
TEMAS TRATADOS

- ✓ Cuándo utilizar la técnica manual de tubo basculante
 - ✓ Cómo realizar la técnica manual de tubo basculante
 - ✓ TP por la técnica manual de tubo basculante
 - ✓ TTPA por la técnica manual de tubo basculante
 - ✓ Tiempo de trombina y fibrinógeno por la técnica manual de tubo basculante
 - ✓ Prueba de fibrinógeno derivado de TP
-

El uso de coagulómetros para las pruebas de coagulación tiene sus ventajas, como la velocidad de análisis/rendimiento y la consistencia del análisis, que ofrecen resultados precisos y exactos de manera oportuna. Aunque hay muchos instrumentos diferentes para las pruebas de coagulación disponibles y en uso en todo el mundo, la técnica manual del tubo basculante todavía se puede emplear con éxito para determinar el tiempo de coagulación. Esto se puede hacer para todas las muestras si no se dispone de un método automatizado adecuado, o para un subgrupo de muestras, ya sea porque el análisis automatizado no genera resultados en muestras con características específicas, lo que provoca la incompatibilidad de la muestra con el instrumento en uso, o porque el método del coagulómetro no está disponible temporalmente. Los métodos de tubo basculante son adecuados como alternativas a los métodos basados en coágulos e incluso los laboratorios integrales de los centros de hemofilia deben tener disponible el método manual de tubo basculante para aquellas pocas muestras en las que el análisis automatizado falla, pero donde los resultados son realmente necesarios para el manejo seguro del paciente. Este puede ser el caso en presencia de concentraciones de lípidos plasmáticos muy elevadas, o cuando el patrón de formación de coágulos en la muestra difiere marcadamente de las muestras normales, particularmente cuando la polimerización de fibrinógeno a fibrina es marcadamente anormal. Debido a las muchas variables y posibles fuentes de contaminación asociadas con las técnicas manuales, estas pueden requerir pruebas duplicadas. Si el CV entre días de los resultados de CCI es del >5%, entonces se debe considerar la duplicación de pruebas. Cuando las pruebas se realizan por duplicado, los dos resultados deben estar dentro de +/- 5% de la media con la práctica.

Cuándo usar la técnica manual de tubo basculante: Luego, el método manual de tubo basculante se puede usar con éxito para la determinación de TP, TTPA, tiempo de trombina y fibrinógeno, así como ensayos de factores de coagulación basados en TP y TTPA.

Cómo realizar la técnica manual de tubo basculante: El método de realizar la técnica de tubo basculante para las pruebas de coagulación se ha armonizado recientemente en relación con las pruebas de TP como parte de la calibración de tromboplastinas de referencia para el sistema internacional de proporción normalizada (INR) utilizado para monitorear los medicamentos antagonistas de la vitamina K (Van den Besselaar et al, 2020). Este método armonizado ha mejorado la concordancia entre los resultados de TP de tubo basculante cuando las pruebas son realizadas por diferentes operadores y en diferentes centros. Este método se puede utilizar para la prueba de tubo basculante para TTPA, tiempo de trombina y análisis de fibrinógeno, además de la prueba de TP.

Materiales necesarios:

- 1) Baño maría para mantener los tubos de ensayo a una temperatura constante de 37 °C. Las dimensiones cercanas a 40 x 30 x 20 cm son convenientes. El agua del baño maría debe circular continuamente por una bomba si es posible. La temperatura debe ser de 37 °C (límites de tolerancia: $37 \pm 0,5$ °C). La temperatura debe controlarse con un termómetro calibrado.
- 2) Se puede utilizar una fuente de luz, como una lámpara articulada, montada a 20 cm por encima del nivel del agua para iluminar el tubo de ensayo durante la inclinación, lo que facilita la detección de coágulos en el punto final por parte del operador. Se prefiere el LED como fuente de luz a las bombillas que generan calor, ya que puede elevar la temperatura de los tubos de ensayo que se mantienen cerca de la fuente de luz.
- 3) Los tubos de ensayo deben ser tubos de vidrio no siliconados, sin haber sido previamente usados. En el trabajo se utilizaron tubos de cultivo desechables (número de catálogo 73500-1275, Kimble Chase Life Science and Research Products LLC, Vineland, Nueva Jersey) con dimensiones de 75 x 12 mm y espesor de pared de 0,8 mm para armonizar las pruebas de tubos basculantes TP (van den Besselaar et al, 2020), pero también se pueden utilizar tubos de 75 x 10 mm. Los tubos de ensayo deben estar hechos de vidrio de borosilicato. Los tubos de ensayo deben desecharse después de su uso y no lavarse para volver a utilizarlos. Se pueden utilizar con éxito diferentes fuentes de tubos de ensayo de vidrio, pero pueden influir en los tiempos de coagulación obtenidos, especialmente en pruebas de cribado como el TTPA. Si se cambia la fuente (fabricante o composición) de los tubos de ensayo, se debe considerar la posibilidad de que los resultados se vean afectados. Esto podría evaluarse comparando un pequeño número de pruebas, como el TTAP, con los dos tipos de tubo. Si existen diferencias sistemáticas, se debe establecer un nuevo rango normal.

Técnica:

- La temperatura de la habitación en la que se instala el equipo y donde se va a realizar la técnica debe mantenerse a 20–22°C.
- Antes de comenzar las pruebas manuales de TP, TTPA, TT o fibrinógeno en el baño maría, se debe verificar la temperatura y posteriormente registrarla.
- Los tubos de ensayo vacíos deben mantenerse en posición vertical en una gradilla en el baño maría a 37 °C durante al menos 4 minutos a una profundidad de 3,5 cm antes de añadir los reactivos y el plasma.

TP por la técnica manual de tubo basculante:

- Para la prueba de TP, añadir 200 µl del reactivo de tromboplastina/calcio e incubar durante 2 min.
- A continuación, pipetee 100 µl de plasma no precalentado, dispensando desde una altura de 1 cm por encima del nivel de tromboplastina, con la punta apoyada en la pared del tubo de ensayo, e inmediatamente ponga en marcha el cronómetro con la otra mano.
- Agite el tubo suavemente para mezclar el contenido, con el tubo sumergido en el agua.
- Coloque el tubo en la rejilla en el baño maría.
- Coloque la pipeta.
- El tubo de ensayo debe mantenerse manualmente en el agua, con el agua cubriendo los 5 cm inferiores del tubo (Figura 1).
- La titulación manual del tubo debe comenzar 7 segundos después de poner en marcha el cronómetro.
- El tubo debe inclinarse en un ángulo de casi 90° sacando el tubo del agua durante 2 segundos y volviéndolo a meter en el agua durante 1 segundo (Figura 1). Tenga en cuenta que inclinar el tubo 90° o más generalmente hará que la mezcla de reacción se derrame fuera del tubo.
- El tubo no debe estar inmóvil durante este ciclo, sino inclinado continuamente con la mano del operador apoyada en el costado del baño maría.

- Este ciclo se repite hasta que se forma el coágulo.
- En posición horizontal, el tubo se mantiene a no más de 10 cm y no menos de 2 cm por encima del nivel del agua (Figura 1).
- Antes de que la mezcla se coagule, el operador observa que la mezcla fluye desde el fondo hasta tres cuartas partes de la longitud del tubo en posición casi horizontal y de vuelta al fondo.
- Cuando comienza la coagulación, la velocidad del flujo se reduce.
- Cuando se detiene el flujo, el operador detiene el temporizador y registra el tiempo de coagulación en segundos con un decimal.

El operador que realiza la técnica manual de tubo basculante levanta el tubo de ensayo regularmente fuera del agua. Sacar el tubo de ensayo del agua provocará una caída de temperatura de la mezcla de reacción. Sumergir el tubo de nuevo en el agua dará como resultado un aumento de temperatura. La caída media de temperatura observada en la técnica manual de tubo basculante utilizando el método descrito anteriormente se limita a 0,4 °C (van den Besselaar et al, 2020).

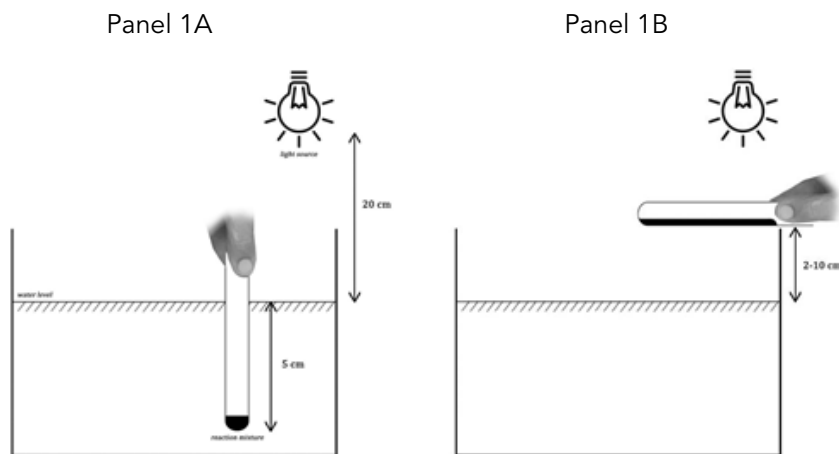


Figura 1. Representación esquemática de la técnica manual de tubo basculante. Panel 1A: el tubo de ensayo está en posición vertical en el baño maría. Panel 1B: el tubo de ensayo está en posición horizontal fuera del baño maría. La mano del operador descansa en el borde del baño maría. Debido a la variación en el tamaño de las manos de los operadores, la distancia del tubo en posición horizontal a la superficie del agua varía entre 2 y 10 cm. Las dimensiones de la imagen no están a escala. (Reproducido con el amable permiso de Elsevier Publishing, Ámsterdam, Países Bajos, de: Van den Besselaar et al. J Thromb Haemost. 2020; 18:1986-1994.)

El método armonizado anterior se desarrolló en dos talleres húmedos que evaluaron las pruebas de TP por hasta siete operadores de tres centros, que identificaron una serie de variables en la técnica (van den Besselaar et al, 2020). En particular, los talleres confirmaron que la dispensación del componente final de la mezcla de reacción para iniciar la coagulación en la parte superior del tubo de ensayo se asociaba con tiempos de coagulación más largos que la dispensación cerca de la superficie de la mezcla de reacción más abajo en el tubo. Utilizando el método armonizado descrito, el CV entre operadores de Ts en los mismos plasmas de prueba fue del 3% para un TP normal y del 1,4% para un TP prolongado.

TTPA por la técnica manual de tubo basculante:

- Añadir 100 µl de reactivo TTPA al tubo e incubar durante 2 min.
- A continuación, pipetee 100 µl de plasma no precalentado, dispensando desde una altura de 1 cm por encima del nivel del reactivo TTPA, con la punta apoyada en la pared del tubo de ensayo e inmediatamente ponga en marcha un cronómetro con la otra mano.
- Agite el tubo suavemente para mezclar el contenido, con el tubo sumergido en el agua.
- Coloque el tubo en la rejilla en el baño maría.

- Después del tiempo de activación recomendado por el fabricante del reactivo TTPA (normalmente es de 3 minutos, pero puede ser de 5 minutos para otros), añadir 100 µl de cloruro de calcio precalentado a 37 °C en un tubo separado en el baño maría, dispensando desde una altura de 1 cm por encima del nivel de la mezcla de reacción, con la punta apoyada contra la pared del tubo de ensayo, e inmediatamente inicie un nuevo cronómetro con la otra mano.
- Agite el tubo suavemente para mezclar el contenido, con el tubo sumergido en el agua.
- Coloque el tubo en la rejilla en el baño maría.
- Coloque la pipeta.
- El tubo de ensayo debe mantenerse manualmente en el agua, con el agua cubriendo los 5 cm inferiores del tubo (Figura 1).
- La titulación manual del tubo debe comenzar 15 segundos después de poner en marcha el cronómetro.
- El tubo debe inclinarse en un ángulo de casi 90°, sacando el tubo del agua durante 2 segundos y volviéndolo a meter en el agua durante 1 segundo (Figura 1). Tenga en cuenta que inclinar a 90° o más generalmente hará que la mezcla de reacción se derrame fuera del tubo.
- El tubo no debe estar inmóvil durante este ciclo, sino inclinado continuamente con la mano del operador apoyada en el costado del baño maría.
- Este ciclo se repite hasta que se forma el coágulo.
- En posición horizontal, el tubo se mantiene a no más de 10 cm y no menos de 2 cm por encima del nivel del agua (Figura 1).
- Antes de que la mezcla se coagule, el operador observa que la mezcla fluye desde el fondo hasta tres cuartas partes de la longitud del tubo en posición casi horizontal y de regreso al fondo.
- Cuando comienza la coagulación, la velocidad del flujo se reduce.
- Cuando se detiene el flujo, el operador detiene el temporizador y registra el tiempo de coagulación en segundos con un decimal.

Tiempo de trombina y fibrinógeno por la técnica manual de tubo basculante: Los métodos manuales de tubo basculante deben utilizar las proporciones de reactivos y plasma o diluciones plasmáticas recomendadas por el fabricante del reactivo y seguir los principios de los métodos descritos anteriormente para TP/TTPA.

Muestras con lipidemia: Muchos coagulómetros en uso actual que utilizan puntos finales fotoópticos para el análisis, son muy tolerantes a los niveles altos de lípidos en las muestras. Sin embargo, ocasionalmente las muestras pueden tener un nivel tan alto de lípidos que el analizador no puede detectar la formación de coágulos. Dichas muestras se pueden analizar manualmente y, por lo general, producen un coágulo sólido que se puede observar visualmente para el tiempo de TP, TTPA y trombina. Puede ser difícil observar la formación de coágulos durante el análisis de Clauss de fibrinógeno de dichas muestras. Si ese es el caso, otra opción es someter las muestras a centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, si está disponible (orientación del ICSH; Kitchen et al, 2021). Después de esta ultracentrifugación, el lípido se sedimenta y la muestra se puede analizar en un coagulómetro automatizado si está disponible, o mediante la técnica manual de tubo basculante para TP, TTPA, tiempo de trombina o fibrinógeno.

Muestras con anomalías del fibrinógeno: La formación de coágulos puede alterarse en presencia de algunas anomalías del fibrinógeno. Por ejemplo, el fibrinógeno Longmont se asocia con un coágulo débil y translúcido durante el ensayo de fibrinógeno de Clauss. Es posible que los sistemas fotoópticos que monitorean la luz dispersa a medida que se forma el coágulo (a diferencia del monitoreo de luz transmitida) no puedan detectar el punto final. Dichas muestras se pueden analizar utilizando el método de tubo inclinable, pero el operador debe ser consciente de que la formación de coágulos puede ser difícil de discernir visualmente. Para algunas muestras de disfibrinogenemia en las que falla el análisis automatizado, la técnica manual debe realizarse con un escrutinio muy cuidadoso del proceso de coagulación, ya que

los coágulos pueden ser frágiles y fácilmente interrumpidos por la mezcla/inclinación adicional después de que se haya formado el coágulo inicial.

Control de calidad: El material de control de calidad, como se describe en otra parte de este manual para TP, TTPA, tiempo de trombina y fibrinógeno, es adecuado para su uso con métodos de prueba manuales. Es aceptable probar un solo nivel de CCI, donde la técnica manual se reserva para muestras ocasionales que fallan el análisis automatizado. Se debe disponer de dos niveles y probarlos de acuerdo con los criterios descritos en otras partes de este manual, donde las pruebas manuales son el procedimiento analítico principal en el laboratorio.

El rango de resultados de CCI obtenidos por un pequeño grupo de diferentes operadores experimentados en la técnica de tubo basculante manual debe ser típicamente el siguiente:

Media de +/-1 segundo para un control de calidad con un TP medio en el rango de 10 a 12 segundos.

Media de +/- 2,5 segundos para un control de calidad con un TTPA medio en el rango de 25 a 30 segundos.

Media de +/- 2,5 segundos para un control de calidad con un tiempo medio de trombina en el rango de 12 a 20 segundos.

Media de +/- 0,5 g/l para un control de calidad con una media de fibrinógeno de 2,5 a 3 g/l

Rangos normales: Los resultados de las pruebas manuales suelen ser diferentes de los generados por los coagulómetros. Por lo general, los tiempos de coagulación para TP y TTPA son más cortos para los analizadores que utilizan fotópica para monitorear la coagulación en comparación con los resultados que se obtienen manualmente. El grado de diferencia no es consistente entre los diferentes analizadores que pueden utilizar luz transmitida o dispersa. Los analizadores monitorean el cambio en la dispersión/transmisión de luz a lo largo del tiempo después de que se inicia la coagulación y registran el tiempo de coagulación como el tiempo que se tarda en exceder un umbral particular de cambio. Puede ser un umbral de cambio tan bajo como el 3% con respecto a la línea de base o un cambio máximo como el 50%. Cuanto menor sea el cambio porcentual utilizado en el análisis de la curva de coagulación, menor será el tiempo de coagulación reportado. Esto significa que los resultados de las pruebas manuales no deben notificarse junto con un rango de referencia establecido para una técnica automatizada, incluso cuando se utilizan los mismos reactivos. Hay dos opciones para tratar este problema. Una es establecer un rango de referencia para la técnica manual utilizando el proceso descrito en otra parte de este manual. Esto debe hacerse si todas las pruebas en el laboratorio se llevan a cabo utilizando técnicas manuales. Más a menudo, las pruebas manuales se restringen a un pequeño subgrupo de muestras en las que el análisis automatizado ha fallado. En este caso, la mayoría de los resultados publicados por el laboratorio se emitirán con el rango de referencia automatizado correspondiente. No es útil para los usuarios del servicio ver resultados ocasionales de TP o TTPA emitidos con un rango de referencia diferente. En este caso, el laboratorio puede adoptar un enfoque pragmático y utilizar una tabla de conversión como se describe a continuación, de modo que la prueba se realice mediante técnica manual, pero el resultado de la prueba se convierta en el resultado que se habría obtenido si la muestra se hubiera analizado mediante el método automatizado.

Conversión de los resultados manuales de TP, TTPA y tiempo de trombina en números equivalentes automatizados: Una serie de 20 a 30 muestras que cubran un rango de resultados normales y anormales debe analizarse utilizando métodos manuales y automatizados. Los datos deben analizarse mediante análisis de regresión para establecer la relación entre los resultados obtenidos con los dos métodos. Debe haber una correlación significativa entre los resultados, con un coeficiente de correlación >0,8. Si es así, la relación de regresión se puede utilizar para crear una tabla que muestre el resultado manual y el resultado equivalente que se habría obtenido en el sistema automatizado. Cuando se realiza una prueba manual, el resultado manual se convierte en el resultado automatizado, que luego se reporta junto con el rango de referencia del método automatizado habitual. Esto significa que los usuarios del servicio solo

verán un único rango de referencia para el tiempo de TP, TTPA o trombina. Esto es importante, ya que es probable que estos rangos de referencia se incorporen a los protocolos clínicos utilizados para el manejo de los pacientes. En la Tabla 5 se muestran los resultados manuales y automatizados obtenidos al analizar las mismas 21 muestras utilizando ambos métodos.

Tabla 5. TTPA manuales y automatizados en las mismas muestras

Número de muestra	TTPA manual (seg)	TTPA Automatizado (seg)	Número de muestra	TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)
1	31.7	27.0	12	31.7	30.1
2	51.1	46.9	13	31.9	28.9
3	27.2	26.5	14	36.2	33.2
4	42.2	39.4	15	33.1	28.5
5	34.5	30.4	16	40.0	36.4
6	44.2	43.2	17	37.1	30.7
7	33.0	30.5	18	29.2	25.6
8	31.9	30.0	19	35.2	28.1
9	22.2	19.6	20	37.1	34.7
10	34.0	27.8	21	36.5	31.4
11	32.5	31.3			

La relación de regresión lineal entre los dos conjuntos de datos se calcula utilizando un paquete de estadísticas. En este ejemplo, el coeficiente de correlación (r) es 0,96 y la relación de regresión se calcula de la siguiente manera:

$$y = 0,9551x - 1,887$$

Dónde

- y es el TTPA automatizado,
- x es el TTPA manual
- 0,9551 es la pendiente de la recta de regresión lineal
- 1.887 es la intersección en el eje de la y.

Esta ecuación se utiliza para derivar el TTPA automatizado a partir del TTPA determinado manualmente de cualquier muestra de prueba. Es conveniente preparar una tabla que relacione el TTPA manual con el resultado equivalente automatizado. La Tabla 6 se obtuvo utilizando la ecuación de regresión anterior.

Tabla 6. Tabla de conversión: TTPA manual a TTPA equivalente automatizado

TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)	TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)	TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)
19	16.3	40	36.3	61	56.4
20	17.2	41	37.3	62	57.3
21	18.2	42	38.2	63	58.3
22	19.1	43	39.2	64	59.2
23	20.1	44	40.1	65	60.2
24	21.0	45	41.1	66	61.2
25	22.0	46	42.0	67	62.1
26	22.9	47	43.0	68	63.1
27	23.9	48	44.0	69	64.0
28	24.9	49	44.9	70	65.0
29	25.8	50	45.9	71	65.9
30	26.8	51	46.8	72	66.9
31	27.8	52	47.8	73	67.8
32	28.7	53	48.7	74	68.8
33	29.6	54	49.7	75	69.8
34	30.6	55	50.7	76	70.7
35	31.5	56	51.6	77	81.7
36	32.5	57	52.6	78	82.6
37	33.4	58	53.5	79	73.6
38	34.4	59	54.5	80	74.5
39	35.4	60	55.4		

Ensayo manual de fibrinógeno de Clauss: Los requisitos y métodos utilizados para el ensayo manual de fibrinógeno de Clauss son los mismos que para la versión automatizada (es decir, la misma solución amortiguadora, trombina y dilución de la muestra de ensayo). El tiempo de coagulación de las pruebas manuales se convierte en concentración de fibrinógeno mediante una curva de calibración. La curva de calibración debe construirse utilizando el mismo calibrador y las mismas diluciones del calibrador que se utilizarían para las pruebas automatizadas (consulte la sección de ensayos de Clauss en otra parte de este manual); sin embargo, los tiempos de coagulación de cada dilución del calibrador utilizada para construir la curva de calibración se determinan manualmente. De este modo, los resultados se convierten en concentración de fibrinógeno y el resultado se presenta en el mismo formato que la versión automatizada (g/l o mg/dl) utilizando el mismo rango de referencia que para el método de Clauss automatizado en el mismo centro.

Referencias

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. Recomendaciones del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH) para el procesamiento de muestras de sangre para pruebas de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.

van den Besselaar A, van Rijn CJJ, Abdoel CF, Chantarangkul V, Scalabrino E, Kitchen S, Tripodi A, Woolley AM, Radovan L, Cobbaert CM. Allnando el camino para establecer un sistema de medición de referencia para la estandarización del tiempo de protrombina plasmática: Armonizando el método de tubo basculante manual. *J Thromb Haemost* 2020; 18(8): 1986-1994.