

3 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

1. Un diagnóstico correcto es esencial para asegurar que el paciente reciba el tratamiento adecuado. Los diversos trastornos de la coagulación pueden presentar síntomas muy similares.
2. Para llegar a un diagnóstico preciso es indispensable contar con el apoyo de un laboratorio que brinde un servicio integral y resultados exactos. Para ello, es necesario que el laboratorio se ajuste a una serie de protocolos y procedimientos estrictos, lo que exige:
 - conocimientos y experiencia en pruebas de coagulación de laboratorio;
 - uso de equipos y reactivos adecuados;
 - garantía de calidad.
3. Para obtener información detallada sobre los aspectos técnicos e instrucciones específicas de las pruebas de rastreo y los ensayos de factor, consulte el documento de la FMH: *Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de Laboratorio, Segunda edición* [1].

3.1 Conocimientos y experiencia en pruebas de coagulación de laboratorio

Principios de diagnóstico

1. Comprensión de las características clínicas de la hemofilia y diagnóstico clínico apropiado.
2. Uso de pruebas de tamizaje para identificar la causa potencial de una hemorragia, por ejemplo, recuento plaquetario, tiempo de hemorragia (TH; en determinadas situaciones) u otras pruebas de rastreo de la función plaquetaria, tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA).
3. Confirmación del diagnóstico mediante determinación de factor y otras investigaciones específicas pertinentes.

Aspectos técnicos

Preparación del paciente previo a una extracción de sangre

1. Por lo general, el ayuno no es necesario antes de una extracción de sangre que se haga para investigar la presencia de posibles trastornos de la coagulación, aunque el consumo excesivo de lípidos puede alterar los resultados de ciertos analizadores automáticos.
2. Los pacientes deben evitar tomar medicamentos que puedan afectar los resultados de la prueba, como las aspirinas, debido a que pueden afectar gravemente la función plaquetaria y prolongar el tiempo de hemorragia.

3. Los pacientes deben evitar la práctica de actividad física intensa inmediatamente antes de la punción venosa.
4. Si un paciente estuviera muy nervioso por la extracción, podrían elevarse temporalmente los niveles de FVIII y del factor de von Willebrand.

Extracción de la muestra

1. La muestra se tomará siguiendo los procedimientos habituales del caso [2].
2. Es preferible que la muestra se extraiga cerca del laboratorio a fin de asegurar su traslado rápido al mismo.
3. Las muestras se deberían analizar dentro de las cuatro horas de hecha la extracción.
4. Los resultados de los análisis pueden variar en función de las condiciones de almacenamiento de la muestra. Las temperaturas elevadas (>25° C) provocan pérdida de actividad del FVIII con el tiempo, mientras que el almacenamiento a baja temperatura (2 a 8° C) provoca la activación por frío. Es por ello que la muestra debe conservarse a una temperatura entre 20° C y 25° C, siempre que sea posible, pero por no más de cuatro horas.
5. La punción venosa debe ser limpia. La muestra debe extraerse dentro del minuto siguiente a la aplicación del torniquete de manera que la estasis venosa no sea prolongada.
6. La sangre debe recogerse en una jeringa plástica o con un sistema de extracción al vacío. La aguja será de calibre 19 a 21 para adultos y de calibre 22 a 23 para niños pequeños. La extracción por vía de catéteres venosos periféricos o catéteres venosos centrales no heparinizados puede servir para muchos de los análisis de hemostasia.
7. Para las pruebas de coagulación, se evitará el uso de sangre proveniente de un catéter fijo.
8. También debe evitarse la espuma en la muestra de sangre. A menudo es útil descartar los primeros 2 ml de sangre extraída.
9. La muestra debe ser recolectada en tubos citratados que contengan una solución acuosa de citrato trisódico dihidratado con una concentración de 0,105M–0,109M (c3,2%) para conservar la proporción 9:1 de sangre y citrato. Si el tubo contiene menos del 80% del volumen esperado, los resultados podrían

verse afectados. Ya no se recomienda emplear la concentración de mayor potencia de citrato trisódico al 3,8%.

10. La mezcla con la solución de citrato se hará de inmediato mediante inversiones suaves.
11. Si la muestra no puede procesarse dentro de las cuatro horas de extraída, el plasma pobre en plaquetas puede congelarse a -30° C y puede permanecer almacenado por algunas semanas, o hasta seis meses si se almacena a -70° C [3]. En general, no es adecuado el almacenamiento a -20° C.
12. Las muestras congeladas deben descongelarse rápidamente durante 4 o 5 minutos a 37° C para evitar la formación de crioprecipitados.

Preparación de plasma pobre en plaquetas (PPP)

1. El PPP se preparará siguiendo las guías estandarizadas [2].
2. El PPP se preparará mediante centrifugación de la muestra como mínimo a 1700 g, durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente (es decir, sin refrigerar).
3. El PPP puede mantenerse a temperatura ambiente (entre 20° y 25° C) antes de realizar las pruebas.
4. El plasma que se ha hemolizado durante la extracción y el procesamiento no debe ser analizado.

Detección del punto final

1. Muchos laboratorios ahora cuentan con algún tipo de equipo automatizado o semiautomatizado para análisis de la coagulación. La detección exacta del punto final de coagulación con la técnica manual requiere de considerable experiencia, particularmente si el tiempo de coagulación es prolongado o si la concentración de fibrinógeno es baja, y el coágulo es delgado y tenue.
2. En la prueba manual, el tubo debe inclinarse 3 veces cada 5 segundos con un ángulo aproximado de 90° durante la observación. El tubo se sumergirá en un baño de María a 37° C entre cada inclinación.

Pruebas de tamizaje

1. Para evaluar a pacientes en los que se sospecha que pueden padecer un trastorno de la coagulación puede emplearse la cuenta de plaquetas, TH, TP y TTPA [4].

CUADRO 3-1: INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE RASTREO

POSIBLE DIAGNÓSTICO	TP	TTPA*	TH	CONTEO PLAQUETARIO
Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Hemofilia A o B**	Normal	Prolongado*	Normal	Normal
EvW	Normal	Normal o prolongado*	Normal o prolongado	Normal o bajo
Deficiencia plaquetaria	Normal	Normal	Normal o prolongado	Normal o bajo

*Los resultados de la prueba de TTPA dependen en gran medida del método de laboratorio utilizado para el análisis.

**Puede repetirse el mismo patrón ante deficiencias de FXI, FXII, precalicreína o de cininógeno de alto peso molecular.

2. El tiempo de hemorragia carece de sensibilidad y especificidad, además de que tiene una tendencia a dar resultados erróneos. Es por ello que, de ser posible, es preferible recurrir a otras pruebas de la función plaquetaria como la agregometría plaquetaria [5,6].
3. Con base en los resultados de estas pruebas se puede hacer una caracterización parcial de la categoría del tipo de trastorno de la coagulación que servirá como referencia para los análisis subsecuentes (consulte el cuadro que aparece arriba).
4. Las pruebas de tamizaje podrían no detectar anomalías en pacientes con trastornos de la coagulación leves, así como ciertas deficiencias en la función plaquetaria, deficiencias de factor XIII u otras deficiencias poco comunes de la fibrinólisis, posiblemente relacionadas con una tendencia hemorrágica.
 - El monitoreo en el laboratorio de concentrados de factor de coagulación es posible mediante la medición de los niveles de factor de coagulación antes y después de la infusión.
 - Una respuesta menor a la esperada y/o una vida media más corta del factor de coagulación infundido puede ser un indicador precoz de la presencia de inhibidores.
 - Para probar la calidad del crioprecipitado:
 - Es útil verificar la concentración de FVIII presente en el crioprecipitado, como medida de control de calidad de este producto.

Estudios de corrección

1. Los estudios de corrección o de mezcla que utilizan pools de plasma normal (PPN) ayudan a definir si los tiempos de coagulación prolongados se deben a una deficiencia de factor o a la presencia de anticoagulantes o inhibidores en circulación. Los estudios de corrección con plasma deficiente en FVIII/FIX pueden servir para identificar la deficiencia específica, en caso de que no fuera posible realizar una determinación de factores.
2. Las pruebas fenotípicas carecen de sensibilidad y especificidad para la detección de portadoras. Algunas portadoras obligadas podrían presentar una relación normal FVIII:C/FvW:Ag. Las pruebas genotípicas constituyen un método más preciso de detección de portadoras, por lo que es el método recomendado.
3. Los ensayos de una etapa basados en el TTPA son las técnicas más comunes. Las siguientes son las principales características a tener en cuenta en la determinación de los factores:
 - El plasma deficiente en FVIII y FIX debe carecer totalmente de FVIII y FIX, respectivamente, es decir, contener < 1 UI/dl, y presentar valores normales de los otros factores de coagulación.
 - El plasma de referencia o calibración, ya sea de origen comercial o de preparación in situ, debe ser calibrado en unidades internacionales (es decir, conforme el estándar internacional apropiado de la OMS).
 - Para que el ensayo sea válido, se necesitan como mínimo 3 diluciones diferentes de plasma de referencia además de la muestra de prueba bajo análisis.

Determinación de factores

1. La determinación de factores es necesaria en los siguientes casos:
 - Para determinar el diagnóstico.
 - Para monitorear el tratamiento:

- El uso de una única dilución de la muestra de prueba disminuye en gran medida la precisión del ensayo y puede generar resultados completamente inexactos ante la presencia de ciertos inhibidores.
- Al analizar las muestras de prueba pertenecientes a individuos con hemofilia moderada o grave, puede ser necesario recurrir a otra curva de calibración o a una curva más amplia. No sirve ampliar la curva de calibración por extrapolación si no se analizan otras diluciones del plasma de calibración.
- Algunos casos de hemofilia A leve confirmada genéticamente muestran una actividad normal del FVIII en los ensayos de una etapa cuando se emplean a modo de diagnóstico, pero menor actividad en el ensayo por método cromogénico y el ensayo de coagulación de dos etapas. Sin embargo, también puede ocurrir lo contrario. Esto significa que hace falta más de un tipo de determinación del FVIII para detectar todas las formas de hemofilia A leve [7,8].

Pruebas de inhibidores

1. Se presume que existe la presencia de algún tipo de inhibidor cuando el TTPA es prolongado y no se corrige totalmente al mezclar el plasma del paciente con un pool de plasma normal (PPN).
 2. Los inhibidores funcionales más frecuentes de la hemostasia son los anticoagulantes lúpicos (AL), que no actúan directamente sobre un factor de coagulación específico por lo que deberían excluirse.
 3. Los resultados de la prueba de TTPA en las mezclas de plasma de prueba y plasma normal pueden ser difíciles de interpretar, en especial debido a que en la hemofilia adquirida puede haber, en una primera etapa, una corrección total del TTPA ante la presencia de un potente anticuerpo específico anti-FVIII.
 4. La mayoría de los inhibidores del FVIII que aparecen como consecuencia de la terapia de reemplazo en personas con hemofilia A, muestran un patrón característico: el TTPA de la mezcla del plasma de un paciente con un PPN es intermedio, es decir, se encuentra entre los TTPA de los dos materiales y se prolonga aun más cuando la mezcla se incuba a 37° C entre 1 y 2 horas.
5. Para confirmar que un inhibidor actúa contra un factor de coagulación específico es necesario hacer la prueba del inhibidor específico.
 6. **La modificación de Nijmegen a la prueba del inhibidor del FVIII ofrece mayor especificidad y sensibilidad que el ensayo de Bethesda original. (Nivel 1) [9,10]**
 7. Así es como se realiza:
 - Se mezcla PPN tamponado (que aporta FVIII) con el plasma de prueba y se incuba la mezcla a 37° C.
 - Después de dos horas, se mide el FVIII residual por comparación con el FVIII presente en una mezcla de control compuesta por PPN tamponado y plasma deficiente en FVIII, incubada junto a la mezcla de prueba.
 - El FVIII residual se convierte a unidades de inhibidor mediante un gráfico semilogarítmico del FVIII residual contra la convención para el inhibidor, que se elaborará sobre el presupuesto de que 100% residual = 0 UB/ml de inhibidor y que 50% residual = 1,0 UB/ml (esta última es la convención internacional establecida para definir la actividad de un inhibidor).
 - Cuando la actividad del FVIII residual es <25%, el plasma del paciente deberá someterse a una nueva prueba después de la dilución para evitar la subestimación de la potencia del inhibidor.
 - Se considera que el inhibidor tendrá relevancia clínica cuando su título es $\geq 0,6$ UB/ml [11].

Personal capacitado

1. Aun las pruebas de tamizaje de la coagulación más sencillas son complejas por naturaleza.
2. Los científicos o técnicos de laboratorio dedicados al campo de la coagulación deben tener un entendimiento profundo de las pruebas a fin de llegar a resultados precisos.
3. En algunos casos, puede ser beneficioso contratar a un científico o técnico de laboratorio que haya recibido capacitación adicional en un centro especializado.

3.2 Uso de equipos y reactivos adecuados

1. Los equipos y los reactivos son las herramientas de trabajo de cualquier laboratorio. Los siguientes son los requisitos necesarios para lograr exactitud en las pruebas de laboratorio.
8. Siempre que se observen buenas prácticas de laboratorio, pueden obtenerse buenos resultados utilizando equipos y tecnología básicos. Tales prácticas podrán ir adaptándose luego a tecnologías más automatizadas.

Equipo

1. Un baño de María a $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
2. Una buena fuente de luz cerca del baño de María a fin de poder detectar con exactitud la formación del coágulo.
3. Cronómetros.
4. Pipetas automatizadas (ya sean de volumen fijo o variable) capaces de dispensar 0,1 ml y 0,2 ml con exactitud y precisión.
5. Para las pruebas de coagulación, tubos de ensayo de cristal siliconizado limpios (7,5 cm \times 1,2 cm). Siempre que sea posible, se evitará la reutilización de todo tipo de consumibles de vidrio, a menos que pueda probarse que los resultados de los ensayos no se ven afectados por el proceso utilizado. No deben reutilizarse los recipientes plásticos que se hayan usado en los equipos de análisis de coagulación.
6. Actualmente existen cada vez más cantidad de coagulómetros automatizados o semiautomatizados. En muchos casos, estos equipos aportan las siguientes ventajas:
 - exactitud en la lectura del punto final;
 - mayor precisión en los resultados de las pruebas;
 - capacidad para realizar múltiples ensayos de coagulación;
 - reducción de errores de observación (el punto final de la reacción suele medirse de manera electromecánica o fotoeléctrica);
 - uso de cubetas de poliestireno (transparentes), en lugar de tubos de cristal.
7. Todo el equipo requiere mantenimiento a fin de conservarlo en buenas condiciones operativas.
 - Al comprar un equipo, deben tenerse en cuenta y reservar los recursos necesarios para su mantenimiento periódico a cargo de un técnico especializado.
 - Se deberá verificar que las pipetas dispensen volúmenes exactos de muestras o de reactivos.
 - Se deberá revisar periódicamente la temperatura de los baños de María, refrigeradores y congeladores.

Elección de un coagulómetro

1. Muchos analizadores de coagulación se presentan como un juego que incluye el instrumento y los reactivos, y ambos componentes pueden influir sobre los resultados obtenidos. Es necesario tener en cuenta este dato a la hora de evaluar y elegir un sistema. Otros puntos a tener en cuenta son:
 - los tipos de pruebas que se realizarán, y la carga y el flujo de trabajo que tiene el laboratorio;
 - los requisitos operativos (alimentación eléctrica, espacio, humedad, temperatura, etc.);
 - los requisitos de servicio técnico y la respuesta ante averías;
 - rendimiento y variedad de pruebas que puede llevar a cabo;
 - costos;
 - posibilidad de combinar con reactivos de otros fabricantes;
 - posibilidad de programación de las pruebas por parte del usuario;
 - comparabilidad entre los resultados de un analizador primario y otro método de respaldo;
 - compatibilidad con los tubos de las muestras de sangre y envases de almacenamiento de plasma que se utilicen en el lugar;
 - evaluación de seguridad (mecánica, eléctrica, microbiológica);
 - disponibilidad de la capacitación correspondiente.
2. Es necesario contar con información sobre las características de rendimiento del sistema que puede obtenerse de diversas fuentes como el material publicado y las especificaciones del fabricante, pero también puede requerirse hacer algún tipo de evaluación local. Entre los aspectos a tener en cuenta, pueden mencionarse:
 - la precisión de las pruebas, con un resultado esperado de $<3\%$ de coeficiente de variación (CV) para las pruebas de tamizaje y de $<5\%$ para la determinación de factor;
 - contaminación de arrastre (carry-over);
 - sustancias interferentes;

- estabilidad de los reactivos en la platina del analizador;
 - comparabilidad con otros métodos;
 - identificación de la muestra;
 - manejo de datos, programa (software) y control de calidad;
 - capacitación necesaria;
 - confiabilidad del equipo.
3. Existen varias publicaciones con guías y recomendaciones sobre las evaluaciones de los diferentes analizadores de coagulación [12,13].

Reactivos

1. Es una buena práctica garantizar la continuidad del abastecimiento de los reactivos elegidos, prestando atención a la continuidad de los lotes y a que su vida útil sea larga. Esto puede lograrse solicitando al proveedor que, de ser posible, reserve el mismo lote para el laboratorio.

2. No se recomienda cambiar de proveedor de material, a menos que haya problemas de abastecimiento o que haya habido resultados dudosos. Las diferentes marcas pueden tener sensibilidades totalmente diferentes y no deben utilizarse al mismo tiempo.
3. Deben seguirse las instrucciones proporcionadas con el reactivo.
4. Debe prestarse atención especial a la estabilidad del reactivo. Una vez que el reactivo se reconstituya o descongele para su uso diario, podría deteriorarse con el tiempo en función de las condiciones de almacenamiento y uso.
5. Una vez que se han elegido la prueba y los reactivos adecuados, idealmente deberían definirse los rangos normales o de referencia contemplando las condiciones de uso en el lugar.

3.3 Garantía de calidad

1. *Garantía de calidad* (GC) es un término general usado para describir todas las medidas que se toman a fin de garantizar la confiabilidad de las pruebas e informes de laboratorio.
2. La garantía de calidad cubre todos los aspectos del proceso de diagnóstico, desde la toma, separación y análisis de muestras, y el control interno de la calidad (CIC), hasta el informe de los resultados y la garantía de que éste llegue a manos del especialista.
3. Es responsabilidad de todas las personas involucradas asegurarse de que los procedimientos se sigan como es debido.

Control interno de calidad (CIC)

1. El CIC se utiliza para determinar si ciertas técnicas y procedimientos se llevan a cabo de manera coherente en un período determinado.
2. Las medidas relacionadas con el CIC tienen por objeto garantizar que los resultados de las investigaciones del laboratorio sean lo suficientemente confiables para contribuir en la toma de decisiones clínicas, monitorear el tratamiento y diagnosticar anormalidades hemostáticas.

3. El CIC resulta particularmente útil para establecer el nivel de precisión de una técnica en particular.
4. Periódicamente se deberán incluir muestras de plasma normal y anormal en las pruebas de tamizaje de hemostasia. Como mínimo, se incluirá un nivel de muestra de CIC en todos los lotes de pruebas.

Valoración externa de la calidad

1. Se recomienda enfáticamente que los laboratorios participen de un esquema de valoración externa de la calidad (VEC o EQAS, por sus siglas en inglés) que audite la eficacia de los sistemas internos de garantía de calidad (CIC) en uso.
2. La valoración externa de la calidad ayuda a identificar el nivel de concordancia entre los resultados de un laboratorio y los obtenidos por otros laboratorios.
3. La participación en este tipo de esquemas ayuda a generar confianza entre un laboratorio y sus usuarios.
4. El Esquema Internacional de Valoración Externa de la Calidad (IEQAS, por su sigla en inglés) de la FMH está diseñado específicamente para satisfacer las necesidades de los centros de tratamiento de hemofilia de todo el mundo. El esquema incluye análisis relevantes para el diagnóstico y tratamiento de hemorragias.

Es un plan que se implementa junto con el Esquema Nacional de Valoración Externa de la Calidad para la Coagulación de la Sangre del Reino Unido, con sede en Sheffield, Reino Unido. Para obtener más información, puede ponerse en contacto con la FMH [14].

5. También existen otros planes nacionales e internacionales de valoración de la calidad.
6. Para que un laboratorio logre un alto nivel de confiabilidad en sus análisis y para obtener buenos resultados en el esquema de valoración de la calidad externa (EQAS), debe tener acceso a los reactivos y técnicas y a un número adecuado de personal debidamente capacitado.

Referencias

1. Kitchen S, McCraw A, Echenagucia M. *Diagnosis of Hemophilia and Other Bleeding Disorders: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Montreal: World Federation of Hemophilia, 2010.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays: Approved Guideline—Fifth edition*. CLSI H21-A5, Wayne PA, Clinical and Laboratory Standards Institute 2008.
3. Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, et al. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001;12(4):229-36.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. *One Stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test: Approved Guideline—Second edition*. CLSI H47-A2 Wayne PA, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
5. Bick RL. Laboratory evaluation of platelet dysfunction. *Clin Lab Med* 1995 Mar;15(1):1-38.
6. Rodgers RP, Levin J. Bleeding time revisited. *Blood* 1992 May 1;79(9):2495-7.
7. Duncan EM, Duncan BM, Tunbridge LJ, et al. Familial discrepancy between one stage and 2 stage factor VIII assay methods in a subgroup of patients with haemophilia A. *Br J Haematol* 1994;87(4):846-8.
8. Oldenburg J, Pavlova A. Discrepancy between one-stage and chromogenic FVIII activity assay results can lead to misdiagnosis of haemophilia A phenotype. *Haemostaseologie* 2010;30(4):207-11.
9. Meijer P, Verbruggen B. The between-laboratory variation of factor VIII inhibitor testing: the experience of the external quality assessment program of the ECAT foundation. *Semin Thromb Hemost* 2009;35(8):786-93.
10. Verbruggen B, van Heerde WL, Laros-van Gorkom BA. Improvements in factor VIII inhibitor detection: From Bethesda to Nijmegen. *Semin Thromb Hemost* 2009;35(8):752-9.
11. 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 Haemos* 1995; 73:247-251.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protocol for the Evaluation, Validation, and Implementation of Coagulometers: Approved Guideline*. CLSI document H57-A, Vol.28 No.4. Wayne PA, Clinical and Laboratory Standards Institute 2008c.
13. Gardiner C, Kitchen S, Dauer RJ, et al. Recommendations for evaluation of coagulation analyzers. *Lab Hematol* 2006;12(1):32-8.
14. Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, et al. Laboratory Performance in the World Federation of Hemophilia EQA programme, 2003-2008. *Haemophilia* 2009;15(1):571-7.