (hasta que aparezca el color en la dilución más baja del estándar).
- 10 Detener la reacción añadiendo 100 µl de solución de ácido sulfúrico al 10% a cada pocillo, con la misma velocidad con la que se añadió el sustrato. Si

se utiliza una pipeta multicanal, es conveniente añadir el sustrato a una hilera de pocillos por vez con un intervalo de 10 segundos entre una hilera y otra y luego añadir el ácido sulfúrico con la misma secuencia y con los mismos intervalos de 10 segundos.

---

**11** Hacer una lectura de la densidad óptica (DO) a 492 nm.

---

Para obtener los resultados, representar la densidad óptica contra la dilución en una hoja para escala logarítmica doble. El gráfico y los cálculos se harán siguiendo las indicaciones dadas en el capítulo 23 para el ensayo de una etapa del factor VIII.

## Ensayo de enlace al colágeno del factor von Willebrand (FvW:CB)

### FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

El factor de Willebrand (FvW) tiene múltiples funciones. Además de ser la proteína que transporta al factor VIII en el plasma y forma un complejo que protege a dicho factor de la proteólisis, también actúa como mediador en la agregación plaquetaria adhiriéndose a los receptores de la membrana plaquetaria (GpIb y GpIIb/IIa) después de la activación plaquetaria. También es importante en la hemostasia primaria, en la que actúa como mediador entre las plaquetas y el subendotelio.

El ensayo de FvW:RCo (capítulo 29) sirve para evaluar las propiedades de adhesión del FvW, pero puede no reflejar su función fisiológica. La evaluación de la capacidad del FvW para ligar colágeno puede, en algunos casos, reflejar mejor su función fisiológica. En la mayoría de los casos de la enfermedad de von Willebrand (EvW), aunque no en todos, los resultados del ensayo de actividad del FvW:RCo concuerdan con los del ensayo de FvW:CB. En los casos menos comunes de la EvW, una de esas actividades es baja y la otra se encuentra dentro del rango normal. Para poder lograr una caracterización total de la función sería necesario llevar a cabo ambos ensayos, aunque muchos centros solo utilizan uno de los dos. Algunos autores optan por el uso del ensayo de FvW:CB si no es posible realizar el de FvW:RCo con una precisión adecuada.

Al momento de redacción de este manual, varios kits para este ensayo están a la venta. A continuación se presenta un ejemplo, pero existen otros ensayos que también pueden emplearse con resultados satisfactorios. La inclusión de este método en particular no constituye una recomendación del producto de una empresa específica. Si se utiliza otro producto comercial se deberán seguir las instrucciones del fabricante correspondiente.

### REACTIVO

Kit TECHNOZYM para ensayo de FvW:CBA por método ELISA (TECHNOZYM VWF:CBA ELISA Kit) (Technoclone, Viena, Austria)

Conservar entre 2 °C y 8 °C, según las instrucciones del fabricante.

### MUESTRA

El plasma de prueba citratado y los calibradores puede conservarse en ultracongelación a una temperatura inferior a -35 °C antes de someterlos a análisis.



## MÉTODO

---

- 1 Dejar que el kit tome temperatura ambiente durante 30 minutos antes de comenzar el ensayo. El kit puede fraccionarse en tres o cuatro partes en función de la cantidad de las muestras que deban analizarse.
  - 2 Reconstituir las muestras estándar y de control con 0,5 ml de agua destilada y dejar reposar durante 15 minutos, o bien, descongelar los plasmas que estuvieran congelados. Someter a agitación vorticial intensa durante 10 segundos.
  - 3 Diluir todo el plasma de prueba, de control y estándar en una proporción de 1+ 25 (es decir, 20  $\mu$ l de plasma y 500  $\mu$ l de tampón de incubación), y luego someter a agitación vorticial.
  - 4 Fraccionar en alícuotas y conservar los calibradores y el plasma de control en el freezer a  $-80$  °C.
  - 5 Añadir 100  $\mu$ l de la dilución de cada muestra en el pocillo correspondiente, cubrir con film e incubar a temperatura ambiente (entre 20 °C y 25 °C) durante 45 minutos. Realizar todas las pruebas por duplicado.
  - 6 Preparar el tampón de lavado. Diluir 1 parte de tampón de lavado concentrada en 9 partes de agua destilada y mezclar bien. Si hubiera precipitados cristalinos, disolverlos por incubación a 37 °C durante 10 minutos antes de hacer la dilución.
  - 7 Pasados 45 minutos, lavar tres veces con 200  $\mu$ l de tampón de lavado diluida por pocillo, invertir y sacudir ligeramente sobre papel absorbente.
  - 8 Preparar la solución de trabajo conjugada diluyendo 1 parte de conjugado en 50 partes de tampón de incubación. Componer la solución al momento de usarla debido a que solo permanece estable durante 60 minutos. Para 8 pocillos, mezclar 20  $\mu$ l de conjugado con 1000  $\mu$ l de tampón.
  - 9 Añadir 100  $\mu$ l de la solución de trabajo conjugada a cada pocillo, cubrir e incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos.
  - 10 Lavar tres veces con 200  $\mu$ l de tampón de lavado tal como se indicó anteriormente; luego invertir y sacudir ligeramente sobre papel absorbente.
  - 11 Añadir 100  $\mu$ l de la solución sustrato a cada pocillo, cubrir con film e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
  - 12 Añadir 100  $\mu$ l de la solución de parada a cada pocillo.
-

.....  
**13** Agitar durante 10 segundos. Medir la densidad óptica (DO) con un lector de placas de microtitulación dentro de los 10 minutos a 450 nm.  
.....

**14** En una escala lineal doble, armar un gráfico (a mano o con un programa estadístico) de puntos (líneas) donde se represente la concentración del FvW:CB (en el eje x) contra la DO (en el eje y).  
.....

Rango normal: de 0,49 a 1,32 UI/ml.

### **BIBLIOGRAFÍA ADICIONAL**

Favaloro EJ. An update on the VWF collagen binding assay: 21 years of age and beyond adolescence but not yet a mature adult. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33:727-44.

Laffan M, Brown SA, Collins PW, Cumming AM, Hill FG, Keeling D, Peake IR, Pasi KJ. The diagnosis of VWD: A guideline from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation. *Haemophilia* 2004; 10:199-217.

# Ensayo de enlace del factor VIII para el diagnóstico de la variante Normandía de la enfermedad de von Willebrand

32

## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

El tipo 2 de la enfermedad de von Willebrand (EvW) consiste en una variante cualitativa que afecta la función de proteína del FvW. El tipo 2 Normandía (2N) se caracteriza por la presencia anormal de un nivel bajo el factor VIII:C provocada por la escasa afinidad del FvW con el factor VIII. Como consecuencia, el enlace del factor VIII es menor, por lo que queda menos protegido de la degradación o eliminación, lo que a su vez hace que tenga una menor concentración en el plasma. Las mutaciones responsables del tipo 2N de la EvW se encuentran en el dominio de unión del FvW al factor VIII. En lo que respecta al fenotipo, los pacientes con el tipo 2N de la EvW se asemejan a los pacientes con hemofilia leve (bajo nivel de factor VIII:C, por lo general con un nivel normal de FvW:RCo y FvW:Ag) pero presentan un patrón autosómico recesivo hereditario.

El ensayo de enlace del factor VIII consiste en un método basado en el método ELISA para determinar si el FvW se enlaza al factor VIII de manera normal. Se utiliza un anticuerpo monoclonal para capturar al FvW y cloruro cálcico para eliminar el factor VIII endógeno del FvW. Se añade una cantidad conocida de factor VIII recombinante al FvW enlazado y se espera que se produzca el enlace. El factor VIII unido se mide por medio de un ensayo cromogénico de factor VIII. Más adelante se describe un método de ensayo de enlace del factor VIII basado en una técnica publicada (Nesbitt et al. 1996).

Se desarrolló en forma reciente un ensayo de uso comercial (Asserachrom VWF:FVIII B, Diagnostica Stago) cuyos datos se publicaron en forma de resumen (Caron et al. 2009). Este ensayo es similar al que se describe más adelante en lo referido a los pasos analíticos iniciales. Se recubren los pocillos de la placa de microtitulación con anticuerpo de conejo anti-FvW, que se enlazan al complejo FvW/FVIII del plasma diluido del paciente. Después de la eliminación del factor VIII endógeno (del paciente), se añade factor VIII recombinante, que se enlaza al FvW del paciente en función de la naturaleza de la molécula del FvW del paciente. Este ensayo difiere del que se describe más adelante en lo que respecta al método de detección del factor VIII enlazado: el ensayo de uso comercial utiliza un anticuerpo de ratón anti-FVIII humano conjugado con peroxidasa. Se informó que el ensayo tiene una sensibilidad y una especificidad del 100% sobre la base del análisis de 37 casos de EvW de tipo 2N previamente diagnosticados y 13 portadores de mutaciones heterocigóticas (Caron et al. 2009), con un coeficiente de variación interensayo de <10% en las mediciones del porcentaje de enlace del factor VIII.

## REACTIVOS

- Anticuerpo monoclonal MAS 533p para el sitio de enlace GPIb del FvW (Oxford Biotechnology OBT0085, Oxford, Reino Unido)  
Conservar a 4 °C, según las instrucciones del fabricante. También pueden usarse anticuerpos de otros fabricantes con buenos resultados.
- Concentrado de factor VIII 2,5 U/ml (por ejemplo, Advate, Baxter Pharmaceutical)  
Conservar a -80 °C.  
  
Diluir el concentrado en tampón de HEPES preparada con:
  - 2,763 g/l de ácido HEPES
  - 2,188 g/l de sal HEPES
  - 8,19 g/l de NaCl
  - Añadir albúmina de suero bovino (BSA) al 1%
  - Preparada en 100 ml, pH al 7,35
- Kit cromogénico para factor VIII Coatest (Coatest FVIII chromogenic kit) (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, EE.UU.) Un kit alcanza para dos placas. Preparar el kit y conservar los reactivos restantes en el freezer a -80 °C.
- Ácido acético al 20%
- Muestras de control de calidad  
Incluir una muestra de control normal y, de ser posible, una muestra de control con EvW Normandía conocida.

## SOLUCIONES TAMPÓN

Pueden añadirse colorantes alimenticios a las soluciones tampón para que sea más sencillo verlas en la placa de microtitulación. Preparar soluciones frescas para cada ensayo.

- Tampón de citrato fosfato 0,1M (pH 5,0)  
Para 0,5 litro:
  - 3,65 g de ácido cítrico (BDH 10081)
  - 4,74 g de fosfato disódico de hidrógeno anhidro (BDH 102494C)
- Tampón salino Tris (TBS) 10x: Tris 50mM, NaCl 100mM (pH 8,0)  
Para 0,5 litro:
  - 30,27 g de Tris (Sigma)
  - 29,22 g de NaCl (Sigma)  
Requiere alrededor de 60 ml de HCL 1M para ajustar el pH.
- Tampón de lavado: TBS / BSA al 0,1%  
Para 1 litro:
  - 100 ml de TBS 10x
  - 900 ml de H<sub>2</sub>O
  - 1 g de albúmina bovina (Sigma)

- Diluyente de plasma: TBS/BSA al 3%  
Para 100 ml:
  - 10 ml de TBS 10x
  - 90 ml de H<sub>2</sub>O
  - 3 g de albúmina bovina (Sigma)
- Solución de cloruro cálcico 0,35M  
Para 50 ml:
  - 17,5 ml de solución de cloruro cálcico 1M
  - 32,5 ml de H<sub>2</sub>O
- Diluyente de FVIII  
Para 100 ml:
  - 100 ml de tampón de lavado
  - 0,147 g de cloruro cálcico
  - 0,002 ml de Tween 20 (Sigma P5927): sumergir la punta amarilla en el Tween y dejar que caiga 1 gota en el tampón.

## MÉTODO

El ensayo debe llevarse a cabo en tres días seguidos. Nótese que se deberá contar con los resultados del ensayo FvW:Ag de cada paciente a analizar antes de comenzar con este ensayo.

### *Día 1 (por la tarde)*

- 1 Diluir el anticuerpo monoclonal MAS 533p (Oxford Biotechnology) en el tampón de citrato 0,1M (pH: 5,0) hasta una concentración de 2,5 µg/ml (exactamente 50 µl de anticuerpo en 10 ml de tampón).
- 2 Recubrir la placa de microtitulación NUNC con 100 µl de la mezcla de anticuerpo y tampón y dejarla durante toda la noche a 4 °C cubierta con Parafilm (el preparado alcanza para cubrir 11 hileras; dejar la hilera 12 sin el recubrimiento).

### *Día 2 (por la tarde)*

- 3 Lavar cuatro veces con TBS (Tris 50mM, NaCl 100mM con un pH de 8,0) que contenga BSA al 0,1% y secar el líquido excedente con papel absorbente.
- 4 Añadir 100 µl de las diluciones seriadas de plasma (desde FvW:Ag ~1 U/dl hasta FvW:Ag 0,125 U/dl) en el TBS/BSA al 3% e incubar a 4 °C durante toda la noche en cámara húmeda. Consultar el apartado *Protocolo de dilución* que aparece a continuación y la figura 32.1 para ver la configuración de la placa.

### *Protocolo de dilución*

- Preparar cuatro diluciones de cada plasma de prueba por dilución 1:2. Comenzar con 0,6 ml como mínimo de la primera dilución.
- Diluir cada muestra para alcanzar una concentración de 1 U/dl (0,01 U/ml), de manera que es necesario conocer el FvW:Ag antes de comenzar con el ensayo. Por ejemplo, si el FvW:Ag es de 0,90 UI/ml, hacer una dilución inicial de 1/90; si el FvW:Ag es de 0,06 UI/ml, hacer una dilución inicial de 1/6, etc.
- Para las muestras del paciente y de control, diluir según el nivel de FvW:Ag hasta el valor más cercano a 0,05 U/ml (es decir, si el FvW:Ag = 0,13, diluir 1/15, etc.).

### *Día 3 (comenzar alrededor de las 9.30 de la mañana)*

- 5 Lavar de la forma antes indicada.
- 6 Para eliminar el FVIII endógeno, incubar dos veces con 100 µl CaCl<sub>2</sub> 0,35M durante una hora cada vez a temperatura ambiente. Desechar el primer volumen de CaCl<sub>2</sub> antes de añadir el segundo. No lavar entre una incubación y otra.
- 7 Lavar de la forma antes indicada.
- 8 Diluir 200 µl de FVIII con 10 ml de diluyente de FVIII para alcanzar una concentración de 0,05 U/ml de FVIII. Añadir 100 µl en cada pocillo e incubar durante dos horas a 37 °C.
- 9 Lavar de la forma antes indicada.
- 10 Utilizar el kit cromogénico para FVIII Coatest SP4 de la siguiente manera:
  - i. Retirar de la cámara fría 30 minutos antes de usarlo para que tome temperatura ambiente.
  - ii. Preparar los reactivos según las indicaciones que vienen con el kit:
    - FIXa + FX en 3 ml de agua destilada. Preparar 2 viales de cada uno.
    - S-2765 en 12 ml de agua destilada.
  - iii. En un vial plástico desechable, mezclar:
    - 5 partes de FIXa + FX (4,12 ml) (frescos)
    - 1 parte de fosfolípido (0,83 ml)
    - 3 partes de una dilución 1/10 del tampón del kit (250 µl del tampón del kit y 2,25 ml de agua)
  - iv. Añadir 75 µl de esta mezcla en cada pocillo y luego incubar durante cinco minutos a 37 °C.

- 11 Sin desechar la mezcla, añadir 25 µl de CaCl<sub>2</sub> 0,025M del kit en cada pocillo. Incubar durante cinco minutos a 37 °C.
- 12 Añadir 50 µl del sustrato cromogénico S-2765 en cada pocillo.
- 13 Dejar a 37 °C hasta que aparezca el color (por lo general, alrededor de 20 minutos) y controlar que 1,0 U/dl tenga una densidad óptica (DO) de entre 0,8 y 1,0. Hacer una lectura con el lector de placas a 405 nm (filtro 1).
- 14 Detener la reacción con 50 µl de ácido acético al 20% (preparado con 2 ml de ácido acético glacial y 8 ml de agua).
- 15 Volver a leer la absorbancia de cada muestra con el lector de placas a 405 nm (filtro 1).
- 16 Graficar la concentración del antígeno FvW contra la absorbancia a 405 nm del factor VIII enlazado. Presentar los resultados por medio de un gráfico y en un informe (ver el apartado *Interpretación de datos* más adelante).

**Figura 32.1. Configuración de una placa de microtitulación de 96 pocillos**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B1	CTL 1,0	PT2 1,0	PT4 1,0	PT6 1,0	PT8 1,0	CTL 1,0	PT2 1,0	PT4 1,0	PT6 1,0	PT8 1,0	
B	B2	CTL 0,5	PT2 0,5	PT4 0,5	PT6 0,5	PT8 0,5	CTL 0,5	PT2 0,5	PT4 0,5	PT6 0,5	PT8 0,5	
C	B3	CTL 0,25	PT2 0,25	PT4 0,25	PT6 0,25	PT8 0,25	CTL 0,25	PT2 0,25	PT4 0,25	PT6 0,25	PT8 0,25	
D	B4	CTL 0,125	PT2 0,125	PT4 0,125	PT6 0,125	PT8 0,125	CTL 0,125	PT2 0,125	PT4 0,125	PT6 0,125	PT8 0,125	
E	B5	PT1 1,0	PT3 1,0	PT5 1,0	PT7 1,0	N 1,0	PT1 1,0	PT3 1,0	PT5 1,0	PT7 1,0	N 1,0	
F	B6	PT1 0,5	PT3 0,5	PT5 0,5	PT7 0,5	N 0,5	PT1 0,5	PT3 0,5	PT5 0,5	PT7 0,5	N 0,5	
G	B7	PT1 0,25	PT3 0,25	PT5 0,25	PT7 0,25	N 0,25	PT1 0,25	PT3 0,25	PT5 0,25	PT7 0,25	N 0,25	
H	B8	PT1 0,125	PT3 0,125	PT5 0,125	PT7 0,125	N 0,125	PT1 0,125	PT3 0,125	PT5 0,125	PT7 0,125	N 0,125	

B = testigo

CTL = plasma de control

PT = muestras de prueba

N = control de EvW Normandía conocida (si hubiera)

Analizar las muestras de ocho pacientes por placa.



## INTERPRETACIÓN DE DATOS

---

- 1 Calcular la DO promedio de cada plasma de paciente, de control y de control negativo.
  - 2 En Excel, crear una planilla e ingresar los siguientes datos:
    - columna A: en A1 colocar: FvW:Ag U/dl; en A2: 1,0; en A3: 0,5; en A4: 0,25 y en A5: 0,125;
    - columna B: en B1: Nombre del paciente; de B2 a B5: DO promedio de las cuatro diluciones de los pacientes;
    - columna C: en C1: Control normal; de C2 a C5: DO promedio de las cuatro diluciones de control;
    - columna D: en D1: Control de Normandía; de D2 a D5: DO promedio de las cuatro diluciones de DR.
  - 3 Abrir el 'Asistente para gráficos' y seleccionar la opción 'XY (dispersión)' con líneas suaves. Seleccionar todas las columnas (las 4) y las DO, y verificar que 'Series' tenga tildada la opción 'columnas'.
  - 4 En el gráfico resultante, poner el título 'FvW:Ag U/dl' al eje x y el título 'Enlace del FVIII a 405 nm' al eje y. Incrustar el gráfico como un objeto en la hoja 1.
  - 5 Añadir una línea de tendencia lineal a las líneas de control normal y del paciente. Luego, elegir la opción 'mostrar la ecuación' en el gráfico para que muestre la fórmula de cada línea igual a  $y = 0 \dots x + 0 \dots y$ . Usar la parte  $0 \dots x$  para calcular la relación gradiente del paciente / gradiente de control.
- 

## BIBLIOGRAFÍA

- Caron C, Ternisien C, Wolf M, Fressinaud E, Goudemand J, Veyradier A. An accurate and routinely adapted ELISA for Type 2N von Willebrand disease diagnosis. Abstracts of Congress of International Society for Haemostasis and Thrombosis, Boston, 2009.
- Nesbitt IM, Goodeve AC, Guillatt AM, Makris M, Preston FE, Peake IR. Characterisation of type 2N von Willebrand disease using phenotypic and molecular techniques. *Thromb Haemost* 1996; 75:959-64.

## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

El análisis multimérico se basa en el uso de electroforesis en gel agarosa SDS (dodecil sulfato de sodio) para la separación de los multímeros del factor de von Willebrand (FvW) en función de su peso molecular, seguida de una visualización no radiactiva que utiliza un sistema de anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina. Según el método Enayat, se preparan tres concentraciones de geles separadores en agarosa con una concentración del 1% al 1,8% (por lo general, al 1,2%, 1,4% y 1,8%) a fin de identificar el rango completo de multímeros del FvW (al 1%), así como la estructura terciaria de cada multímero (al 1,8%).

Este método surge de los estudios de Enayat (1983) y Ruggeri (1981).

**Figura 33.1. Esquema de trabajo para el análisis multimérico del FvW**

DÍA/ HORA	Lunes/ martes	Martes/ miércoles	Miércoles/ jueves	Jueves/Viernes
8.00	Preparar los tampones, excepto el tampón de gel de corrida, el día anterior al ensayo.	Observar el tinte de marcado. Detener el proceso cuando el tinte llegue a la mecha. Tal vez haya que aumentar la tensión.		
9.00		Enjuagar los geles con H <sub>2</sub> O.	Enjuagar los geles con H <sub>2</sub> O. Enjuagar los geles <i>boca arriba</i> con TBS/Tween 8 veces a lo largo del día.	Enjuagar los geles con H <sub>2</sub> O. Enjuagar los geles <i>boca arriba</i> con TBS/Tween 8 veces hasta las 15.00.
10.00	Preparar el tampón del gel de corrida y añadir la agarosa.	Secar los geles con la ayuda de un secador de cabello con aire frío*.		

11.00	Armar las placas. Poner el tampón de gel de corrida en el horno microondas.			
11.30	Dejar que se enfríe hasta 65 °C a 60 °C antes de verterlo.			
12.00	Dejar que el gel se solidifique a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego a 4 °C durante una hora.			
14.00	Poner en marcha el enfriador. Diluir y ajustar el pH del tampón de electroforesis. Cortar las mechas. Descongelar las muestras del paciente y el pool amarillo; diluir según corresponda.			
15.00	Cortar los pocillos. Añadir el plasma del paciente. Correr a 30mA (230V) durante 30 minutos.	Colocar gel <i>boca arriba</i> en 150 ml de leche TBS al 5% en el agitador orbital.		Retirar el líquido del último lavado y volcar la solución de fosfatasa alcalina (FA) sobre los geles <i>boca arriba</i> .
16.00	Cuando las muestras migren de los pocillos, llenarlos con el tampón de gel de corrida y bajar la tensión a 5mA (110V).			Después de que aparezca el color (entre los 45 y 60 minutos), detener la reacción enjuagando varias veces con H <sub>2</sub> O. Secar el gel con secador de cabello con aire frío.
17.00		Enjuagar los geles con H <sub>2</sub> O. Colocar los geles <i>boca abajo</i> en 25 ml de <i>anticuerpo primario</i> durante toda la noche en una cuba de vidrio.	Enjuagar los geles en H <sub>2</sub> O. Colocar los geles <i>boca abajo</i> en 25 ml de <i>anticuerpo secundario</i> durante toda la noche en una cuba de vidrio.	

\*OPCIONAL: para acelerar el proceso de secado, prensar los geles entre 30 y 60 minutos y luego secar con aire caliente (p.ej., con un secador de cabello doméstico).

## REACTIVOS

Preparar tampones nuevos para cada ensayo. Preparar todos los reactivos con agua destilada y ajustar el pH.

- Tampón de gel de corrida: TRIS 0,4M, SDS 0,1% (pH 8,8)
  - 4,54 g de Tris base (SIGMA T1503)
  - 0,1 g de SDS (dodecil sulfato de sodio) (BDH 436696N)
  - 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada

Con movimientos circulares, en un matraz cónico de 100 ml mezclar:

- 100 ml de tampón de gel de corrida;
- 1,6 g de agarosa Seakem HGT (P) (de alta temperatura de gelificación) (Seakem 50050) para geles normales; **o**
- 1,8 g de agarosa para detección de estructuras terciarias; **o**
- 1,0 g de agarosa para los multímeros de alto peso molecular (APM).

Utilizar la agarosa al 1,6% para multímeros de alto peso molecular y al 1,8% para la detección de las estructuras terciarias.

*Importante: Una agarosa poco concentrada (al 1,2%) solo muestra multímeros de alto peso molecular mientras que una agarosa muy concentrada (al 1,8%) muestra tanto multímeros de bajo peso molecular (BPM) como de alto peso molecular.*

El volumen preparado será suficiente para 2 geles.

- Tampón del electrodo: ajustar pH a 8,35

*Concentrado 10x*

- 15,15 g de Tris base
- 72,1 g de glicina
- 5 g de SDS
- 500 ml de H<sub>2</sub>O destilada

*Solución de trabajo*

Añadir 200 ml del tampón concentrado 10x a 1800 ml de H<sub>2</sub>O destilada (ajustar pH a 8,35).

- Tampón de la muestra: Tris 10mM, EDTA 1mM (pH 8,0)

*Solución madre (stock) concentrada 10x*

- 1,21 g de Tris base/Trizma (SIGMA T1503)
- 0,07 g de sales disódicas del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (BDH 10093)

Completar hasta 100 ml con H<sub>2</sub>O destilada.

*Solución de trabajo*

En una proporción de 1:10, diluir el tampón de la muestra concentrado 10x en 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada para formar la solución de trabajo. Luego, añadir:

- 4,8 g de urea (BDH 102904W)
- 0,2 g de SDS (BDH 436696N) pH al 8,0.

- Tampón salino Tris (TBS) madre: Tris 50mM, NaCl 150mM (pH 7,4)
  - 12,1 g de Tris base
  - 18 g de NaCl
  - 2 l de H<sub>2</sub>O destilada
- Tampón bloqueante
  - 20 g de leche en polvo descremada al 5%
  - 133 ml de TBS madre
- Tampón de lavado
  - 500 µl de Tween 20
  - 1 l de TBS madre
- Anticuerpo primario  
Anticuerpo policlonal de conejo anti-FvW humano (anticuerpo de recubrimiento FvW:Ag; por ejemplo, Dako A0082)
- Anticuerpo secundario  
Anticuerpo de cerdo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (por ejemplo, Dako D0306)
- Kit de conjugación de fosfatasa alcalina (Biorad 170-6432)
- Soporte para gel Gelbond (Biowhittaker Molecular Applications 53750)

## MÉTODO

### *Día 1: Preparación del gel y electroforesis*

- 1 Colocar la agarosa y el tampón de gel de corrida en el horno microondas hasta que se clarifiquen y luego dejar que se solidifiquen. Volver a fundir cuando sea el momento de verterlo pero dejar que se enfríe hasta 65 °C antes de hacerlo (cubrir con un foil para evitar la evaporación).
- 2 Verter el gel dentro de un “sándwich” hecho con dos placas de vidrio (200 × 120 mm) y un espaciador con forma de U (de 15 mm de ancho) que se ubicará en la parte superior de la placa tal como se describe a continuación.
- 3 Cortar a medida un trozo del soporte de gel (Gelbond) empleando el espaciador como guía. Humedecer una de las placas de vidrio y disponer el soporte de gel sobre ella de manera que la cara que estará en contacto con el papel (cara hidrofílica) quede hacia arriba. Utilizar el rodillo para eliminar las burbujas que pueda haber. Colocar el espaciador en la parte superior, luego colocar la segunda placa de vidrio por encima y sostener con sujetadores tipo “bulldog” en el costado y en la parte inferior. Cerciorarse de que la estructura se encuentre a nivel antes de verter el gel.
- 4 Mientras se enfría la solución de gel de agarosa hasta los 60 °C a 65 °C, calentar el equipo de vertido de gel poniéndolo debajo del agua caliente o usando un secador de cabello.

- 5 Colocar la agarosa en una jeringa precalentada y, con la ayuda de un pequeño trozo del tubo de una aguja mariposa, pasar la agarosa en el equipo de vertido.
- 6 Reservar una pequeña cantidad de gel de agarosa en un tubo de ensayo para llenar los pocillos más adelante.
- 7 Dejar que el gel se solidifique a temperatura ambiente durante 30 minutos como mínimo, y luego a 4 °C en cámara húmeda durante una hora. Conservar en cámara húmeda si no se utilizará de inmediato, pero sellar los bordes abiertos con Parafilm para evitar que se reseque (el gel puede conservarse durante la noche, de ser necesario).
- 8 Configurar el tanque de electroforesis para que enfríe a 14 °C y preparar 2 l de tampón de electroforesis diluido al 10% (ajustar el pH después de la dilución). Colocar 1 l. de tampón a cada lado del tanque.
- 9 Cuando el gel se haya solidificado, utilizar la plantilla para cortar 11 pocillos en la parte superior. Humedecer la placa de electroforesis con agua destilada y ubicar el gel en el centro de la placa de enfriamiento blanca y azul del tanque de manera que los pocillos de las muestras queden en el extremo más alejado (cátodo).
- 10 Medir un trozo de papel de filtro (WHATMAN 3030690) de entre 10 y 15 cm de largo y doblarlo. Repetir el proceso dos veces. Asentar bien el pliegue del doblez y separar los trozos de papel a mano (por lo general, así se consigue una línea con menos imperfecciones que si se corta con tijera) de manera que queden entre tres y cinco capas en total para cada lado. Medir el ancho con el medidor de gel para cortar del ancho exacto. Humedecer el papel de filtro con el tampón de electroforesis. Luego, colocar cada mecha de papel de filtro sobre los extremos del gel, superponiéndolas unos 5 mm aproximadamente.
- 11 Diluir las muestras del paciente y el pool amarillo para control. Hacer una dilución 1/10 de un plasma con FvW:Ag de aproximadamente 1,0 UI/ml en el tampón de la muestra de trabajo, pero emplear una dilución 1/2 si se prevén resultados muy bajos. No se recomienda el uso de plasma no diluido (el FvW plaquetario comúnmente se diluye en una proporción de 1/2).
- 12 Lavar bien el equipo de vertido de gel en agua caliente después de su uso.
- 13 Añadir 20 µl de la muestra diluida. Luego, 1 µl de azul de bromofenol al 1% a cada pocillo. El pool amarillo (control normal) se correrá en las calles 1, 6 y 11.

14 Colocar la tapa del tanque de electroforesis y encender la fuente de electricidad, verificando que el cable rojo esté conectado con el conector rojo y el cable negro, con el conector negro. Usar a máxima corriente entre 30 y 60 minutos para que las muestras migren de los pocillos. Registrar las condiciones electroforéticas en la planilla del ensayo.

15 Apagar la corriente y llenar los pocillos con el gel de agarosa reservado.

16 Comenzar la electroforesis con una corriente constante de 5 mA (alrededor de 80 V) durante 20 horas aproximadamente. Si la tensión es demasiado elevada, será necesario ajustar la resistencia de las mechas (ley de Ohm). Para ello, añadir una mecha al extremo del cátodo hasta alcanzar un nivel de tensión aceptable.

### *Día 2: Preparación del gel para la visualización*

17 A la mañana siguiente, el marcador de azul de bromofenol habrá migrado hacia el extremo del ánodo del gel.

18 Cuando el marcador azul llegue aproximadamente a 1 cm del borde del gel, registrar los parámetros electroforéticos y detener la electroforesis. Retirar el gel del equipo de electroforesis.

19 Desechar cualquier el tampón que pueda haber quedado, lavar bien el tanque con agua y secar con cuidado los divisores naranja a lo largo del cable metálico.

20 Colocar el gel *boca arriba* en una cuba plástica con agua destilada y lavar suavemente durante una a dos horas en un agitador orbital o de balanceo. Cambiar el agua varias veces a lo largo del lavado.

21 Retirar con cuidado los geles y dejar escurrir el exceso de agua sobre un papel tisú.

22 Secar los geles en posición horizontal con un secador de cabello a temperatura media con el gel anclado en cada extremo, o bien prensarlos entre papel de filtro y toallas de papel durante una a dos horas sobre una placa niveladora de vidrio colocando varios libros pesados por encima y a continuación secar con el secador de cabello a temperatura media, como se indicó anteriormente. El secado puede llevar algo más de una hora por gel.

23 Cuando los geles estén totalmente secos (se verán brillosos y lisos sobre el soporte de gel), retirar el soporte sobrante, pero dejar por lo menos 5 mm en todo el contorno del gel.



24 Colocar el gel *boca arriba* en una cuba plástica que contenga TBS + leche descremada al 5% (Marvel) e incubar durante 90 minutos como mínimo (cuanto más tiempo, mejor) en el agitador de balanceo Stuart a velocidad lenta.

25 Enjuagar el gel varias veces con agua destilada.

26 Preparar una dilución del anticuerpo primario anti-FvW (recubrimiento) en TBS en una proporción de 1 en 2000. Colocar 12,5 µl de anticuerpo en 25 ml de TBS. Disponer el anticuerpo diluido en la placa de pyrex para el anticuerpo primario.

27 Secar el agua excedente del gel con papel absorbente y luego colocar el gel *boca abajo* en el anticuerpo diluido. Verificar que no queden burbujas entre el gel y el anticuerpo diluido.

28 Colocar la tapa de la cámara e incubar toda la noche sobre la mesa de trabajo a temperatura ambiente.

### *Día 3*

29 Retirar el gel de la solución del anticuerpo primario y enjuagar brevemente con sucesivos recambios de agua destilada.

30 Colocar el gel *boca arriba* en una cuba plástica. Lavar por lo menos con ocho recambios de TBS/Tween al 0,05% (100 ml a 150 ml/lavado) durante el día mientras se encuentra sobre el agitador orbital.

31 Preparar una dilución de anticuerpo secundario de cerdo anti-FvW conjugado en TBS en una proporción de 1 en 2000. Utilizar 12,5 µl del anticuerpo en 25 ml de TBS. Colocar el anticuerpo diluido en la placa de pyrex para el anticuerpo secundario.

32 Enjuagar el gel con agua destilada, secar el exceso de agua del gel con papel absorbente y colocarlo *con la cara del gel boca abajo* en la solución de anticuerpo secundario. Verificar que no queden burbujas entre el gel y el anticuerpo diluido.

33 Colocar la tapa de la cámara e incubar durante toda la noche en la mesa de trabajo a temperatura ambiente.

### *Día 4: Visualización de los multímeros*

34 Retirar el gel de la solución de anticuerpo secundario y enjuagar brevemente con los sucesivos recambios de agua destilada.

- 35 Colocar el gel *boca arriba* en una cuba plástica. Lavar por lo menos con ocho recambios de TBS/Tween al 0,05% (100 ml a 150 ml/lavado) durante el día mientras se encuentra sobre el agitador orbital.
- 36 En el último lavado (alrededor de las 15.00), preparar 20 ml del plasma sustrato de trabajo con el kit H102 del tampón de fosfatasa alcalina 25 × para visualización del color. Para cada gel, diluir 800 µl del tampón de fosfatasa alcalina 25 × en 20 ml de agua. Luego, añadir 200 µl de la solución A y 200 µl de la solución B al tampón y mezclar bien.
- 37 Retirar el gel del último lavado y dejar escurrir el excedente de líquido.
- 38 Colocar el gel *boca arriba* en la placa de revelado de pyrex y verter la mezcla de sustrato preparada sobre el gel.
- 39 Poner a balancear suavemente en el agitador de balanceo hasta que se complete la reacción y aparezcan las bandas de multímeros. Este proceso puede llevar hasta 45 minutos.
- 40 Cuando esté completa la reacción, desechar el sustrato y lavar el gel por lo menos con dos recambios de agua destilada mientras se agita entre 30 y 60 minutos para detener la siguiente reacción.
- 41 Secar el líquido excedente del gel con papel absorbente y luego con un secador de cabellos, como se ha indicado.
- 42 El gel puede ser examinado con medios electrónicos capaces de almacenar la información. De ser necesario, también se puede cuantificar el gel con una densitometría.

Los resultados obtenidos pueden informarse como se indica en la figura 33.2, que aparece a continuación, según el patrón de multímeros observado en el gel.

**Figura 33.2. Interpretación del patrón de multímeros**

Patrón de multímeros	Interpretación
Multímeros de todos los pesos moleculares	Patrón cualitativo normal
Formación excesiva de estructuras terciarias de bajo peso molecular	Disminución de multímeros de alto peso molecular
Importante depleción de multímeros de alto peso molecular	Leve aumento de multímeros de alto peso molecular
Aumento de la primera banda de bajo peso molecular	Leve descenso de multímeros de alto peso molecular
No se observan multímeros	No se detectaron multímeros

### Figura 33.3. Ejemplo de gel con multímeros

*Importante: Las formas de mayor peso molecular del FvW se encuentran en la parte superior de la columna.*



La columna 1 indica un paciente con EvW tipo 2B.

La columna 2 indica un paciente con EvW tipo 2A.

La columna 3 indica un plasma normal con todos los multímeros intactos.

### BIBLIOGRAFÍA

Enayat MS, Hill FG. Analysis of the complexity of the multimeric structure of FVIII related antigen/von Willebrand protein using a modified electrophoretic technique. *J Clin Pathol* 1983; 36:915-9.

Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Classification of variant VWD subtypes by analysis of functional characteristics and multimeric composition of FVIII/von Willebrand factor. *Ann N Y Acad Sci* 1981; 370:205-9.

# 34

## Medición cuantitativa de los inhibidores del factor VIII

### FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Las personas con hemofilia tratadas con una terapia de reemplazo del factor VIII pueden desarrollar inhibidores del factor VIII, que se caracterizan por ser de acción progresiva.

Si se agrega factor VIII a un plasma que contiene un inhibidor y se incuba la mezcla, el factor VIII se irá neutralizando en forma progresiva. Si la cantidad de factor VIII y el período de incubación se estandarizan, la fuerza del inhibidor se puede definir en unidades de acuerdo con la cantidad de factor VIII agregado que se ha neutralizado.

El ensayo se puede realizar usando factor VIII humano o porcino.

Se podría sospechar la presencia de un inhibidor si se ha producido una disminución de la vida media y la recuperación del factor VIII.

### ENSAYO DE BETHESDA

Para títulos de inhibidores humanos, el factor VIII proviene de un pool de plasma normal; para títulos de inhibidores porcinos, proviene de un concentrado porcino diluido en plasma deficiente en factor VIII.

Una unidad Bethesda se define como la cantidad de inhibidor que neutralizará el 50% de una unidad de factor VIII agregado en dos horas a 37 °C.

#### *Pacientes que se prevé no tienen inhibidor:*

1. Agregar partes iguales (0,2 ml) del plasma del paciente a un pool de plasma normal.
2. Para un control, agregar 0,2 ml de factor VIII:C 0% a 0,2 ml de pool de plasma normal.
3. Incubar a 37 °C durante dos horas. Luego realizar el ensayo de factor VIII:C.

#### *Pacientes que se prevé tienen inhibidor:*

1. Preparar diluciones usando tampón de ensayo de factor VIII del plasma del paciente. Es preferible preparar diluciones de más que demasiado pocas. Siempre se pueden mantener en hielo, luego de incubarlas dos horas, para una segunda ronda de ensayos. Si existe información previa relacionada con el título del inhibidor previsto, las diluciones para pruebas se deben extender a cada lado de esta información.
2. Se agrega una cantidad estandarizada de factor VIII en forma de pool de plasma normal a cada dilución de plasma de prueba - que contendrá

normalmente alrededor de 100 U/dl. Así, cada mezcla para incubación tiene una concentración inicial de aproximadamente 50 U/dl. No es importante una concentración precisa, porque se agrega el mismo pool de plasma normal a todas las mezclas para incubación.

3. En el ensayo de factor VIII que se practica después de transcurridas las dos horas de incubación, la mezcla de control de plasma normal y plasma deficiente en factor VIII se utiliza como referencia estándar, y la concentración de factor VIII de las demás mezclas se calcula comparándola con aquella. Este material se utiliza 100% como referencia en el ensayo.

Es importante tamponar el plasma normal, ya sea agregando imidazole 0,1M con un pH de 7,4 en la modificación de Nijmegen recientemente descrita, o usando el pool de plasma normal tamponado descrito en el capítulo 7. Esto mejora la sensibilidad y especificidad del ensayo. Para títulos de inhibidores porcinos, no es fácil obtener plasma porcino. Por lo tanto, se acepta usar concentrado porcino diluido hasta alcanzar 1 U/ml en plasma deficiente en factor VIII.

4. Al final del período de incubación, se mide el nivel residual de factor VIII y se calcula el inhibidor a partir de un gráfico de factor VIII residual vs. las unidades de inhibidor. (Ver figura 34.1, más adelante.)

## REACTIVOS/EQUIPAMIENTO

- Tampón de glioxalina (ver capítulo 9)
- Tampón salino de Owren (ver capítulo 9)
- Pool de plasma normal (ver capítulo 7)  
*Observación: Se debe tamponar para mejorar la estabilidad del factor VIII durante las dos horas de incubación del ensayo.*
- Concentrado porcino
- Plasma deficiente en factor VIII
- Reactivo de TTPA
- Baño de hielo
- Tubos de plástico (75 × 12 mm)

## MÉTODO

### *Inhibidores de factor VIII humanos*

---

- 1 Preparar diluciones 1:2 de plasma de prueba en tubos de plástico en volúmenes de 0,2 ml, usando tampón de glioxalina como diluyente. Las diluciones requeridas para cada paciente podrán variar. Un punto de partida sugerido sería: sin diluir, 1/2, 1/4, etc.

*Importante: Si previamente se le ha realizado al paciente un ensayo para detectar inhibidores, el nivel resultante puede dar una idea aproximada sobre qué diluciones se deben usar. También es útil saber si recientemente ha recibido*

*algún tratamiento con factor VIII, ya que esto puede haber aumentado o disminuido el nivel del inhibidor.*

- 2 Pipetear 0,2 ml de plasma deficiente en factor VIII en otro tubo de plástico. Este servirá como tubo estándar.
- 3 Agregar 0,2 ml de pool de plasma normal tanto al tubo estándar como a las diluciones de plasma de prueba. El nivel de factor VIII de todos los tubos será de aproximadamente 50 U/ml, lo que se considera el 100% en el ensayo de factor VIII al final de la incubación.
- 4 Tapar, mezclar e incubar todos los tubos a 37 °C durante dos horas.
- 5 A las dos horas, si el ensayo de factor VIII no se realiza de inmediato, transferir todos los tubos a un baño de hielo.
- 6 Realizar un ensayo de factor VIII en todas las mezclas de incubación siguiendo el método corriente de ensayo de factor VIII, pero usando el tubo fijado como estándar como 100%. Las diluciones adecuadas para el ensayo de factor VIII serían 1/5, 1/10, 1/20.
- 7 Leer el valor del factor VIII residual de cada mezcla de prueba, usando el control como 100%.

### RESULTADOS/INTERPRETACIÓN

Para calcular el inhibidor se elige la dilución de plasma de prueba que da un factor VIII residual lo más cercano al 50% pero dentro del rango de 30% a 60%. Como alternativa, calcular el resultado que se obtiene de cada dilución y tomar el promedio. Para calcular el nivel del inhibidor **no** se debe utilizar ningún factor VIII residual de <25% o >75%.

A partir de la definición de unidad de inhibidor se puede graficar en un hoja para escalas logarítmicas dobles el % de factor VIII residual versus las unidades de inhibidores (ver figura 34.1).

Leer el valor del nivel del inhibidor correspondiente al factor VIII residual para cada mezcla de prueba y corregir la dilución. Por ejemplo:

1/4 dilución + pool normal

Factor VIII residual = 50%

Unidad de inhibidor (del gráfico) = 1 UB

Multiplicar por el factor de dilución (1/4) = 4 UB

### OBSERVACIONES

- Los ensayos cuantitativos de inhibidores se realizan generalmente con plasmas de prueba de pacientes con hemofilia severa, por lo tanto contienen poco o ningún factor VIII:C medible. Si el plasma de prueba contiene más de 5 U/dl de factor VIII, esto se debe tener en cuenta durante el cálculo del título del inhibidor.



Esto se puede realizar de tres formas:

- La primera es agregar más factor a la mezcla de control que a la mezcla de prueba para compensar el factor VIII en la mezcla de prueba. Por ejemplo, si el plasma de prueba contiene 20 U/dl de factor VIII, la mezcla de control se realiza a partir de 120 µl de plasma normal y 80 µl de factor VIII 0%. (En ese caso, tanto la mezcla de prueba como la mezcla de control contienen aproximadamente 60 U/dl de factor VIII al inicio de la fase de incubación.) Este enfoque solo se puede utilizar si la prueba se realiza con el plasma del paciente sin diluir, y no después de la dilución, lo que alteraría las concentraciones iniciales de factor VIII.
- O bien, durante el cálculo se puede tomar en cuenta el nivel inicial de factor VIII en el plasma de prueba. En este caso, las mezclas de ensayo se elaboran en la forma normal.
- Otra opción es calentar el plasma de prueba a 58 °C durante 90 minutos antes del análisis, lo que destruirá todos los factores de coagulación, incluido el factor VIII. Como las inmunoglobulinas son resistentes al calor, el título del inhibidor no se verá afectado por este tratamiento.
- El plasma deficiente en factor VIII usado para elaborar la mezcla de control es importante. Debe contener niveles normales de FvW, ya que se ha demostrado que los títulos de inhibidores son de un 30% a 50% más bajos si el plasma deficiente en factor VIII no contiene FvW (Verbruggen et al. 2001).

*Ejemplo 1: Paciente con 20 U/dl de factor VIII*

Controlar un pool de plasma normal + factor VIII 0%

- a. Pool de plasma normal + plasma de prueba sin diluir – factor VIII inicial = 120%
- b. Pool de plasma normal + plasma de prueba diluido 1 en 2 – factor VIII inicial = 110%

Después de dos horas de incubación, se realizan los ensayos de factor.

- a. Pool de plasma normal + plasma de prueba sin diluir – factor VIII = 120% de control  
Factor VIII residual:  $120/120 = 100\%$ ; resultado del inhibidor: negativo
- b. Pool de plasma normal + plasma de prueba diluido 1 en 2 – factor VIII = 110% de control  
Factor VIII residual:  $110/110 = 100\%$ ; resultado del inhibidor: negativo

*Ejemplo 2: Paciente con 20 U/dl de factor VIII (y con presencia de inhibidor)*

Plasma del paciente probado sin diluir

Pool de plasma normal + plasma de prueba sin diluir – factor VIII inicial = 120% de control

Después de dos horas de incubación, se realizan los ensayos de factor VIII.

Pool de plasma normal + plasma de prueba sin diluir – factor VIII = 90% de control  
Factor VIII residual =  $90/120 = 75\%$

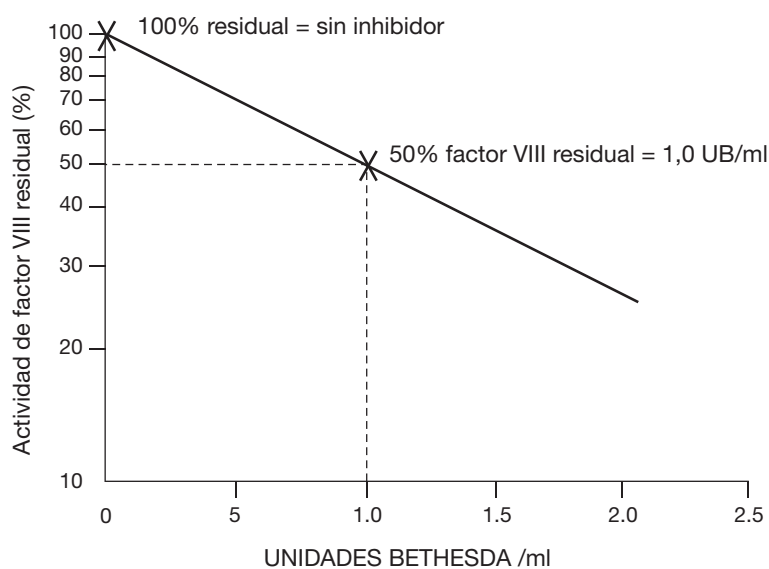


### **Inhibidores de factor VIII porcinos**

El método para detectar los inhibidores de factor VIII porcinos es esencialmente el mismo que para los inhibidores humanos, salvo en lo que respecta a la fuente de factor VIII, que debe ser de origen porcino. Sin embargo, a la fecha no existe una fuente confiable de factor VIII de plasma porcino que sea fácilmente accesible. Por lo tanto, se utiliza el concentrado porcino diluido en plasma hemofílico (humano) hasta una concentración de 1 U/ml.

*Importante: Si el factor VIII residual se encuentra entre el 80% y el 100% para una muestra que fue incubada sin diluir con el concentrado porcino, se interpreta que no hay inhibidores presentes. Si bien actualmente no se utiliza factor VIII porcino derivado de plasma, a la fecha de redacción se está desarrollando un concentrado de factor VIII porcino recombinante.*

**Figura 34.1. Relación entre el factor VIII residual y el título del inhibidor**



### **BIBLIOGRAFÍA**

- Kasper C, Aledort L, Counts R, Edron J, Fratantoni J, Green D, Hampton J, Hilgartner M, Laserson J, Levine P, MacMillan C, Pool J, Shapiro S, Shulman N, Eys J. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *Thromb Diath Haemorrh* 1975; 34:869-872.
- Verbruggen B, Giles A, Samis J, Verbeek K, Meninsk E, Novakova I. The type of FVIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assays for factor VIII inhibitors. *Thromb Haemost* 2001; 86:1435-1439.
- Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda Assay for factor VIII:C inhibitors: Improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995; 73:247-251. (for the Nijmegen modification)

## FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

Los inhibidores del factor IX muestran diferentes cinéticas respecto de los inhibidores del factor VIII:C, en el sentido de que la reacción antígeno/ anticuerpo se completa más rápido. El ensayo se basa en la incubación del plasma del paciente con partes iguales de una fuente de factor IX durante 10 minutos a 37 °C, seguida de un ensayo de factor IX.

Una unidad de inhibidor se define como aquella que destruye un 50% de la actividad del factor IX en 10 minutos a 37 °C.

## REACTIVOS

- Los mismos que para el ensayo del factor IX (ver capítulo 23).
- Un pool de plasma normal como fuente de factor IX (el mismo pool de plasma que para detectar inhibidores del factor VIII).

## MÉTODO

Si se sospecha la presencia de un inhibidor, usar diluciones adecuadas de plasma del paciente. De lo contrario, se debe usar plasma sin diluir y realizar una prueba de rastreo de inhibidores.

### 1 Tubos de plástico de 75 × 12 mm:

- Prueba: agregar 0,2 ml de plasma del paciente (o dilución) a 0,2 ml de pool de plasma normal.
- Control: agregar 0,2 ml de factor IX 0% hasta alcanzar 0,2 ml de pool de plasma normal.

### 2 Control: Luego de 10 minutos, realizar un ensayo de factor IX usando una mezcla de control como referencia (como en el ensayo para detectar inhibidores del factor VIII).

## CÁLCULO

Elaborar el resultado como un porcentaje residual de control. Las unidades de inhibidores se elaboran de la misma manera que el inhibidor del factor VIII:C en la técnica de Bethesda descrita en el capítulo 34.

# 36

## Ensayo de la actividad del factor XIII

### FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La superficie de una placa de microtitulación está recubierta con fibrinógeno. Con el uso de un agente bloqueante especial se impide el enlace no específico. El FXIII de la muestra se activa gracias a la trombina y los iones de calcio. En la fase de incorporación, el FXIIIa del plasma de prueba incorpora el sustrato 5-aminopentil biotina amido (*5-biotinamidopentylamin* o BAPA) al sustrato FXIII fibrinógeno que recubre la placa en presencia de calcio. La cantidad de sustrato BAPA incorporado es proporcional a la actividad del factor XIII de la muestra de prueba. En el paso siguiente, el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina (Strept-AP) se enlaza con el BAPA incorporado. La fosfatasa alcalina convierte el sustrato sintético p-nitrofenil fosfato (pNFF) en fosfato y p-nitrofenol, que puede medirse a 405 nm.

Los reactivos para el método que se describe a continuación se presentan en un kit comercial (ensayo de incorporación de FXIII Pefakit, *Pefakit FXIII incorporation assay*, Pentapharm, Suiza). Cabe destacar que existen ensayos de actividad de otros fabricantes, como el kit Berichrom (Dade Behring, Marburg, Alemania), que utilizan distintos principios de análisis.

### REACTIVOS

Todos los reactivos necesarios están incluidos en el kit comercial.

### MÉTODO

#### *Día 1*

- 1 Dejar que los componentes del kit tomen temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 2 Reconstituir el reactivo de recubrimiento (R2) en agua destilada, según el volumen recomendado por el fabricante.
- 3 Añadir 100 µl de reactivo de recubrimiento en cada pocillo vacío de las tiras de la placa de microtitulación.
- 4 Conservar el reactivo de recubrimiento sobrante en el freezer para su uso posterior (permanece estable durante seis meses a -20 °C).
- 5 Sellar las tiras con el sello plástico suministrado e incubar durante toda la noche (entre 14 y 16 horas) a una temperatura entre 20 °C y 25 °C.

## Día 2

- 6 Diluir 50 ml del tampón salino de tris (TBS) R1 concentrado  $20 \times$  en 950 ml de agua destilada, o un volumen menor, de ser necesario.
- 7 Diluir 3 ml del reactivo bloqueante R3 con 27 ml de TBS R1 diluido. Conservar el R3 sobrante en el freezer.
- 8 Retirar el reactivo de recubrimiento de la placa de microtitulación, invertir la tira y golpetear sobre un papel tisú para desechar los residuos.
- 9 Añadir 300  $\mu$ l del reactivo bloqueante diluido en cada pocillo.
- 10 Incubar entre 1 y 1,5 hora a 37 °C en incubadora.
- 11 Reconstituir el calibrador R10 en 0,5 ml de agua destilada y los tres controles (R11, R12 y R13) en 0,2 ml de agua destilada.
- 12 Si el plasma de prueba estuviera en el freezer, descongelar a 37 °C durante cinco minutos antes de utilizarlo.
- 13 Preparar un recipiente con un poco de agua y hielo a modo de baño de hielo.
- 14 Hacer diluciones de todos los plasmas de prueba y de control diluyendo 10  $\mu$ l de plasma en 1 ml de tampón TBS R1 diluido (dilución 1:101). Colocar en el agitador vorticial.
- 15 Preparar las diluciones de calibración de la siguiente manera:
  - Cal 1: 30  $\mu$ l R10 + 970  $\mu$ l TBS R1
  - Cal 2: 20  $\mu$ l R10 + 980  $\mu$ l TBS R1
  - Cal 3: 75  $\mu$ l R10 + 25  $\mu$ l TBS R1
  - Cal 4: 25  $\mu$ l R10 + 75  $\mu$ l TBS R1
  - Cal 5: 10  $\mu$ l R10 + 90  $\mu$ l TBS R1

*Importante: Las diluciones 1 y 2 están listas para usar. Para las diluciones de calibración 3 a 5 volver a diluir 10  $\mu$ l en 1 ml de TBS R1.*

- 16 Lavar la placa **tres** veces con 300  $\mu$ l/pocillo de TBS R1. Invertir y sacudir sobre un papel tisú para retirar el excedente de líquido.
- 17 Reconstituir las partes A (R4) y B (R5) del reactivo de activación en 5 ml de agua destilada para cada uno. Colocar en el baño de hielo con agua durante 30 minutos como máximo.
- 18 Añadir 25  $\mu$ l del plasma calibrador, de control o de prueba en los pocillos que correspondan. Incluir una muestra testigo de TBS R1.
- 19 Mezclar las partes A y B de los reactivos de activación (R4 y R5) para formar el reactivo de incorporación final.

- 20 Añadir 75 µl del reactivo de incorporación final en cada pocillo, incluso en el pocillo del testigo.
- 21 Incubar durante 30 minutos a 37 °C en incubadora.
- 22 Añadir 200 µl/pocillo de la solución quelante de incorporación R6. Mezclar **suavemente** durante 10 minutos en el agitador de placas.
- 23 Reconstituir el reactivo de detección R7 añadiendo 12 ml de agua destilada. Conservar el R7 diluido que no se utilizará en congelador.
- 24 Lavar la placa **cuatro** veces con TBS usando 300 µl/pocillo. Sacudir para retirar el excedente de líquido.
- 25 Añadir 100 µl del reactivo de detección R7 en cada pocillo. Incubar durante 15 minutos a 37 °C en incubadora.
- 26 Lavar la placa **cuatro** veces con TBS usando 300 µl/pocillo. Sacudir para retirar el excedente de líquido.
- 27 Preparar la siguiente solución sustrato **inmediatamente** antes de utilizarla:
- para 96 pocillos (placa completa), añadir 9 tabletas de R8b a 22,5 ml del tampón de dietanolamina R8a;
  - para 64 pocillos (8 tiras), añadir 6 tabletas a 15 ml de dietanolamina;
  - para 32 pocillos (4 tiras), añadir 3 tabletas a 7,5 ml de dietanolamina;
  - para 24 pocillos (3 tiras), añadir 2 tabletas a 5 ml de dietanolamina.
- 28 Añadir 180 µl/pocillo de la solución sustrato. Incubar durante 11 minutos a 37 °C en incubadora.
- 29 Añadir 50 µl/pocillo de la solución quelante (NaOH 4M) R9.
- 30 Hacer una lectura de las densidades ópticas (DO) dentro de los 15 minutos a 405 nm con el lector de la placa de microtitulación.

*Importante: Los reactivos de varios kits pueden conservarse en ultracongelación para su uso posterior, tal como se ha indicado. Sin embargo, el sustrato, las partes A y B del reactivo de activación, los calibradores y los controles no deben congelarse. Se pueden adquirir kits de reactivos parciales que incluyan dichos materiales para utilizarlos con los reactivos que se usaron parcialmente y conservan en el freezer. Esto reduce el costo por prueba si las muestras de prueba se analizan en lotes pequeños.*

## CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Cada kit incluye los valores de las diluciones de calibración y de control.

Con un programa de manejo de datos o en una hoja milimetrada, elaborar una curva de calibración graficando la concentración contra la densidad óptica de las diluciones del calibrador después de restar la DO del testigo. Usar una escala lineal doble. Restar la DO de la muestra testigo a las DO de las diluciones de las muestras de prueba y de control, y traducir las DO a la actividad del factor XIII usando la curva de calibración.

## INTRODUCCIÓN

Para los laboratorios que investigan pacientes con posibles trastornos de la coagulación, es importante identificar la presencia de anticuerpos que prolongan las pruebas de laboratorio, como la del TTPA.

Un grupo de anticuerpos que puede provocar un importante alargamiento del TTPA es el grupo heterogéneo denominado, en forma colectiva, *anticuerpos antifosfolípidos* (AAF), y que en las publicaciones aparece a veces como *anticoagulantes lúpicos* (AL). Es bien sabido actualmente que los anticuerpos antifosfolípidos son una familia heterogénea de anticuerpos que reaccionan con epítomos de proteínas que se han complejizado con fosfolípidos negativos. Muchos de estos anticuerpos requieren beta-2-glicoproteína 1, una proteína que se une a los fosfolípidos. Otros pueden dirigirse contra la protrombina.

Es importante observar que estos anticuerpos pueden interferir con las reacciones de coagulación en el laboratorio, alargando las pruebas fosfolípido-dependientes, como el TTPA y, ocasionalmente, el TP. Sin embargo, no están asociados con sangrado salvo en unos pocos casos excepcionales donde existe una significativa deficiencia de protrombina adquirida. Paradójicamente, estos anticuerpos están claramente asociados con trombosis venosas y arteriales a través de mecanismos que no se entienden claramente.

Los centros que diagnostican trastornos de sangrado deben saber detectar tales anticuerpos usando pruebas específicas para la investigación de pacientes con TTPA alargados. Se ha analizado, con diferentes técnicas, el modo de detectar anticoagulantes lúpicos en laboratorio. Los resultados se han informado en varias publicaciones, algunas de las cuales se mencionan en la bibliografía al final de este capítulo.

Es importante reconocer que ciertas técnicas de TTPA pueden carecer de sensibilidad para detectar la presencia de anticoagulantes lúpicos. Debido a la naturaleza heterogénea del grupo se recomienda realizar más de una prueba que lo confirme.

Los criterios para detectar la presencia de anticoagulantes lúpicos son los siguientes:

1. Alargamiento de una prueba de coagulación fosfolípido-dependiente.
2. Evidencia de que existe un inhibidor, según lo demuestran las pruebas de mezcla de plasma.



3. Confirmación de que el inhibidor es fosfolípido-dependiente.
4. Falta de inhibición específica de uno de los factores de coagulación (como los factores VIII:C, IX:C o XI).

### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Es importante asegurarse de que solo quede una cantidad mínima de plaquetas residuales en el plasma de prueba, en especial si el plasma es congelado y descongelado antes del análisis. Una forma de retirar la máxima cantidad de plaquetas es filtrar el plasma centrifugado (preparado igual que para otras pruebas de coagulación) usando un filtro de 0,22  $\mu$ . O bien, se puede centrifugar el plasma dos veces, como se describe en el capítulo 4. El propósito es que el recuento plaquetario en el plasma bajo análisis se reduzca a  $<10 \times 10^9/l$ . Como el proceso de filtración puede afectar otros ensayos de coagulación y puede ser caro, la opción preferida es separar el plasma pobre en plaquetas de las células luego de la primera centrifugación (a 1700 g como mínimo, durante al menos 10 minutos) y luego centrifugar el plasma del recipiente accesorio una segunda vez en las mismas condiciones. Luego de la segunda centrifugación, el plasma se retira cuidadosamente, dejando la capa del fondo sin tocar, ya que allí se encuentra la mayor parte de las pocas plaquetas que no se retiraron en la primera centrifugación. En el caso del plasma preparado mediante el proceso de doble centrifugación, normalmente los recuentos de plaquetas residuales serán muy por debajo de  $10 \times 10^9/l$ . Este plasma se puede someter a ultracongelación antes de ser usado para una prueba de anticoagulantes lúpicos. Estos comentarios se aplican a la preparación de plasmas de control y plasmas de prueba.

### PRUEBAS DE MEZCLA DE PLASMA

El capítulo 14 trata sobre las pruebas de mezcla de plasma usadas para indicar la posible presencia de un inhibidor.

### PRUEBAS ESPECÍFICAS PARA DETECTAR ANTICOAGULANTES LÚPICOS Y ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS

Existen cada vez más pruebas específicas para detectar la presencia de AL, incluidas las pruebas de tiempo de veneno de víbora Russell diluido (TVVRd) y de tiempo de coagulación con caolín (TCC), también denominada *prueba de Exner*. Se han usado otras pruebas específicas de veneno de víboras, como la de tiempo de Textarina o tiempo de veneno de la serpiente de Taipán, además de la de tiempo de tromboplastina diluido. Hay información de estas pruebas en la bibliografía que aparece más adelante.

Aun cuando se emplean pruebas relativamente específicas, como la de TVVRd y otras, es importante confirmar la naturaleza fosfolípido-dependiente del inhibidor usando pruebas confirmatorias.



A continuación se proporciona un método para la prueba de TVVRd, donde los resultados anormales son más específicos que el TTPA debido a la presencia de anticuerpos antifosfolípidos.

Según se recomienda en la última actualización de las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH, por su sigla en inglés) (Pengo et al. 2009), las dos pruebas fosfolípido-dependientes que se deben utilizar son la de TVVRd y TTPA, y en caso de que surja alguna anormalidad, la prueba se debe repetir añadiendo exceso de fosfolípidos. Se señala que usar plaquetas lavadas como fuente de exceso de fosfolípidos puede ser problemático debido a la falta de estandarización y a la posibilidad de que exista una variación de un lote a otro entre preparados. Incluimos más adelante un método para preparar plaquetas lavadas que puede ser útil para los centros que vayan a utilizar este enfoque. Dicha publicación de la ISTH no recomienda usar el tiempo de coagulación con caolín ni el tiempo de tromboplastina diluida, ni ciertos ensayos de veneno de serpiente cuyas características no están tan bien definidas.

## BIBLIOGRAFÍA

Brandt JT, Triplett DA, Alung B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Anti-phospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 74:1184-1190.

Lupus Anticoagulant Working Party. Guidelines on testing for the lupus anticoagulant. *J Clin Pathol* 1991; 44:885-889.

Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, De Groot PG. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *Thromb Haemost* 2009; 7:1737-40.

# 38

## Tiempo de veneno de víbora Russell diluido (TVVRd)

### FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

El veneno de víbora Russell (VVR) contiene una enzima que activa directamente el factor X, que luego activa la protrombina en presencia de fosfolípido, iones de calcio y factor V. La dilución del veneno y el fosfolípido hace que la prueba se vuelva especialmente sensible a la presencia de anticoagulantes lúpicos y anticuerpos antifosfolípidos. En ese caso, un alargamiento del TVVRd puede ser provocado por inhibidores de fosfolípidos, o bien por deficiencia o anormalidad de los factores II, V, X, o de fibrinógeno. Si el TVVRd se alarga en comparación con un rango normal establecido en el laboratorio, la prueba se debe repetir reemplazando los fosfolípidos con plaquetas lavadas y fragmentadas por un proceso de congelamiento y descongelamiento. Si al reemplazar los fosfolípidos con plaquetas se corrige el resultado anormal, esto indica la presencia de anticuerpos antifosfolípidos.

### REACTIVOS

- Imidazole (tampón de glioxalina) - 0,05M con un pH de 7,3
  - Imidazole 3,4 g
  - Cloruro sódico 5,85 g
  1. Disolver en 800 ml de agua destilada.
  2. Ajustar el pH a 7,3 usando HCL 1M.
  3. Preparar hasta 1 litro con agua destilada.
- Veneno de víbora Russell (Diagnostic Reagents, Chinnor Road, Thame, Reino Unido)
  1. Agregar 2 ml de agua destilada a 0,2 mg de veneno para obtener 0,1 mg/ml.
  2. Congelar a  $-35^{\circ}\text{C}$  o temperatura inferior en cantidades de 20  $\mu\text{l}$ .
  3. Para utilizar, descongelar y diluir aproximadamente 1 en 500 en tampón de imidazole (10  $\mu\text{l}$  en 5 ml) para obtener veneno de víbora Russell diluido (VVRd).
- Fosfolípido (FL; Sustituto plaquetario elaborado según Bell y Alton, Diagnostic Reagents, Chinnor Road, Thame, Reino Unido)  
Reconstituir con agua destilada de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- Solución de cloruro cálcico 25mM
- Plaquetas lavadas y fragmentadas por congelamiento y descongelamiento  
Las plaquetas normales de seres humanos son lavadas y fragmentadas por un proceso de congelamiento y descongelamiento para luego

exponerlas ante un fosfolípido procoagulante. Al final de este capítulo se informa el método completo (ver *Preparación de plaquetas lavadas para la prueba de TVVRd* en la página 123).

- Un pool de plasma normal  
Se debe preparar con cuidado para asegurarse de que solo quede una cantidad mínima de plaquetas residuales en el plasma, tal como se describe más arriba en la sección sobre preparado de la muestra. Puede ser conveniente usar el pool de plasma normal descrito en el capítulo 7, siempre que se lo centrifugue **dos veces** antes de someterlo a ultracongelación.

## MÉTODO

- 1 En un tubo de ensayo de vidrio a 37 °C, agregar 0,1 ml de fosfolípido y 0,1 ml de pool de plasma normal.
- 2 Calentar a 37 °C durante 1 a 2 minutos.
- 3 Agregar 0,1 ml de VVR diluido (VVR a temperatura ambiente). Mezclar y dejar durante exactamente 30 segundos a 37 °C.
- 4 Agregar 0,1 ml de cloruro cálcico 25mM previamente entibiado. Mezclar y poner en marcha el cronómetro.
- 5 Tomar el tiempo de formación del coágulo. Realizar todas las pruebas por duplicado.

El pool de plasma normal debe dar un tiempo de coagulación de 30 a 35 segundos. Si es <30 segundos, proceder a diluir la solución de VVR agregando más tampón de imidazole. Si es >35 segundos, agregar más solución madre (*stock*) de VVR. Repetir la prueba en un pool de plasma normal hasta obtener un tiempo de 30 a 35 segundos.

- 6 Preparar una dilución de 1/8 de fosfolípido (FL) en solución salina; por ejemplo, agregando 0,1 ml de FL a 0,7 ml de solución salina.
- 7 Repetir los pasos 1 a 5 usando sustituto plaquetario 1/8 para reemplazar el FL sin diluir.

Si el tiempo de coagulación (anteriormente de 30 a 35 segundos) ahora se alarga de 35 a 40 segundos, esto indica que la concentración de FL está suficientemente diluida para hacer que la prueba sea sensible a los anticuerpos de ese fosfolípido.

Si el tiempo de coagulación excede los 40 segundos, repetir los pasos 1 a 5 usando FL diluido 1 en 4. Si el tiempo de coagulación continúa siendo de 30 a 35 segundos, repetir los pasos 1 a 5 usando FL diluido 1 en 16. Si el tiempo es de 35 a 40 segundos, proceder al paso siguiente.

- 8 Usando esta solución de VVR (que da un tiempo de coagulación de 30 a 35 segundos con FL sin diluir y un pool de plasma normal) y la dilución de fosfolípido asociada con un tiempo de 35 a 40 segundos, repetir los pasos 1 a 5, sustituyendo el pool de plasma normal con plasma del paciente.
- 9 Calcular la relación de tiempo de VVRd (TVVRd) para el plasma del paciente respecto del TVVRd para un pool de plasma normal hasta obtener la relación de TVVRd.
- 10 Ahora se repiten los pasos 1 a 5 usando un pool de plasma normal y se repiten otra vez usando plasma de prueba, salvo cuando en lugar de fosfolípido se usen plaquetas lavadas y fragmentadas por un proceso de congelamiento y descongelamiento. Este es el procedimiento de neutralización plaquetaria (PNP). En el paso 2, la mezcla se incuba durante 10 minutos. Para el PNP se calcula la relación del plasma de prueba respecto del pool de plasma normal.

### INTERPRETACIÓN

El rango normal para la relación de TVVRd se debe establecer en el laboratorio usando plasma de personas normales, como se describe en el capítulo 8. El rango normal (la media  $\pm$  2 DE) de la relación de TVVRd con FL es normalmente de 0,90 a 1,10. Una relación de TVVRd alargado indica deficiencia de los factores II, V, X o de fibrinógeno, o bien indica la posible presencia de anticuerpos antifosfolípidos.

Una relación de TVVRd que se alarga con fosfolípido pero que disminuye o se corrige en la relación del procedimiento de neutralización plaquetaria (PNP) sugiere la presencia de anticuerpos antifosfolípidos.

Observar que la deficiencia de los factores de coagulación antes mencionada estaría asociada con relaciones alargadas en el caso del TVVRd con fosfolípido y en el PNP.

La presencia de heparina en la muestra puede llevar a resultados similares a los de casos donde hay presencia de anticuerpos antifosfolípidos.

### CORRECCIONES DEL TVVRD EN EL PROCEDIMIENTO DE NEUTRALIZACIÓN PLAQUETARIA (PNP)

Una corrección o disminución de la relación del TVVRd alargado que le permita situarse en el rango normal demuestra firmemente la presencia de anticoagulantes lúpicos.

Con frecuencia, la relación del PNP no se corrige hasta situarse dentro del rango normal. No se conoce exactamente el grado de corrección necesaria para indicar la posible presencia de anticoagulantes lúpicos. Un enfoque es calcular la corrección del porcentaje de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Relación TVVRd con FL} - \text{Relación PNP}}{\text{Relación TVVRd con FL}} \times 100$$

Un resultado por sobre el rango normal que corrige el PNP en >10% está indicando la presencia de anticoagulantes lúpicos.

## 38.1 Preparación de plaquetas lavadas para la prueba de TVVRd

### REACTIVO

Tampón de Tyrode pH 6,5

- NaCl 8,0 g
- KCl 0,2 g
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,065 g
- MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,415 g
- NaHCO<sub>3</sub> 1,0 g

Disolver en 900 ml de agua destilada y ajustar el pH hasta 6,5. Preparar hasta un 1 litro con agua destilada.

### MÉTODO

- 1 Preparar plasma rico en plaquetas (PRP) a partir de sangre fresca citratada mediante centrifugación a 170 g (1200 rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

O

Usar concentrados plaquetarios como los que se utilizan en el tratamiento de pacientes.

- 2 Diluir PRP 1 en 2 con tampón de Tyrode.
- 3 Colocar las plaquetas diluidas en tubos de centrifugadora plásticos de fondo cónico y centrifugar durante 10 minutos a 850 g a temperatura ambiente.
- 4 Eliminar el sobrenadante usando una pipeta Pasteur de plástico y resuspender el pellet de plaquetas en tampón de Tyrode. (Agregar la misma cantidad de tampón que el volumen original del PRP.) Centrifugar a 850 g, como se hizo antes. Este proceso se repite dos veces.
- 5 Eliminar el sobrenadante y resuspender en tampón de Tyrode, usando la misma cantidad de tampón que el 25% del volumen original de PRP.
- 6 Fraccionar las plaquetas lavadas finales en alícuotas de 1,0 ml, colocar en tubos de plástico y congelar y descongelar dos veces a -20 °C antes de usar.

Las plaquetas contribuyen a la hemostasia en dos aspectos fundamentales:

- Se adhieren a las microfibrillas subendoteliales y a las fibras de colágeno que están en las paredes de los vasos sanguíneos, después de lo cual cambian de forma, experimentan una determinada reacción de liberación y luego se agregan entre sí para formar un tapón hemostático primario.
- Como resultado de estas acciones, en especial durante la liberación y la agregación, se generan actividades procoagulantes, que comprometen principalmente a los fosfolípidos de la membrana plaquetaria de modo tal que la coagulación sanguínea se inicia en las zonas donde se ha producido el agregado plaquetario.

Las alteraciones cuantitativas o cualitativas de las plaquetas pueden producir una considerable tendencia al sangrado, principalmente porque no se puede formar el tapón plaquetario y también, en menor grado, porque la coagulación sanguínea no se activa en forma óptima.

La trombocitopenia, que es una anomalía de la función plaquetaria, se puede presentar clínicamente con una variedad de síntomas que son fuertes indicadores de insuficiencia hemostática primaria (por ejemplo, hematomas o equimosis, epistaxis, sangrado gastrointestinal o menorragia). Las alteraciones plaquetarias generalmente ocasionan trastornos de coagulación leves. Los pacientes pueden presentar un sangrado excesivo solo después de una cirugía o extracción dental.

Entre las alteraciones plaquetarias mencionamos: enfermedad del pool de almacenamiento, la trombostenia de Glanzmann y el síndrome de Bernard-Soulier.

Al investigar pacientes con sospecha de trastorno de la coagulación, es importante realizar una historia clínica detallada. Entre las pruebas iniciales se recomienda efectuar un frotis sanguíneo, determinar el recuento de plaquetas y el tiempo de sangrado dentro de la piel (descrito en el capítulo 11). Si estas pruebas están dentro de los límites normales, es improbable que la causa del sangrado que se está investigando sea una anomalía plaquetaria clínicamente importante.

También es esencial obtener una historia farmacológica. Ciertas drogas pueden influir en los resultados de las pruebas de función plaquetaria, incluida la de tiempo de sangrado. Por ejemplo, la ingestión reciente de aspirina ejerce efecto durante un período de hasta 10 días.

Para obtener un listado de las drogas que pueden interferir con la función plaquetaria, ver las recomendaciones de la Sociedad Británica de Hematología sobre las pruebas de función plaquetaria, que aparecen en la bibliografía más adelante.

Otra prueba simple que puede indicar la presencia de una anomalía es el método de retracción del coágulo, que se describe a continuación.

## 39.1 Retracción del coágulo

La retracción del coágulo en sangre entera coagulada puede dar un indicio de la cantidad de plaquetas y de la función plaquetaria. Cuando el coágulo se retrae, se exprime el suero, y se puede medir el grado de retracción del coágulo.

### MÉTODO

- 1 Introducir 1 ml de sangre en un tubo de ensayo de vidrio (75 mm × 10 mm) y colocarlo a 37 °C.
- 2 Examinar el tubo a simple vista hasta que se forme un coágulo firme. Dejar sin tocar a 37 °C durante otra hora.
- 3 Medir la distancia desde la base del tubo hasta el menisco. Retirar con cuidado el coágulo con un palillo delgado de madera (por ejemplo, un mondadientes), dejando el suero que se ha exprimido del coágulo en el tubo.
- 4 Medir la distancia desde la base del tubo hasta el menisco del suero.
- 5 Dividir la distancia del suero por la distancia total y multiplicar por 100 para obtener un porcentaje.

### INTERPRETACIÓN

Normalmente se exprime más del 40% del suero. En algunos casos de anomalía plaquetaria, claramente en la trombostenia de Glanzmann, se observa que el porcentaje de suero exprimido es menor.

### OBSERVACIONES

- Los tubos y el palillo de madera deben estar absolutamente limpios para evitar que el coágulo se adhiera al tubo.
- Retirar el coágulo en forma suave y cuidadosa para evitar apretarlo y que se exprima más suero.



## BIBLIOGRAFÍA

Chanarin I (ed.). *Laboratory Haematology: An Account of Laboratory Techniques*.  
Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989.

Guidelines on platelet function testing. The British Society for Haematology BCSH  
Haemostasis and Thrombosis Task Force. *J Clin Pathol* 1988; 41: 1322-1330.

## 39.2 Medición de la agregación plaquetaria

### FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La densidad óptica del plasma rico en plaquetas (PRP) disminuye en la medida que las plaquetas forman agregados. La cantidad, y hasta cierto punto la tasa, de disminución depende en gran medida de la reactividad plaquetaria, siempre que se controlen todas las demás variables (por ejemplo, el recuento de plaquetas, la velocidad de mezcla y la temperatura).

Se hace un seguimiento de los cambios de densidad óptica: la densidad óptica del PRP refleja el grado de agregación plaquetaria inducida por uno de varios agonistas.

La densidad óptica se observa usando un agregómetro conectado a una grabadora de gráficos, para que los resultados queden documentados en forma de gráfico.

Se han publicado varias revisiones de las actuales prácticas en diferentes centros (Jennings et al. 2008, Cattaneo et al. 2009) y recomendaciones (Bolton-Maggs et al. 2006).

### PRECAUCIONES ANTES DE EFECTUAR UNA PRUEBA DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Los compuestos que contienen aspirina se deben excluir durante un mínimo de 10 días previo a la prueba, salvo que se esté investigando específicamente su efecto sobre la agregación plaquetaria. Esto es así porque la aspirina interfiere con la reacción de liberación.

En lo que respecta a otras medicaciones que se sabe influyen en la función plaquetaria, también se recomienda no ingerirlas al menos durante el tiempo necesario para eliminarlas del sistema circulatorio. Entre ellas, ciertos antihistamínicos, antibióticos y antidepresivos. Antes de realizar las pruebas de función plaquetaria es conveniente ver qué medicación se ha recetado.

Como los quilomicrones pueden interferir con la medición de la agregación plaquetaria, no se debe realizar la prueba enseguida después de comer una comida con grasas.

Existen muchos otros constituyentes dietarios “normales”, como alcohol, cebollas, ajo, pimientos y jengibre, que también pueden inhibir la agregación plaquetaria. Tener esto en cuenta al evaluar los resultados.

## PREPARACIÓN DE PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y PLASMA POBRE EN PLAQUETAS

Se extrae sangre venosa con una oclusión venosa mínima y se introduce en un volumen de 1/10 parte de citrato trisódico (0,109M) en un tubo de polipropileno o vidrio siliconado. Se necesita aproximadamente 20 ml de sangre para realizar una prueba de agregación completa.

La refrigeración activa las plaquetas, y entonces la sangre se procesa a una temperatura de 20 °C a 25 °C. El plasma rico en plaquetas (PRP) se prepara mediante centrifugación de 10 a 15 minutos a 200 g.

Se retira con cuidado el PRP, evitando que se contamine con los glóbulos rojos o con la capa leuco-plaquetaria (*buffy coat*) (la presencia de cualquiera de ellos hará disminuir la agregación), se coloca en un tubo de polipropileno y se conserva entre 20 °C y 25 °C hasta el momento de la prueba. La temperatura precisa de conservación no es decisiva, pero puede influir en los resultados, y por eso se debe respetar la misma temperatura para todas las muestras de PRP.

La sangre restante se centrifuga a 2000 g durante 20 minutos, y el plasma pobre en plaquetas (PPP) se retira y se conserva a 4 °C.

Se efectúa un recuento de las plaquetas en el PRP: la cantidad de plaquetas influirá en las respuestas de agregación, pero se mantendrán dentro del rango en que se sitúan la mayoría de los recuentos de PRP (de 200 a 600 × 10<sup>9</sup>/l); tales efectos son mínimos. Sin duda, existe evidencia de que la dilución de PRP con PPP del mismo paciente puede inhibir las respuestas, probablemente porque el PPP puede contener sustancias liberadas de las plaquetas por el trauma adicional causado por la centrifugación a mayor velocidad (Cattaneo et al. 2007, Linnemann et al. 2008). Por estas razones, normalmente no se aconseja ajustar el PRP cuando el recuento de plaquetas está en el rango antes mencionado.

En el caso de recuentos de PRP excesivamente altos (>1000 × 10<sup>9</sup>/l), las respuestas de agregación se pueden ver afectadas. En ese caso puede ser beneficioso ajustar el recuento de plaquetas a un nivel más adecuado. Esto se puede hacer diluyendo el PRP en el PPP del paciente. Del mismo modo, los recuentos plaquetarios bajos (<200 × 10<sup>9</sup>/l) pueden mostrar una disminución de la respuesta de agregación. La concentración de plaquetas casi siempre induce a un cambio funcional y no es recomendable. Sin embargo, a los fines comparativos se puede realizar un control normal diluido (en PPP) respecto del mismo recuento de PRP.

La agregación plaquetaria es pH-dependiente, y por eso se debe mantener el PRP dentro del rango de 7,7 a 8,0. El control dará resultados satisfactorios si se conserva el PRP en tubos llenos y fuertemente tapados y las pruebas se completan dentro de las dos horas de la extracción de sangre.

## AGENTES DE AGREGACIÓN

Los reactivos como el difosfato de adenosina (ADP) y el colágeno se adhieren a determinados receptores en la membrana plaquetaria, activando las plaquetas y disparando una serie de reacciones. Esto hace que las plaquetas

experimenten un cambio de forma, se contraigan, se movilen, liberen constituyentes granulares y por último se adhieran entre sí, produciéndose la agregación plaquetaria.

La agregación plaquetaria se produce al ponerse en marcha varias vías de activación plaquetaria diferentes pero vinculadas entre sí, según el tipo y la concentración del agonista utilizado. En el tubo de reacción, el cambio de una suspensión plaquetaria uniforme a la formación de agregados lleva a una menor absorbancia lumínica y a un aumento de la luz transmitida a través de las suspensiones plaquetarias. Esto se detecta mediante una grabadora combinada con un agregómetro de plaquetas.

Los cinco agentes de agregación que se mencionan son suficientes para identificar los diversos trastornos de la función plaquetaria.

### ***Difosfato de adenosina (ADP)***

Se prepara una solución madre (*stock*) de sal disódica 1mM/l en tampón salino de Owren (OBS) y se conserva en pequeñas cantidades a -40 °C. Esta solución se mantendrá estable durante al menos tres meses. Una vez descongelada, se debe usar dentro de las tres horas o bien desechar.

Para utilizar, se preparan más diluciones en OBS. El patrón de respuesta al ADP depende de su concentración final.

- A 2  $\mu\text{mol/l}$ , se pueden ver ondas de agregación primarias y secundarias claramente definidas: la primera representa el efecto directo inducido por el agonista y la segunda se debe a la liberación de ADP endógeno y a la generación de tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), que en sí mismo produce agregación de plaquetas.
- Por debajo de 2  $\mu\text{mol/l}$ , cada vez menos personas normales muestran una respuesta secundaria, y la onda primaria generalmente se revierte ya que el ADP se degrada enzimáticamente.
- Por encima de 3  $\mu\text{mol/l}$ , la fase primaria generalmente es tan intensa que encubre y no permite distinguir entre la fase primaria y la secundaria.

El ADP induce un cambio en la forma de las plaquetas, de disco a esfera puntiaguda. Esto en un principio causa un leve aumento en la densidad óptica de la suspensión plaquetaria, que solo se puede ver si afecta la agregación primaria.

### ***Adrenalina (epinefrina)***

Se prepara una solución madre de sal bitartrato 1mM/l en OBS, que debe ser conservada y usada siguiendo las indicaciones dadas para el ADP. Con la adrenalina, las concentraciones que se utilizan y los patrones de respuesta son similares a los del ADP. Sin embargo, en ausencia de una onda secundaria, la onda primaria no se revierte, ni es tan intensa como para encubrir la onda secundaria.

### **Colágeno**

Lo que se utiliza comúnmente es una suspensión muy estable de fibrillas de colágeno de tendón equino (1 mg/ml), que se puede adquirir de Hormon-Chemie, Munich, Alemania. Existen otros materiales que también son adecuados. Se conserva a 4 °C y se debe mezclar bien inmediatamente antes de proceder a su dilución en el tampón incluido en el envase. Se debe utilizar a la concentración final de 0,5 a 2,0 µg/ml en PRP, y las suspensiones diluidas se mantendrán estables durante una semana a 4 °C.

Con el colágeno, no se produce onda primaria. Generalmente la respuesta se define por la duración de la fase de demora previa al inicio de la agregación y por la intensidad de esta última. Antes de la agregación hay un leve aumento de la densidad óptica causado por el cambio de forma.

Se utiliza colágeno de diversas fuentes. Tanto el tipo de colágeno como la especie de la cual se realiza el preparado (por ejemplo, equina o bovina) tienen un efecto importante en los resultados que se obtengan. Sin duda, se requiere más de cien veces el rango de concentraciones, según el material de base. Por lo tanto, es importante seleccionar la fuente adecuada y establecer un rango de referencia local para este material, el que será revaluado si se modifica la fuente. Para una revisión, ver Jennings et al. (2008).

### **Ristocetina**

A una concentración final de ristocetina 1 mg/ml en PRP, generalmente se puede distinguir entre la onda primaria y la onda secundaria, pero por encima de esta concentración, el efecto directo es tan intenso que las dos fases se fusionan.

La onda primaria es una medida de la cantidad de factor von Willebrand presente en el plasma, mientras que la onda secundaria se produce por la liberación de sustancias endógenas.

### **Ácido araquidónico**

Se disuelve araquidonato sódico (99% de pureza) en OBS hasta obtener una concentración de 10mM/l. Se colocan pequeñas alícuotas en viales de vidrio oscurecido tratados con nitrógeno para evitar la oxidación, luego se tapan firmemente y se conservan congelados a una temperatura por debajo de -20 °C.

La agregación generalmente es monofásica y está precedida por una breve fase de demora.

## **REACTIVOS**

*Observación: Estas concentraciones son convenientes si se agrega una parte a nueve partes de PRP.*

- ADP  
Hacer una dilución de 1 en 10 = 100 µM (es decir, 0,1 ml de solución 1000 µM + 0,9 ml de OBS).

A partir de allí, formar dos concentraciones de trabajo:

- 20  $\mu\text{M}$  (es decir, 0,2 ml 100  $\mu\text{M}$  + 0,8 ml de OBS);
- 30  $\mu\text{M}$  (es decir, 0,3 ml 100  $\mu\text{M}$  + 0,7 ml de OBS).

En casos donde se prueba la hiperagregabilidad, posiblemente se necesite una concentración menor (por ejemplo, 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ ).

- Adrenalina (epinefrina)  
Diluir siguiendo las indicaciones dadas para el ADP.
- Colágeno  
Mezclar bien y diluir en OBS:
  - 1 en 500 (es decir, 0,1 ml solución madre + 4,9 ml de OBS) = 20  $\mu\text{g/ml}$ ;
  - 1 en 100 (es decir, 0,5 ml de dilución 1,50 + 0,5 ml de OBS) = 10  $\mu\text{g/ml}$ .
- Ristocetina  
Se utiliza a distintas concentraciones (hasta cuatro) según los resultados que se desee obtener: 15 mg/ml, 12,5 mg/ml, 7,5 mg/ml, y 5 mg/ml.
- Ácido araquidónico  
10mM/l

## MÉTODO

Debido al efecto refractario de las plaquetas frente a la agregación provocado por la centrifugación, las pruebas de agregación no deben iniciarse dentro de los 30 minutos de preparar la PRP. En particular, la respuesta al ADP se reduce durante los primeros 20 a 30 minutos después de la preparación del PRP. Sin embargo, las pruebas se deben completar dentro de las dos horas.

- 1 Encender el agregómetro para precalentar a 37 °C y poner la velocidad de movimiento a 900 rpm.  
Algunos agregómetros tienen dos canales, entonces es conveniente usar la mitad del ancho del papel de gráfico para cada canal.  
Con una deflexión de 10 mV, los niveles de PRP utilizados son 0,5 mV y 5,5 mV para los canales 1 y 2 respectivamente (que representan el 0% de la agregación), y los correspondientes valores en blanco (que se establecen usando PPP) serían 4,5 mV y 9,5 mV (representan el 100% de la agregación).
- 2 Colocar 0,45 ml de PRP en una cubeta de vidrio (desechar después de usar) que contenga un "archivo" siliconado para la mezcla.
- 3 Colocar en el portacubeta para el canal 1 y poner la transmisión al 0% (0,5 mV). Reemplazar con una cubeta que contiene 0,5 ml de PPP y poner la transmisión al 100% (4,5 mV). Repetir este procedimiento hasta que no sea necesario realizar más ajustes.
- 4 Repetir para el canal 2, usando los niveles 5,5 mV y 9,5 mV.

- 5 Dejar precalentar el PRP hasta 37 °C durante dos minutos. Agregar 0,05 ml de agonista al fondo de la cubeta y observar el cambio de densidad óptica durante tres minutos.

Repetir este procedimiento para cada agonista.

### OBSERVACIONES

- Para el ADP y la adrenalina, comenzar con la concentración 20 µM. Esto dará una concentración final en PRP de 2 µM.
- Para el colágeno, usar la concentración de 10 g/ml. Esto dará una concentración final de 1 µg/ml.
- Para la ristocetina, usar la concentración de 12,5 mg/ml. Al realizar una prueba de rastreo para la EvW de tipo 2B, probar además las concentraciones de 7,5 mg/ml y 5 mg/ml. Estas darán una concentración final en PRP de 1,25 mg/ml, 0,75 mg/ml, y 0.5 mg/ml respectivamente. Usar 15 mg/ml si no hay respuesta hasta 12,5 mg/ml.

Si las plaquetas hiperagregan con ristocetina 0,5 mg/ml (lo que indica una posible EvW 2B o EvW plaquetaria):

- Controlar la agregación espontánea observando el PRP bajo las mismas condiciones de movimiento en el agregómetro sin agregar ningún agonista para estimular la agregación.
- Lavar un volumen medido de PRP (por ejemplo, 1 ml tanto de plasma del paciente como de plasma normal × 3) en un tampón de lavado de EDTA-citrato-solución salina. Con cuidado resuspender las plaquetas del paciente en el plasma normal y las plaquetas normales en el plasma del paciente. Volver a probar con ristocetina 0,5 mg/ml.

Las reacciones corresponderán a una de las siguientes categorías de patrones:

### Figura 39.1. Patrones de reacción

PRP del paciente PPP del paciente	Plaquetas del paciente PPP normal	Plaquetas normales PPP del paciente
Agregación	Sin respuesta	Agregación = EvW 2B
Agregación	Agregación espontánea	Sin respuesta = EvW plaquetaria*

\*Para una revisión de la enfermedad de von Willebrand plaquetaria, ver Franchini et al. (2008).

### INTERPRETACIÓN DE LOS PATRONES DE AGREGACIÓN

- Si las plaquetas sometidas a prueba no dan una respuesta normal (es decir, que dos fases de agregaciones cubran más del 50% de la escala, mientras que las concentraciones arriba mencionadas cubren más del 50% de la escala con las concentraciones de reactivos arriba mencionadas) entonces la concentración del agonista aumenta (dentro de lo razonable) hasta que se obtiene una respuesta satisfactoria.



- En aquellos casos donde existe una obvia alteración de la liberación, observar la respuesta al ácido araquidónico.
- Si no se obtiene respuesta con el ácido araquidónico, probar con tromboxano A2 o ionóforo de calcio.
- Al estudiar la agregación plaquetaria como parte de una evaluación de la hiperagregabilidad, se usan el ADP y la adrenalina en concentraciones menores para obtener una curva de respuesta a la dosis. Las concentraciones que se usan son: 2  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , concentración final 0,1  $\mu\text{M}$  en PRP. También se realiza una prueba de agregación espontánea antes de probar el resto de los agonistas:
  1. Colocar 0,5 ml de PRP en una cubeta y llevar al agregómetro.
  2. Observar cualquier cambio en la densidad óptica durante 15 minutos.

Si el volumen de PRP no es suficiente, el volumen mínimo que se puede usar en las cubetas estándar es de 0,36 ml de PRP + agonista 40  $\mu\text{l}$ .

- Como elemento de control de los reactivos, procesar el PRP preparado de la misma forma a partir de un donante de salud normal. Esto es de especial importancia si se obtienen resultados anormales del paciente, ya que algunos agonistas son lábiles, en particular una vez diluidos para obtener concentraciones de trabajo. Los resultados que se obtengan de personas de salud normal se pueden usar para derivar rangos de referencia que ayuden a la interpretación de los resultados de los pacientes.

### CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Los resultados generalmente se expresan de tres formas:

- 1 La caída del porcentaje de densidad óptica medida tres minutos después de que se agregue el agonista. Esta es la forma más conveniente, si bien no brinda información sobre la forma de las curvas de agregación.
- 2 La pendiente inicial en el trazado de la agregación. Esta pendiente indica la tasa de agregación, pero no indica si se ha producido agregación secundaria.
- 3 La determinación de la concentración umbral del agonista, es decir, la cantidad de reactivos de agregación necesarios para apenas inducir una respuesta de segunda fase. (Esto tiende a ser un desperdicio de PRP.)

### INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se necesita mucho cuidado al interpretar los patrones de agregación plaquetaria. Diversos factores técnicos pueden influir en los resultados. Tener en cuenta que existen varias diferencias significativas entre la agregación determinada por nefelometría y la que ocurre en el cuerpo.

No obstante, se puede obtener información útil para el diagnóstico. En la figura 39.2 se muestran ejemplos de patrones de agregación.



**Figure 39.2. Resultados de la agregación plaquetaria en varios trastornos**

Trastorno	ADP	Colágeno	Ristocetina 1,25 mg/ ml	Ristocetina 0,5 mg/ ml	Ácido araquidónico	Adrenalina
EvW tipo 1 y 2A	N	N	A/R**	A	N	N
EvW tipo 2B	N	N	N	RE	N	N
Síndrome de Bernard-Soulier	N	N	A	A	N	N
Trombastenia de Glanzmann	A	A	N	A	A	A
Tesaurismosis de agregación	P/N	R/N	P/N	A	R/N	P/N
Alteración de la ciclooxigenasa*	R/N	R	N	A	R	R/N

N = Normal; A = Ausente; R = Reducido; RE = Respuesta elevada; P = Solo onda primaria

\* O por efecto de la aspirina \*\* Puede ser normal en la EvW de tipo 1 leve

### INVESTIGACIÓN ADICIONAL DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA

Si se observa un patrón de agregación anormal en una persona, se aconseja repetir la evaluación al menos una vez más para verificar que persiste la anormalidad.

En presencia de agregación anormal, puede ser útil continuar con la investigación, lo que implica medir el contenido de nucleótidos en las plaquetas y su liberación durante la agregación plaquetaria.

Se puede realizar una cuantificación de las glicoproteínas contenidas en las membranas para obtener un diagnóstico inequívoco del síndrome de Bernard-Soulier y la trombastenia de Glanzmann.

El mecanismo de liberación de plaquetas se puede evaluar mediante la medición del contenido total de ADP y de trifosfato de adenosina (ATP) en plaquetas y la liberación de ATP o 5-hidroxitriptamina (o ambas) de los gránulos densos.

### Figura 39.3. Factores técnicos que influyen en la función plaquetaria

Anticoagulante	En un volumen 1/10 de citrato trisódico.
Tiempo	Comenzar las pruebas 30 minutos después de la preparación del PRP. Completar las pruebas dentro de las dos horas de la extracción de sangre.
Centrifugación	Debería ser suficiente para retirar los glóbulos rojos y los glóbulos blancos, pero no las macroplaquetas. Se debe realizar a temperatura ambiente, no a 4 °C.
Recuento plaquetario	Los recuentos bajos < 100 × 10 <sup>9</sup> /l causan respuestas lentas y débiles. Los recuentos altos > 1000 × 10 <sup>9</sup> /l pueden mostrar una respuesta reducida.
pH	< 7,7 pH inhibe la agregación. > 8,0 pH estimula la agregación.
Velocidad de mezcla	< 800 rpm muestra una agregación reducida. >1200 rpm rompe los cúmulos de plaquetas.

Hematocrito	> 55% muestra progresivamente menos agregación, en especial una inhibición de segunda fase producida por la mayor concentración de citrato.
Temperatura	< 35 °C muestra una disminución de la agregación con dosis regulares de todos los agonistas, y un aumento en la respuesta a dosis bajas de ADP.
Lipemia	Un aumento de los quilomicrones produce una disminución de la agregación.
Cubeta sucia	Puede provocar una aparente agregación espontánea.
Inexistencia de barra de agitación magnética	No hay respuesta al agregar un agente de agregación.
Burbujas de aire	Grandes oscilaciones rápidas, de la pluma registradora previas a la agregación. También las puede producir un recuento bajo de plaquetas.

### DIFERENCIAS ENTRE LAS CONDICIONES *IN VIVO* E *IN VITRO* PARA LA AGREGACIÓN PLAQUETARIA

Con pruebas sanguíneas *in vitro*:

- La sangre está anticoagulada.
- Se retiran los glóbulos rojos y los glóbulos blancos.
- No se comprometen los componentes vasculares.
- No se compromete la coagulación.
- Se selecciona la población plaquetaria.
- Se retienen los productos de activación y liberación plaquetaria.
- Se utilizan reactivos no fisiológicos en su composición y dosis.
- Las plaquetas se mantienen inestables fuera del cuerpo.
- Los medicamentos pueden mostrar efectos más o menos marcados en comparación con las pruebas *in vivo*.

### BIBLIOGRAFÍA

- Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ, Minford A, Mumford AD, Parapia LA, Perry DJ, Watson SP, Wilde JT, Williams MD; UKHCDO. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UK HCDO. *Br J Haematol* 2006; 135:603-33.
- Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: A report from the Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 2009; 7:1029.
- Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F. Platelet aggregation studies: Autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica* 2007; 92:694-7.
- Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Clinical, laboratory and therapeutic aspects of platelet-type von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol* 2008; 30:91-4.
- Jennings I, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Platelet function testing: practice among UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation participants, 2006. *J Clin Pathol* 2008; 61:950-4.
- Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: An adjustment for platelet count is not necessary. *Thromb Haemost* 2008; 6:677-83.

## INTRODUCCIÓN

La liofilización, o secado por congelación, se puede usar para preparar plasma que se mantendrá inalterado durante períodos prolongados. Esto es útil, por ejemplo, para preparar plasma deficiente en factor VIII liofilizado, que normalmente se mantendrá inalterado entre un mínimo de dos y un máximo de cinco años si se conserva a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o temperatura menor, y para sobrevivir períodos cortos (hasta siete días) a temperaturas de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## PLASMA ADECUADO

Sangre venosa mezclada con citrato de sodio 0,105 a 0,109M en la proporción 9 partes de sangre, 1 parte de anticoagulante. Centrifugar a 1700 g durante 10 minutos, preparar el pool en la forma correspondiente y conservar a  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  mientras se esperan los resultados de la prueba viral. Confirmar los resultados negativos para el anti-VIH 1 y 2, anti-VHC y el antígeno de superficie de la hepatitis B (AgsHB).

## MATERIALES

- Viales de 2 ml de vidrio neutral transparente, con cuello de 13 mm siliconado por dentro.
- Tapón para liofilizado, 13 mm, gris.
- Precintos totalmente desprendibles, 13 mm.

(Todo esto se puede adquirir de Diagnostic Reagents, Thame, Oxfordshire, Reino Unido.)

- Liofilizadora (consiste en un secador con bandejas y mecanismo de sellado (Supermodulyo & stoppering shelf); se puede adquirir de Life Sciences International, Unit 5, Ringway Centre, Edison Road, Basingstoke, Hampshire, RG21 6YH, Reino Unido).
- Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etano sulfónico (HEPES, BDH Laboratory Suppliers, Poole, BD15 1TD, Reino Unido).

## MÉTODO

1 Descongelar el plasma rápidamente a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

2 Mezclar bien.

- 3 Agregar 0,8 g de ácido HEPES por 100 ml de plasma.
- 4 Mezclar y dejar que el ácido HEPES se disuelva (de 15 a 20 minutos aprox.).
- 5 Llenar las bandejas de acero inoxidable para liofilización con los viales vacíos.
- 6 Colocar alícuotas exactas de 0,5 ml en cada vial.
- 7 Colocar un tapón de goma en cada vial hasta lo profundo de la cresta angosta en el tapón. Asegurarse de cerrar todo acceso de aire al vial.
- 8 Congelar a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante un mínimo de tres horas.
- 9 Encender la liofilizadora. Activar la unidad de refrigeración.
- 10 Colocar las bandejas en la unidad portabandejas (hasta ocho).
- 11 Colocar la unidad portabandejas en la cámara de plástico transparente sobre el puerto de salida de aire en la parte superior de la liofilizadora.
- 12 Activar la bomba. Asegurarse de que los dos pasos anteriores y este se completen dentro de tres a cuatro minutos para evitar que el plasma comience a descongelarse. Si ocurre un descongelamiento parcial, el material empezará a hacer espuma y no liofilizará bien, por lo que se deberá desechar.
- 13 Confirmar que se está produciendo el vacío por el movimiento en el indicador de presión (el movimiento se verá en unos pocos minutos) y por la inmovilidad de la cámara de plasma bajo la liviana presión manual lateral.
- 14 Dejar sometido a vacío durante cinco días.
- 15 Sellar los viales sometidos a vacío enroscando las manijas en la unidad portabandejas.
- 16 Permitir que entre el aire por el puerto de entrada.
- 17 Descongelar y liofilizar.
- 18 Conservar los plasmas liofilizados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , y taparlos lo antes posible.
- 19 Para confirmar que la liofilización del plasma es pareja, comprobar de cuatro a seis viales seleccionados de distintas ubicaciones en las bandejas de acero inoxidable. Determinar el TP y el TTPA, los que no deberían variar en más del 6% al 8%.

## INTRODUCCIÓN

La automatización en los laboratorios de coagulación está cada vez más difundida en casi todo el mundo. Contribuyó a mejorar la estandarización y la simplificación de pruebas que requieren una capacitación específica y condiciones de trabajo especiales, de manera que los laboratorios puedan mejorar su eficiencia y ampliar la variedad de servicios que ofrecen.

La automatización de la hemostasia es bastante reciente. Antiguamente, los métodos manuales que se basaban en la detección visual del coágulo de fibrina y en el uso de incubadoras a 37 °C eran las únicas técnicas para los estudios de la coagulación. Más adelante, en la década de 1970, surgieron equipos semiautomáticos que recurrían a principios fotométricos o mecánicos para detectar la fibrina. Más recientemente, se volvió frecuente el uso de instrumentos totalmente automáticos en los laboratorios modernos. En la actualidad, los equipos modernos conectados con sistemas específicos de procesamiento de datos pueden realizar pruebas de coagulación y ensayos cromogénicos e inmunológicos.

Actualmente, se trabaja con dos metodologías:

- 1 mecánica y
- 2 óptica:
  - 2.1 foto-óptica
  - 2.2 nefelométrica
  - 2.3 cromogénica
  - 2.4 inmunológica

## PRINCIPIO MECÁNICO

Los métodos electromagnéticos se basan en la detección de un aumento de la viscosidad del plasma cuando se produce la formación de fibrina. Actualmente, se aplican dos variantes de este principio en el equipamiento de laboratorio.

La primera variante utiliza un campo electromagnético aplicado a cubetas de prueba que detecta el movimiento de una esfera de acero inoxidable que se coloca en la muestra de plasma. La esfera de acero sigue un movimiento pendular, balanceándose de un lado a otro dentro de una solución reactivo de plasma con un movimiento constante. Cuando comienza a formarse la fibrina, aumenta la viscosidad y los movimientos de la esfera se retardan. Cuando el movimiento oscilatorio de la esfera llega a un nivel predeterminado, se detiene el cronómetro y se obtiene así el tiempo de coagulación del plasma.

El otro método de detección mecánica también emplea una esfera de acero inoxidable, pero esta vez ubicada en un único punto. Un sensor magnético detecta la posición de la esfera y, a medida que rota, la esfera mantiene su inclinación mientras la muestra líquida permanece fluida. Cuando se forma la fibrina, el coágulo captura la esfera y la desplaza de su posición original. Cuando queda fuera del alcance del sensor, el circuito se interrumpe y se detiene el cronómetro (Thomas et al. 1999).

## PRINCIPIOS ÓPTICOS Y ESPECTOFOTOMÉTRICOS

### *Principio foto-óptico*

Los sistemas ópticos se basan en el principio de que la formación del coágulo genera un cambio en la densidad óptica del plasma. A medida que se forma el coágulo, se producen cambios en las características ópticas respecto de la lectura inicial del plasma o de los reactivos. Los cambios se monitorean y utilizan para determinar el tiempo que toma alcanzar un determinado nivel de cambio.

### *Principio nefelométrico*

Es un principio que utilizan algunos sistemas. En los ensayos de coagulación, se transmite una fuente de luz láser monocromática, por ejemplo, por medio de fibra óptica. Las lecturas de la dispersión de luz son posibles gracias a un sensor que puede estar instalado a 90 o 180 grados de la trayectoria del haz luminoso, según el sistema, que mide la luz dispersada en un ángulo o registra los cambios en la transmisión de la luz. Cuando la luz llega a los complejos insolubles como las fibras de la fibrina, se difunde en ángulos de dispersión frontal (180 grados) y en ángulos de dispersión lateral (90 grados). Se detiene el cronómetro cuando la cantidad de luz dispersada o transmitida llega a un nivel específico predeterminado. La diferencia entre la luz dispersada o transmitida antes y después de la formación del coágulo por lo general es proporcional a la cantidad de fibrina formada.

### *Principio cromogénico*

Se basa en el uso de sustancias generadoras de un color específico denominadas *cromóforos*, de las cuales la más común es la para-nitroanilina (pNA), que tiene una absorbancia máxima a 405 nm. El principio de los ensayos cromogénicos reside en la adherencia de la pNA a los sustratos sintéticos (Rodak, 1995). La pNA se adhiere a una serie de aminoácidos que copia la secuencia meta del factor de coagulación activado que se desea determinar. La proteína de coagulación segmenta el sustrato cromogénico en un sitio específico entre una secuencia definida de aminoácidos y libera la pNA.

La intensidad del color amarillo es proporcional a la cantidad de pNA liberada. Se mide mediante fotodetección a una longitud de onda de 405 nm. A medida que se segmenta y libera más pNA, aumenta la capacidad de absorbancia de la muestra, lo que genera un cambio mayor en la densidad óptica de la solución (Rodak, 1995).



**Figura 41.1. Ventajas y desventajas de los métodos de detección para definir parámetros**

Método	Ventajas	Desventajas
<b>Mecánico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No se ve afectado por las características físicas, como la lipemia o hemólisis.</li> <li>• Puede emplear pequeños volúmenes de muestra.</li> <li>• Algunos pueden analizar la sangre completa en algunas pruebas y lo que evita la necesidad de centrifugación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es imposible observar gráficos de la formación del coágulo.</li> <li>• Puede presentar problemas en la detección del punto final en algunas muestras con bajo nivel de fibrinógeno.</li> </ul>
<b>Foto-óptico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se pueden observar los gráficos de la formación del coágulo.</li> <li>• Algunos sistemas ópticos ofrecen pruebas ópticas para detectar hemólisis, lipemia, ictericia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se ve afectado por la lipemia, la hemólisis, la hiperbilirrubinemia o por un aumento de proteínas en algunos sistemas.</li> <li>• Algunos sistemas pueden presentar dificultades en la detección del coágulo cuando se emplean ciertos reactivos totalmente transparentes.</li> <li>• Los períodos de coagulación muy breves pueden pasar inadvertidos debido al tiempo que transcurre hasta que se inicia la detección.</li> </ul>
<b>Nefelométrico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede medir las reacciones antígeno-anticuerpo en las proteínas presentes en muy poca cantidad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ofrece una cantidad limitada de pruebas.</li> <li>• El costo de los reactivos es elevado.</li> </ul>
<b>Cromogénico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Los ensayos totalmente específicos pueden resultar más sencillos.</li> <li>• Puede utilizar parámetros adicionales que no son adecuados para el método de formación del coágulo.</li> <li>• Aumenta la variedad de pruebas posibles.</li> <li>• Puede mejorar la precisión en comparación con la de los análisis que dependen de la coagulación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Está limitado a la longitud de onda del instrumento.</li> <li>• Se necesitan grandes volúmenes de prueba para lograr una relación costo-beneficio positiva.</li> <li>• El costo del instrumento y los reactivos es elevado.</li> </ul>
<b>Inmunológico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede automatizar los métodos manuales que llevan gran cantidad tiempo.</li> <li>• Aumenta la cantidad de pruebas posibles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ofrece una cantidad limitada de pruebas.</li> <li>• El costo de los instrumentos es elevado.</li> <li>• El costo de los reactivos es elevado.</li> </ul>



El primer equipo de coagulación solo podía brindar un único parámetro de definición, ya sea mecánico o foto-óptico. En su concepción inicial, las herramientas foto-ópticas fueron diseñadas para lecturas a una única longitud de onda (por ejemplo, a 500 nm o 600 nm) que solo podían usarse para la detección de la formación del coágulo. Desde hace un tiempo, algunos coagulómetros pueden leer dos o más longitudes de onda, a menudo incluyendo 405 nm, y cada vez tienen mayor capacidad para trabajar con nuevas reacciones (métodos de sustrato cromogénico). En la década de 1990, una serie de fabricantes introdujo los métodos de detección múltiple con buenos resultados que ahora permiten que un único laboratorio tenga la posibilidad de aplicar diferentes metodologías usando un mismo equipo.

### *Principio inmunológico*

Las partículas de látex recubiertas con un anticuerpo específico por lo general se utilizan contra el analito (antígeno) que se desea evaluar. Un haz de luz monocromática atraviesa una suspensión de micropartículas de látex. Cuando la longitud de onda es mayor que el diámetro de la partículas de la suspensión, las partículas absorben una pequeña cantidad de luz. Sin embargo, cuando las micropartículas de látex específicas recubiertas con anticuerpo entran en contacto con el antígeno presente en la solución, se adhieren al anticuerpo formando uniones entre las partículas, lo que produce la aglutinación. Cuando el diámetro de las partículas se acerca a la longitud de onda del haz de luz monocromática, se absorbe una mayor cantidad de luz. Este incremento en la absorbancia de la luz es proporcional a la aglutinación, que, a su vez, es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Este tipo de tecnología es el que utilizan los coagulómetros más sofisticados que aparecieron en el mercado en la década de 1990. Por lo general, los ensayos inmunológicos estándar que llevan gran cantidad tiempo pueden realizarse en minutos con el uso de cualquiera de estas herramientas automáticas.

### **VENTAJAS DE LA AUTOMATIZACIÓN PARA UN LABORATORIO DE COAGULACIÓN**

- 1 Mejora la capacidad y flexibilidad de las horas de trabajo profesional (Rodak, 1995).
- 2 Mejora la repetición de las pruebas. Antiguamente, las pruebas de coagulación manuales eran inexactas, y presentaban coeficientes de variación superiores al 20%; los equipos semi-automáticos ofrecían una mayor exactitud en las pruebas de coagulación. Sin embargo, con el despacho manual de las muestras y los reactivos, las pruebas deben hacerse por duplicado. Gracias a los equipos totalmente automatizados mejoró la exactitud, con lo que se alcanzaron coeficientes de variación inferiores al 5%, e incluso del 1% en algunas pruebas. Esto llevó a los autores a incorporar la idea de realizar pruebas únicas y la posibilidad de reducir a la mitad los costos de los reactivos y el uso de las cubetas.
- 3 Reduce el costo de las muestras y los reactivos.
- 4 Facilita el sistema de almacenamiento y recuperación de datos gracias al uso de programas de computación.

- 5 Permite la repetición automática de los resultados cuando se cometen errores en la primera prueba.
- 6 Ofrece la posibilidad de llevar a cabo diferentes pruebas utilizando una única muestra.
- 7 Permite obtener las muestras de un tubo cerrado, lo que aumenta la seguridad y eficacia de las pruebas de coagulación. Esto reduce, en gran medida, la posibilidad de exponer al operador a la atomización o derrame de la muestra del paciente, o los errores de identificación. Existe un fabricante que ofrece un sistema de rastreo patentado que separa automáticamente el plasma de los eritrocitos antes de llevar a cabo las pruebas sin necesidad de someterlo a una centrifugación previa.
- 8 Ofrece la función de dilución de muestras, calibradores y controles. El equipo puede programarse para efectuar otras diluciones si los resultados iniciales escapan a la linealidad del método. También puede llevar a cabo en forma automática otras pruebas sin la intervención del operador si así es solicitado clínicamente o con motivo de los resultados de la prueba inicial.
- 9 La mayor parte de los equipos analizadores incluyen sistemas de alarma que advierten al operador si se produjo algún exceso en las lecturas preestablecidas, lo que puede indicar un problema en el equipo (por ejemplo, hay poca cantidad de reactivo, alguna falla con la temperatura, la muestra es demasiado pequeña y errores en el control de calidad).

Los diferentes tipos de metodologías que existen tienen ventajas y desventajas que es importante conocer y comprender a fin de garantizar la precisión y validez de los resultados de las pruebas. Cabe destacar que los laboratorios tienen la responsabilidad de brindar resultados confiables. Una de las principales tareas que tiene un laboratorio es la de seleccionar un equipo de coagulación capaz de generar resultados correctos a pesar de las limitaciones del presupuesto. Dichos instrumentos requieren un mantenimiento técnico regular, capacitación permanente para manejarlos y un sistema de control, debido a que un error o falla puede influir rotundamente en una serie de resultados. En consecuencia, es imprescindible contar con un sistema de control que garantice la confiabilidad analítica.

Muchos laboratorios tienen la posibilidad de evaluar los equipos antes de comprarlos. Si ello no fuera posible, es importante conseguir la información correspondiente y pedir el asesoramiento de un laboratorio de referencia.

Cuando se evalúa un equipo antes de comprarlo, es conveniente comparar los analizadores según los siguientes criterios:

- costo del equipo;
- período de inactividad y confiabilidad;
- tiempo de entrega en caso de reparaciones;
- facilidad de manejo;
- disponibilidad de un mantenimiento adecuado dentro de un plazo razonable;

- proceso de validación y rendimiento;
- costo de los elementos desechables;
- flexibilidad en cuanto al uso de reactivos de otros fabricantes;
- posibilidad de añadir nuevos protocolos de pruebas;
- cursos de capacitación y capacitación continua (Rodak, 1995).

La sensibilidad de los diferentes tipos de equipo a parámetros múltiples variará en función de la calibración de los dispositivos y la detección de los puntos finales. Los laboratorios tienen necesidades diferentes, por lo que es recomendable analizar las prioridades. Para hacerlo, ver el ejemplo en la figura 41.2.

La tecnología está avanzando y las crecientes demandas que se presentan día tras día generan la necesidad de contar con instrumentos de estas características en el laboratorio. Dichos instrumentos serán un gran adelanto para los laboratorios, ya que brindan la posibilidad de llevar adelante pruebas confiables, exactas y precisas que entreguen resultados en menor tiempo y con un mayor control.

Las ventajas de la automatización son diversas. La tecnología avanza en forma continua para satisfacer los nuevos desarrollos en el área y para acortar los tiempos de respuesta, lo que permite que las pruebas sean confiables, exactas y precisas a la vez que mantienen la calidad.

### Figura 41.2. Características de los equipos especializados

Fuente: Rodak, 1995

Características	Descripción
Acceso aleatorio	Con la muestra del paciente, pueden realizarse una gran variedad de pruebas en cualquier orden y al mismo tiempo.
Tubo primario de prueba	La muestra de plasma se toma directamente por aspiración de un tubo de extracción abierto ubicado en el analizador.
Tapón penetrante y tubo de muestras cerrado	El analizador aspira al vacío la muestra de plasma del tubo de extracción con el tapón de goma colocado.
Código de barras	Permite la identificación del reactivo, las muestras del paciente o ambos mediante un código de barras. Su uso disminuye el ingreso manual de datos.
Interfase bidireccional	El analizador hace una búsqueda en una computadora central para determinar la cantidad de pruebas solicitadas. El operador no necesita programar manualmente la información en el equipo.
Indicador de muestras	Advierte al operador sobre los problemas referidos a la integridad de la muestra.
Sensor de nivel de líquido	Advierte al operador cuando el volumen de la muestra o del reactivo es insuficiente para realizar la prueba o si el equipo no aspiró suficiente cantidad de muestra para realizar la prueba solicitada.

Características	Descripción
Programas integrados de control de calidad	El programa de computación del instrumento almacena y organiza los datos de control de calidad. Puede incluir la aplicación completa de las normas de Westgaard para indicar los resultados que exceden los límites.
Función de emergencia STAT	Permite al operador cancelar la secuencia de verificación de la prueba para colocar una nueva muestra STAT (de emergencia) en la isla de verificación.
Capacidad de refrigeración las muestras integradas	Preserva la integridad de las muestras, los reactivos o ambos durante el proceso de verificación.
Capacidad de almacenamiento de las muestras integradas	Indica la cantidad de muestra del paciente que puede cargarse en el analizador en cualquier momento.
Función de prueba refleja	Permite programar el equipo para repetir o añadir pruebas bajo los parámetros específicos establecidos por el operario.
Almacenamiento de datos del paciente	El analizador tiene la función de almacenamiento de los resultados de las pruebas que pueden buscarse en cualquier momento. Puede almacenar las curvas de formación del coágulo.
Control del volumen de los reactivos	Advierte al operario si la cantidad de reactivo resulta insuficiente para las pruebas programadas.
Procesamiento	Se refiere a la cantidad de pruebas que los analizadores pueden procesar en un determinado tiempo (en general, se clasifican según la cantidad de pruebas por hora).
Curva de formación del coágulo	Permite al operador visualizar la formación del coágulo dentro de la cubeta. Ayuda a detectar determinadas condiciones irregulares o estados mórbidos, o bien la ubicación y solución de las fallas en los resultados anormales de las pruebas.

## BIBLIOGRAFÍA

Rodak BF (ed): *Diagnostic Hematology*. Philadelphia: WB Saunders, 1995: 626–631.

Thomas LC, Sochynsky CL. Multiple measuring modes of coagulation instruments. *Clin Hemost Rev* 1999; 13:8.

## OTRAS PUBLICACIONES DE INTERÉS

Graves S, Holman B, Rossetti M, Estey C, Felder R. Robotic automation analysis. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278:269–279.

Sasaki M, Kageoka T, Ogura K et al. Total laboratory automation in Japan: Past, present and the future. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278:217–227.

## 42 Análisis de genética molecular

Los métodos de laboratorio relacionados con todos los aspectos de los ensayos en genética molecular sobre la hemofilia y otros trastornos afines se presentan en otra publicación que está preparando el Comité de Ciencias de Laboratorio de la FMH (WFH Laboratory Sciences Committee) y cuya redacción está a cargo del Prof. Ampaiwan Chaunsumrit y de la Dra. Anne Goodeve. Dicho manual de laboratorio referido al análisis fenotípico podrá descargarse en forma gratuita de página web de la FMH ([www.wfh.org](http://www.wfh.org)).



**FEDERACIÓN MUNDIAL DE HEMOFILIA**

1425 René Lévesque Boulevard West, Suite 1010

Montréal, Québec H3G 1T7

CANADÁ

Tel.: (514) 875-7944

Fax: (514) 875-8916

Correo electrónico: [wfh@wfh.org](mailto:wfh@wfh.org)

Página web: [www.wfh.org](http://www.wfh.org)

FEDERACIÓN MUNDIAL DE

**HEMOFILIA**

WORLD FEDERATION OF HEMOPHILIA  
FÉDÉRATION MONDIALE DE L'HÉMOPHILIE



**Tratamiento para todos**