

RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE LA MUESTRA Y CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO DE COAGULACION

Alberto Barrantes B*

Resumen

Se describe con detalle los principales aspectos que deben considerarse para un óptimo funcionamiento en la laboratorio de coagulación, en cuanto a los cuidados y materiales necesarios en la toma de la muestra, el procesamiento de la misma y las posibles fuentes de error. (Rev Cost Cienc Méd Dic 1980; 1(2): 179-184).

Las muestras de sangre para los estudios de la hemostasia, deben ser obtenidas de tal manera que se preserve la integridad de todos los factores plasmáticos de la coagulación.

El delicado sistema de coagulación consiste de enzimas y proenzimas que son fácilmente activadas o desnaturalizadas. En la sangre que es obtenida lentamente o con dificultad, el mecanismo de la coagulación puede ser activado y las pruebas pueden demostrar una actividad de los factores muy alta y un falso número bajo de plaquetas, muchas de las cuales pueden funcionar anormalmente (13). Además, si hay dificultad para obtener la sangre, se puede contaminar con tromboplastina tisular, la cual activará la serie de eventos de la coagulación, invalidándose los resultados de las pruebas.

Por lo tanto, una persona experimentada, preferiblemente del laboratorio de coagulación, es la que debe obtener las muestras (3, 13).

El método de sangrado con dos jeringas se usa para obtener la sangre para muchas pruebas de coagulación (10, 15, 20). Los primeros mililitros son recogidos en una jeringa y descartados o usados para pruebas no afectadas por la tromboplastina tisular. La sangre obtenida en la segunda jeringa se usa para llevar a cabo las pruebas de coagulación.

Las jeringas plásticas o siliconizadas se deben usar para recoger la sangre. No se recomienda usar tubos al vacío pues pueden dar volúmenes no deseables y además producir espuma, accidente que desnatura el fibrinógeno y los factores V y VIII. Luego de la venoclisis se debe colocar la jeringa pegada a la pared del tubo y dejar correr la sangre evitando la formación de espuma o de una turbulencia excesiva (23), y mezclar la sangre por inversión suave, ya que las proteínas de la coagulación se pueden desnaturar por mezcla vigorosa.

La sangre para el tiempo de tromboplastina parcial (TTP) y ensayo de factores específicos —con la excepción del factor VII— se debe centrifugar a 4-10°C y mantener en hielo hasta el momento que se hagan las pruebas. El frío, sin embargo, activa la calicreína en los plasmas de muchas mujeres que toman anticonceptivos orales, causando una activación del factor VII varias veces su nivel normal (5, 13). Por lo tanto, la sangre para tiempo de protrombina, factor VII y estudios funcionales de plaquetas se debe centrifugar y mantener a temperatura ambiente hasta que se hagan las pruebas.

La sangre y el plasma se deben mantener en tubos plásticos (20), y todo el manipuleo se debe hacer con pipetas plásticas. Las superficies de vidrio activan la secuencia de la coagulación, invalidándose por lo tanto los resultados de muchas pruebas.

* Laboratorio de Investigación Clínica, Hospital México, CCSS.

Si todas las pruebas no pueden ser completadas dentro de 4 horas, se deben congelar alícuotas de plasma en forma rápida —en alcohol y hielo seco— y guardarlas a -70°C . Luego, el plasma debe ser descongelado rápidamente a 37°C , inmediatamente antes de las pruebas. Si el plasma se guarda en pequeñas alícuotas, uno de los tubos puede ser descongelado para cada prueba y muy poco plasma se desperdicia.

Varias drogas y condiciones fisiológicas (como embarazo y ejercicio vigoroso) afectan algunas pruebas de coagulación. La aspirina inhibe la agregación plaquetaria inducida por ADP y epinefrina (25). Otras drogas también inhiben la agregación plaquetaria en alguna vía. El tiempo de protrombina, factores I (fibrinógeno), II, VII, VIII, IX, X y XII, la adhesividad y la agregación plaquetaria se ven también aumentadas en un grado estadísticamente significativo en mujeres que toman anticonceptivos orales (14).

El factor VIII puede aumentar muy rápidamente por ejercicio extremo o infusión de adrenalina (8).

Se recomienda el uso de citrato de sodio 3,8 por ciento para anticoagular la sangre para todas las pruebas de coagulación, excepto para aquellas en las cuales se indique otra concentración. El citrato de sodio es superior al oxalato de sodio por varios motivos. Uno de los más importantes es que los factores V y VIII son más estables en citrato que en oxalato (1, 2, 13). En un estudio la actividad del factor V disminuyó tan rápido como 15 minutos después de que la muestra fue tomada. Por otra parte, el TTP llevado a cabo en muestras citratadas fue más sensible a la presencia de heparina que aquellas obtenidas con oxalato (11, 21, 22). Esto es importante cuando se usa el TTP para controlar pacientes que están en terapia con dicho anticoagulante.

Muchas tromboplastinas y tromboplastinas parciales (o cefalinas) pueden ser obtenidas comercialmente o preparadas en el propio laboratorio. En las tromboplastinas se ha encontrado una amplia variabilidad en cuanto a su sensibilidad al factor VII (19). Las diferencias de variabilidad entre laboratorios en el tiempo de protrombina han sido atribuidas a diferencias entre las tromboplastinas que se usan (4, 24). La variabilidad en otras pruebas ha sido atribuida a diferencias entre las tromboplastinas parciales activadas. En un estudio, ningún reactivo para TTP dio resultados reproducibles y fue igualmente sensible a todos los factores del sistema intrínseco de la coagulación (18). Esta variabilidad en las tromboplastinas y cefalinas persistirá hasta que los reactivos sean estandarizados. Muchos grupos internacionales están discutiendo la estandarización de los métodos y los reactivos.

La escogencia del tipo de tromboplastina total o parcial para ser usadas en un laboratorio, dependerá de la reproducibilidad y sensibilidad de ellas, y de la compatibilidad con el instrumento, si éste se usa. Muchas tromboplastinas y cefalinas no son compatibles con ciertos instrumentos. Tromboplastinas y cefalinas particuladas o turbias no pueden ser usadas en instrumentos que detectan el punto final por medio de un sistema óptico (17). Nunca se insistirá lo suficiente acerca de que las instrucciones del fabricante sobre el uso de las tromboplastinas y cefalinas deben ser estrictamente seguidas.

Por otra parte, la concentración del cloruro de calcio usado en el TTP es crítico y está relacionado con la concentración de citrato de sodio usado con anticoagulante (12,21). Se recomienda una concentración de 0,025 M de cloruro de calcio.

Algunas de las pruebas de coagulación sugieren el uso de soluciones amortiguadoras para asegurar que la reacción tenga lugar en un rango de pH fisiológico. Estas soluciones deben ser cuidadosamente preparadas y el PH probado antes de guardarlas en refrigeración.

El agua destilada y desionizada se usa en las pruebas y en la preparación de los reactivos. Agua con pH alto prolonga los resultados si el sistema no está apropiadamente amortiguado. Los anticoagulantes preparados con agua que contiene amonio causan rápido deterioro del factor V, prolongando el tiempo de protrombina.

La tromboplastina, cefalina, soluciones amortiguadoras y anticoagulantes se deben mantener en refrigeración; el cloruro de calcio y el agua a temperatura ambiente.

Los tubos para las pruebas y para mantener el plasma deben estar limpios y sin quebraduras. El lavado ácido se considera como el mejor método para la cristalería que se utiliza en los estudios de coagulación (10). La cristalería debe ser luego apropiadamente lavada para remover todas las trazas de ácido debido a que puede cambiar el pH del plasma. La cristalería descartable y de plástico es muy útil. La cristalería siliconizada se debe mantener separada de la no siliconizada.

La detención del punto final requiere un baño de agua a temperatura controlada y un reloj cronómetro. La temperatura del agua debe ser de $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Muchas variaciones en los resultados de las pruebas son causadas por defectos en las técnicas. Variaciones mínimas en las técnicas, reactivos, temperatura y pH producen una variación sustancial en los resultados de las pruebas (24). El tiempo de incubación y la temperatura son parámetros críticos en el tiempo de protrombina (1). El plasma no debe ser mantenido a 37°C por más de 10 minutos, y la tromboplastina por un tiempo no mayor del recomendado por el fabricante.

Las reacciones envueltas en la coagulación sanguínea son de tipo enzimático, por lo tanto, se deben establecer condiciones óptimas de pH y de fuerza iónica cuando se desarrolla una prueba (2). Muchas de las pruebas de rutina son llevadas a cabo en condiciones amortiguadas que cubren el rango de pH fisiológico de la sangre —7,2 a 7,4— (23). Los pasos sucesivos de cualquier procedimiento deben ser definidos exactamente: la cantidad de reactivos, el orden en que se añaden y el tiempo de incubación para los diferentes reactivos (13). Los períodos de incubación de la mezcla cefalina-plasma en el TTP deben ser exactamente los mismos para cada prueba. El procedimiento de la mezcla determina el monto de la activación de contacto del TTP. Una mezcla inadecuada de la cefalina y el plasma durante el período de incubación causa resultados variables.

Las muestras de plasma deben ser examinadas por hemólisis, bilirrubina, lipemia o coágulos. Los eritrocitos contiene fosfolípidos, los cuales cuando se liberan poseen una actividad coagulante similar a la del factor plaquetario 3 (16). Este fosfolípido puede acortar el TTP en las muestras hemolizadas. Muestras ictericas deben ser manejadas con cuidado, debido a que pueden contener antígeno de hepatitis. Cualquier coágulo en la muestra —no importa su tamaño— invalida los resultados obtenidos.

Los errores de dilución causan resultados variables. La proporción de sangre y anticoagulantes debe ser exacta. Pacientes con un hematocrito muy alto tienen erróneamente tiempos de protrombina prolongados debido a la alta concentración de citrato en el plasma. Después de que las muestras son centrifugadas, el volumen de células empacadas se anota y las muestras de pacientes con un hematocrito muy alto deben ser tomadas de nuevo con una cantidad menor de citrato. Se puede usar la table de Igram y Hills (9) para determinar el volumen de citrato que se debe usar cuando se toman muestras de pacientes con hematocritos muy altos.

Excepto para los tiempos de sangrado, de coagulación y la retracción del coágulo, cada prueba debe llevarse a cabo en duplicado. La diferencia entre los duplicados no debe ser mayor del 5 por ciento del valor menor de los duplicados. Si la diferencia es mayor, se debe repetir en duplicado.

A pesar de todas las precauciones, los reactivos biológicos y los plasmas cambian durante el período de trabajo. Es sensato por lo tanto, minimizar estos cambios efectuando la prueba apropiadamente (7, 8).

Controles normales, y cuando sea posible controles anormales, deben ser incluidos en cada ensayo. Controles normales y anormales se encuentran en el comercio o se pueden preparar en el laboratorio.

Los controles caseros deben ser frescos, congelados a -70°C o liofilizados (6). Los plasmas frescos deben ser usados inmediatamente; los plasmas congelados por 3-4 meses y los liofilizados, por lo menos un año. Si se desea preparar un control normal que sea representativo se debe hacer de un número de 10 individuos normales, 5 hombres y 5 mujeres. Para estas últimas se debe prever que no estén tomando anticonceptivos orales, puesto que esta medicación eleva los niveles de muchos de los factores de la coagulación (14).

El promedio, las desviaciones estándar y la diferencia entre duplicados del control deben ser determinados después de probar el control en duplicado por lo menos 20 días diferentes. Después que estos valores son obtenidos, el promedio y las diferencias entre duplicados se plotean en gráficos. Para obtener un estado satisfactorio de control, el promedio de los duplicados debe caer entre dos desviaciones estándar de la media calculada. Si la media del control está fuera de dos desviaciones estándar, se debe probar un nuevo vial de control. Si los resultados todavía están fuera de los límites, se deben probar nuevos viales de cada reactivo. Si los resultados no son apropiados, se debe probar el instrumento (si se usa) y la temperatura del baño. Se debe asimismo probar el pH del plasma y los reactivos. No se debe reportar ninguna muestra hasta que la media del control esté dentro de dos desviaciones estándar de la media obtenida.

Se deben establecer los límites normales de cada prueba. No son válidos los límites normales obtenidos en otros laboratorios.

Para establecer límites normales, se deben probar bajo condiciones óptimas plasmas de un mínimo de 20 hombres y mujeres. Se deben obtener los promedios y las desviaciones estándar. Los resultados del plasma de aproximadamente el 95 por ciento de la población normal debe caer dentro de dos desviaciones estándar de la media.

Si los resultados están fuera de estos límites, el plasma debe ser evaluado para determinar la causa.

En resumen, las siguientes medidas de control de calidad se deben determinar:

1. La sangre debe ser cuidadosamente tomada con jeringa de plástico y agujas de gran calibre.
2. El plasma se debe mantener de $4-10^{\circ}\text{C}$ en tubos tapados y llevar a cabo las pruebas dentro de las primeras 4 horas.
3. El plasma para el TP y para la cuantificación de factor VII, y el plasma rico en plaquetas, se debe mantener a temperatura ambiente.
4. Se debe usar citrato de sodio 3,8 por ciento para anticoagular el plasma.
5. Las instrucciones de las casas fabricantes para el manejo y uso de los reactivos deben ser seguidas al pie de la letra.
6. La temperatura de reacción debe ser a 37°C y el pH de la reacción de 7,2--7,4.
7. No se deben mantener los plasmas a 37°C por más de 10 minutos y la tromboplastina y cefalina de acuerdo con las recomendaciones del caso.
8. Se deben hacer todas las pruebas en duplicado.
9. Se deben incluir controles normales cada día.
10. Se deben determinar los valores normales para cada prueba.

ABSTRACT

A detailed analysis of the precautions to be taken and of the necessary materials in the coagulation laboratory is presented, describing sample processing and possible sources of error.

BIBLIOGRAFIA

1. Bairrington, J. D., Peterson, E. W.: The laboratory control of anticoagulant therapy. The one stage prothrombin time-quality control in coagulation procedures. *Am. J. Med. Tech.* 1967; 33: 296—305.
2. Beller, P. K., Graefin, H.: Equipment and general requirements for the coagulation laboratory. In: *Thrombosis and bleeding disorders* (ed. N.U. Bang), Academic Press, N.Y., 1971; pp 61—63.
3. Bowie, E. J. W. *et al.*: *Mayo Clinic Laboratory Manual of Hemostasis*. W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1971; pp 19—21.
4. Bowyer, F.P. *et al.*: Reproducibility in the hematology laboratory: one stage prothrombin times. *Am. J. Clin. Pathol* 1972; 57:482-486.
5. Gjonnaess, H.: Cold promoted activation of factor VII. *Thromb. diath. Haemorrh.* 1972; 28:155-205.
6. Goldenfarb, P.; Reproducibility in coagulation assays. *Am. J. Clin. Pathol.* 1971; 55: 561—564.
7. Hardisty, R. M., Ingram, G. L. C.: *Bleeding Disorders, Investigation and Management*. E. A. Davis Co., Philadelphia, 1965; pp 265—266.
8. Ingram, G. I. C.: Blood coagulation factor VIII: genetics, physiological control and bioassay. *Adv. in Clin. Chem.* 1965; 8: 189—236.
9. Ingram, G. I. C., Hills, M.: The prothrombin time test: effect of varying citrate concentration. *Thrombos. Haemostas* (Stuttg). 1976; 36:230—236.
10. Langdell, R. D.; Coagulation and Hemostasis. In: *Todd-Sanford Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, 15th ed. (ed. I. Davidsohn, J. H. Henry) E. B. Saunders Co., Philadelphia, 1974; pp 434—436.
11. Lenahan, J.G, Frye, S., Phillips, G. E.: Use of the activated partial thromboplastin time in the control of heparin administration. *Clin. Chem.* 1966; 12:263—268.
12. Lenahan, J.G., Phillips, G.E.: Some variables which influence the activated partial thromboplastin time assay. *Clin. Chem.* 1966; 12:269—273.
13. Loeliger, E. A.; Laboratory reagents and coagulation assay procedures *Bull. Wld. Hlth. Org.* 1973; 48:727—736.
14. Miale, J. B., Kent, J. W.: The effects of oral contraceptive on the results of laboratory tests. *Am. J. Obstet. Gyn.* 1974; 120:264—272.
15. Owen, C. A., Bowie, E. J. W., Thompson, J. H.: *The Diagnosis of Bleeding Disorders*. 2a ed. Little Brown and Co. Boston, 1955; p 86.

16. Schwick, H. G.: Assays for factor IX. In: Thrombosis and Bleeding Disorders (ed. N. U. Bang *et al.*). Academic Press, N. Y., 1971; p 202.
17. Sibley, C., Singer, J. W.: Comparison of the Fibrometer System and the Bio/Data coagulation Analyzer. *Am. J. Clin. Pathol.* 1972; 57:369-372.
18. Sibley, C.; Singer, J. W., Wood, R. J.: Comparison of activated partial thromboplastin reagents. *Am. J. Clin. Pathol.* 1973; 59:581-586.
19. Singer, J. W., Sibley, C. A.: Sensitivity of commercial thromboplastins to factor VII. *Am. J. Clin. Pathol.* 1973; 59: 755—759.
20. Sirridge, M. S.: Laboratory evaluation of hemostasis. Lea and Febiger, Philadelphia. 1974; pp 190—191.
21. Soloway, H. B., Cornett, B. M., Grayson, J. W.: Comparison of various activated partial thromboplastin reagents in the laboratory control of heparin therapy. *Am. J. Clin. Pathol.* 1973; 59: 587— 590.
22. Soloway, H. B., Cox, S. P., Donahoo, J. V.: Sensitivity of the activated partial thromboplastin time to heparin. *Am. J. Clin. Pathol.* 1973; 59:760—762.
23. Tocantins, L. M., Jaques, L. B., Holburn, R. R.: Processing of blood, preparation of glassware and reagents. In: Blood Coagulation, Hemorrhage and Thrombosis. (ed. L. M. Tocantins, L. A. Kazal). Grune and Stratton, N.Y. 1955, pp 2—28.
24. Zucker, S., Brosious, E., Cooper, G. R.: One-stage prothrombin time survey. *Am. J. Clin. Pathol.* 1970; 53:340 - 347.
25. Weiss, H. J. The Pharmacology of platelet inhibition. In: Progress in Hemostasis and Thrombosis, Vol. 1 (Ed. T. H. Spaet). Grune and Stratton, N.Y., 1972; pp 199—231.