
TEMAS TRATADOS

- ✓ Extracción de sangre
 - ✓ Plasma pobre en plaquetas (PPP)
 - ✓ Sustancias que interfieren
 - ✓ Almacenamiento
 - ✓ Descongelación
-

Antes de la extracción de sangre, hay algunos factores que deben tenerse en cuenta. No se requiere ayuno antes de la extracción de sangre para la mayoría de las investigaciones de los trastornos de la coagulación y trombóticos. Sin embargo, una excepción es la prueba de homocisteína que sí requiere ayuno. El ejercicio (Venema et al, 2017) y el estrés (Austin et al, 2012) pueden causar aumentos temporales en el FVIII y el FVW. El ejercicio también puede afectar a la prueba del dímero D (Huskens D et al, 2016). La inflamación puede afectar a los factores de coagulación y otros parámetros hemostáticos (Hardy et al, 2024). El embarazo afecta a una variedad de parámetros, incluidos el FVIII (Castaman, 2013), el FVW (Delbruck et al, 2019) y el dímero D (Blomback et al, 2007). Numerosos productos farmacéuticos y anticoagulantes pueden interferir en las pruebas de hemostasia, por lo que la información sobre los tratamientos que reciben los pacientes es esencial para el laboratorio (Gosselin et al, 2019).

Extracción de sangre: Existen varias guías que describen las mejores prácticas para la recolección y el procesamiento de muestras para pruebas hemostáticas (CLSI, 2024; CLSI, 2017). La extracción de sangre debe utilizar un sistema de recolección por vacío o una jeringa de plástico con una aguja de calibre 19 a 21 (adultos) o una aguja de calibre 22 a 23 (niños) (Srivastava et al, 2021). Los tipos de tubos no son todos iguales, por lo tanto, los centros deben utilizar un solo tipo de tubo y generar intervalos de referencia basados en estos tubos (Bowen et al, 2016). Incluso dentro de un tipo de tubo de recolección, la constitución es importante; los tubos de plástico y vidrio no son intercambiables (Fiebig et al, 2005). Los tubos de extracción de sangre deben contener de 0,105 a 0,109 M (3,2%) de citrato trisódico (CLSI, 2024). La secuencia de extracción es importante para prevenir la contaminación cruzada con EDTA (Lima-Oliveira et al, 2015) o heparina (Keppel et al, 2019); por lo tanto, se deben seguir las mejores prácticas en la extracción de muestras (OMS, 2010; Simundic et al, 2018). Las muestras requieren anticoagulación inmediata después de la venopunción, con un llenado de un volumen objetivo mínimo del 80% (Kitchen et al, 2021) para lograr una relación sangre:anticoagulante de 9:1. La inversión suave (de 3 a 5 veces) de los tubos con sangre después de la flebotomía permite una mezcla adecuada de las muestras. Se producen cambios hemostáticos no deseados en los tubos con llenado insuficiente (Lippi et al, 2012). Las muestras con niveles de hematocrito >55% requieren una solución de citrato ajustada para compensar el alto volumen de células aglomeradas y obtener la proporción correcta de 9:1. Si no se mantiene esta relación, se pueden observar cambios significativos en el TP, el TTPA y la monitorización de anticoagulantes (INR) (Marlar et al, 2006). A continuación, se muestra la fórmula recomendada para reajustar los niveles de citrato (Kitchen et al, 2021). Las muestras deben etiquetarse adecuadamente inmediatamente antes o después de la flebotomía, siguiendo las políticas regulatorias o institucionales locales.

$$C = (1,85 \times 10^{-3})(100 - \text{HCT})(V)$$

C = volumen de citrato en mililitros (ml) que debe añadirse a un volumen de sangre (V)

HCT = es el hematocrito del paciente

V = es el volumen de sangre añadido en ml

Y $1,85 \times 10^{-3}$ es constante

Un ejemplo en el que se utiliza HCT del 70% y 4,5 ml de sangre recolectada antes de la adición del anti-coagulante, da el siguiente cálculo, es decir, se mezclan 0,25 ml de citrato con 4,5 ml de sangre.

$$(1.85 \times 10^{-3})(100 - \text{HCT})(V) = C$$

$$(1,85 \times 0,001)(100 - 70)(4,5 \text{ ml}) = 0,25 \text{ ml de citrato}$$

Plasma pobre en plaquetas (PPP): La mayoría de las pruebas de coagulación se pueden realizar con PPP después de la centrifugación a $> 1700 \text{ g}$ durante 10 minutos (CLSI, 2024; Kitchen et al, 2021). Deben evitarse las centrifugas refrigeradas, ya que la activación en frío del factor plaquetario 4 puede afectar el control de la heparina, las pruebas de función plaquetaria, las pruebas de FVIII y las pruebas del FVW (Favaloro, 2004). Algunas pruebas, como la heparina no fraccionada (HNF) y el anticoagulante lúpico, requieren plasma libre de plaquetas de doble centrifugado ($<10 \times 10^9$) si las pruebas se realizan en muestras previamente congeladas. En este caso, el plasma se extrae del tubo de sangre centrifugado a un recipiente secundario adecuado y se vuelve a centrifugar con las subalícuotas extraídas para la congelación. Las pruebas de función plaquetaria requieren de plasma rico en plaquetas (PRP), preparado después de la centrifugación a 170 g durante 15 minutos o 250 g durante 10 minutos (Gomes et al, 2021).

Sustancias que interfieren: Las muestras hemolizadas no deben analizarse, ya que se pueden observar cambios significativos, particularmente en el TTPA (Woolley et al, 2016; Lippi et al, 2013), excepto cuando la hemólisis es intravascular (Arachchilage et al, 2014). Los ensayos de rutina generalmente no se ven afectados por la ictericia (Woolley et al, 2016) y la lipemia puede solucionarse mediante ultracentrifugación (Lippi et al, 2013, Dimeski y Jones, 2011).

Almacenamiento: Las pruebas de muestras son sensibles al tiempo. El procesamiento y las pruebas de la muestra deben realizarse dentro de la ventana de estabilidad del ensayo después de la venopunción, y las muestras deben almacenarse a temperatura ambiente en el tiempo intermedio. Las Guías recomiendan realizar pruebas en un plazo de 4 horas (CLSI, 2024) para todas las muestras, a menos que los datos locales confirmen una estabilidad prolongada para una combinación específica de tubo/ensayo (Kitchen et al, 2021; Linskens et al, 2018). El almacenamiento a una temperatura más alta puede conducir a la pérdida de factores de coagulación, como el FVIII (Omidkhoda et al, 2011). La liberación del factor plaquetario 4 puede provocar la neutralización de la heparina no fraccionada en las muestras, por lo que estos tubos deben centrifugarse dentro de 1 hora y analizarse en 4 horas (Baker et al, 2020). Si el plasma se almacena para pruebas posteriores, las condiciones de almacenamiento pueden afectar a algunos ensayos. El plasma puede almacenarse aceptablemente a $-24 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 meses. Sin embargo, para un almacenamiento a largo plazo (aproximadamente 6 meses), las muestras deben almacenarse a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ (Woodhams et al, 2001; Fenclova et al, 2023).

Descongelación: Las muestras congeladas para el análisis deben descongelarse en un baño maría a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 3 a 5 minutos e invertirse varias veces antes del ensayo para homogeneizar la muestra (Jo et al, 2020). Debe evitarse volver a congelar el plasma una vez descongelado para realizar más pruebas.

Referencias

Arachchilage DJ, Flatten S, Hickey K, Chu J, Pickering M, Sommerville P, MacCallum P, Breen K. Guías sobre la investigación y el tratamiento del síndrome antifosfolípido. *BrJ Haematol* 2024; 205(3): 855-880.

Austin AW, Wirtz PH, Patterson SM, Stutz M, von Kanel R. Alteraciones inducidas por el estrés en la coagulación: evaluación de una nueva técnica de corrección de la hemoconcentración. *Psychosom Med* 2012; 74(3): 288-295.

Baker P, Platton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guías sobre los aspectos de laboratorio de los ensayos utilizados en la hemostasia y la trombosis. *BrJ Haematol* 2020; 191(3): 347-362.

Blomback M, Konkle BA, Manco-Johnson MJ, Bremme K, Hellgren M, Kaaja R. Condiciones preanalíticas que afectan las pruebas de coagulación, incluido el estado hormonal y la terapia. *J Thromb Haemost* 2007; 5(4): 855-858.

Bowen RA, Adcock DM. Tubos de recolección de sangre como dispositivos médicos: el potencial para afectar los ensayos y los procesos de verificación y validación propuestos para el laboratorio clínico. *Clin Biochem* 2016; 49(18): 1321-1330.

Castaman G. Cambios en el factor de von Willebrand durante el embarazo en mujeres con y sin enfermedad de von Willebrand. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013; 5(1): e2013052.

Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio. Recolección, transporte y procesamiento de muestras de sangre para ensayos de coagulación basados en plasma, 6ª edición. Norma CLSI H21.2024. https://clsi.org/media/bp2jr13r/h21ed6e_sample.pdf.

Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio. Colección de muestras diagnósticas de sangre venosa, 7ª edición. Norma CLSI GP41.2017. https://clsi.org/media/1372/gp41ed7_sample.pdf.

Delbrück C, Miesbach W. Evolución de la actividad del factor de von Willebrand y del factor viii en pacientes con enfermedad de von Willebrand durante el embarazo. *Acta Haematol* 2019; 142(2): 71-78.

Dimeski G, Jones BW. Muestras lipémicas: Proceso eficaz para la reducción de lípidos mediante centrifugación de alta velocidad en comparación con la ultracentrifugación. *Biochem Med (Zagreb)* 2011; 21(1): 86-92.

Favaloro EJ, Soltani S, McDonald J. Posible diagnóstico erróneo de laboratorio de hemofilia y trastorno de von Willebrand debido a la activación en frío de muestras de sangre para pruebas. *Am J Clin Pathol* 2004; 122(5): 686-692.

Fenclova T, Marecek F, Hrachovinova I. Efectos de las condiciones de almacenamiento congelado y la tasa de congelación en la estabilidad de las proteínas de coagulación en el plasma humano. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 2023; 34(6): 377-384.

Fiebig EW, Ezzell JE, Ng VL. Diferencias clínicamente relevantes en el tiempo de protrombina y los valores de INR relacionados con la recolección de muestras de sangre en tubos de plástico frente a tubos de vidrio. *Am J Clin Pathol* 2005; 124(6): 902-909.

Gomez K, Anderson J, Baker P, Biss T, Jennings I, Lowe G, Platton S. Diagnóstico clínico y de laboratorio de los trastornos plaquetarios hereditarios en adultos y niños: una guía de la Sociedad Británica de Hematología. *BrJ Haematol* 2021; 195(1): 46-72.

Gosselin RC, Marlar RA. Variables preanalíticas en las pruebas de coagulación: Preparando el escenario para obtener resultados precisos. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45(5): 433-448.

Hardy M, Catry E, Pouplard M, Lecompte T, Mullier F. ¿Son fiables las pruebas de anticoagulación lúpica con veneno de víbora de Russell diluido en presencia de inflamación? *Res Pract Thromb Haemost* 2024; 8(6): 102536.

Huskens D, Roest M, Remijn JA, Konings J, Kremers RM, Bloemen S, Schurgers E, Selmececi A, Kelchtermans H, van Meel R, Meex SJ, Kleinegris MC, de Groot PG, Urbanus RT, Ninivaggi M, de Laat B. El ejercicio extenuante induce un estado hemostático hiperreactivo y reequilibrado que es más pronunciado en los hombres. *Thromb Haemost* 2016 Jun 2; 115(6): 1109-19.

Keppel MH, Auer S, Lippi G, von Meyer A, Comes M, Felder TK, Oberkofler H, Mrazek C, Haschke-Becher E, Cadamuro J. Arrastre de heparina y aditivo de citrato durante la extracción de sangre. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(12): 1888-1896.

- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. Recomendaciones del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICHS) para la recolección de muestras de sangre para pruebas de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. Recomendaciones del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICHS) para el procesamiento de muestras de sangre para pruebas de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.
- Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Danese E, Favalaro EJ, Guidi GC, Lippi G. Contaminación sanguínea por citrato de sodio por ácido K2-etilendiaminotetraacético (EDTA): Impacto en las pruebas de coagulación rutinarias. *Int J Lab Hematol* 2015; 37(3): 403-409.
- Linskens EA, Devreese KMJ. Estabilidad preanalítica de los parámetros de coagulación en plasma almacenado a temperatura ambiente. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(3): 292-303.
- Lippi G, Plebani M, Favalaro EJ. Interferencia en las pruebas de coagulación: concéntrese en la hemólisis espuria, la ictericia y la lipemia. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(3): 258-266.
- Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favalaro EJ. Estándares de calidad para la recogida de muestras en pruebas de coagulación. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38(6): 565-575.
- Marlar RA, Potts RM, Marlar AA. Efecto sobre los valores de las pruebas de coagulación rutinarias y especiales del ajuste del anticoagulante citratado en pacientes con valores altos de hematocrito. *Am J Clin Pathol* 2006; 126(3): 400-405.
- Omidkhoda A, Tabatabaei MR, Atarodi K, Karim! K, Froushani AR, Pourfathollah AA. Un estudio comparativo de los efectos de la temperatura, el tiempo y el tipo de ensayo del factor VIII sobre la actividad del factor VIII en el crioprecipitado en Irán. *Transfus de sangre* 2011; 9(4): 394-399.
- Simundic AM, Bolenius K, Cadamuro J, Church S, Comes MP, van Dongen-Lases EC et al. Recomendación conjunta EFLM-COLABIOCLI para la toma de muestras de sangre venosa. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(12): 2015-2038.
- Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. Guías de la FMH para el tratamiento de la hemofilia, 3.ª edición. *Hemofilia* 2020; 26 Supl 6: 1-158.
- Venema CL, Schutgens REG, Fischer K. Mecanismos fisiopatológicos de la liberación endógena de FVIII después de un ejercicio extenuante en la hemofilia no grave: una revisión. *Thromb Haemost* 2017; 117(12): 2237-2242.
- Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Collesse G, Gourmelin Y. Estabilidad de las proteínas de coagulación en plasma congelado. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 2001; 12(4): 229-236.
- Woolley A, Golmard JL, Kitchen S. Efectos de la hemólisis, la ictericia y la lipemia en las pruebas de coagulación realizadas en el analizador Stago STA-Compact-Max. *Int J Lab Hematol* 2016; 38(4): 375-388.
- Organización Mundial de la Salud. Guías de la OMS sobre la extracción de sangre: Mejores prácticas en flebotomía. 2010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138650/>.