

UNIVERSIDAD CENTROAMERICANA DE CIENCIAS EMPRESARIALES

UCEM

LABOR OMNIA VINCIT IMPROBUS

MICROBIOLOGIA

Investigación Dirigida

TEMA:

Técnicas para el Diagnóstico
de las Coagulopatias

ALUMNA:

Aleyda Fonseca

DIRECTOR DE INVESTIGACION

Dr. Alvaro Banchs

Managua, Nicaragua, 2008



ANEXO
10222
2537
8006

MICROBIOLOGÍA

Investigación Dirigida

Tema: Técnicas para el Diagnóstico de las Coagulopatías.

Alumna: Aleyda Fonseca

BIBLIOTECA
U C E M

Director de Investigación: Dr. Álvaro Banchs.

BIBLIOTECA
U C E M

Managua, Nicaragua.
2008

Req. 6123/11
na ingreso

Dedicatoria:

A Dios por darme la oportunidad de lograr otra de mis metas y culminar con éxito una parte importante de mi vida.

A mi padre querido que ha sido un pilar fundamental con su apoyo incondicional en el transcurso de mi educación.

A mi Instituto de enseñanza (UCEM) que fue durante 4 años mi centro formador en sabiduría, conocimientos y permitiéndome crecer como persona.

Agradecimiento:

Agradezco en especial al Dr. Álvaro Banchs (Director de Investigación); por sus conocimientos y experiencia compartida en el desarrollo de este trabajo investigativo.

A todas las personas que contribuyeron de alguna forma para que este trabajo fuese una realidad.

Índice

Contenido.....	N. de página
Dedicatoria.....	i
Agradecimiento.....	ii
I.-Introducción.....	1
II.-Planteamiento de problema.....	5
III.-Objetivos.....	6
IV.-Antecedentes.....	7
4.1-Instrucciones generales para la realización de las pruebas de coagulación.....	9
4.2- Coagulopatías.....	15
4.3- Pruebas Cuantitativas.....	16
4.4- Pruebas Cualitativas.....	20
4.5- Características clínicas de las coagulopatías.....	21
4.6- Sintomatología según los factores de coagulación.....	21
4.7- Métodos y técnicas empleadas para el diagnóstico de las coagulopatías.....	24
4.8- Pruebas requeridas según cada factor de la coagulación.....	27
5.0- Procedimientos técnicos de las diferentes Pruebas de la coagulación.....	29
V- Conclusiones.....	37
VI- Bibliografía.....	38

I. Introducción

Los trastornos de la coagulación denominadas coagulopatías, son anomalías hemostáticas que pueden presentar dificultades de diagnóstico y tratamiento, por su baja frecuencia de estudio como también su elevado costo en las pruebas presuntivas entre las cuales tenemos las siguientes: Pruebas genéticas, Test de reptilasa (reactivo), tromboelastogramas entre otras.

En Nicaragua se realiza el diagnóstico a través de las pruebas cuantitativas y cualitativas; donde la Cruz Roja y laboratorios privados son los centros de alternativas para remitir pacientes sospechosos de padecerlas.

Este estudio tratara de demostrar que las Coagulopatias están ligadas o relacionadas con los factores de coagulación (Factores I, II, VII, X, XI, XII, XIII, Factor Fletcher, Factor Fitzgerald, Factor Passvov), los cuales son objeto de esta investigación.

Factor I (fibrinógeno): El fibrinógeno es una glicoproteína adhesiva de 340 kD que se sintetiza en el hígado. Es una proteína de elevado peso molecular, la cual es convertida a fibrina a través de la acción de la trombina. La deficiencia de este factor resulta en Afibrinogenemia a Hipofibrinogenemia. El fibrinógeno también desempeña un papel en la agregación plaquetaria normal.

Factor II (Protrombina): La protombina es una glicoproteína de 72 kDa sintetizada en los hepatocitos, de una sola cadena, con cuatro dominios. Es uno de los factores dependientes de vitamina K, que requiere carboxilación postranslacional para activarse.

Factor III Factor tisular (Tromboplastina): Es una lipoproteína que funciona en la vía Extrínseca de la coagulación sanguínea, activando el Factor X, también llamado Factor tisular. El Factor Tisular o Tromboplastina tisular es el reaccionante inicial en el sistema Extrínseco de la coagulación. Y actúa como cofactor con el factor VII.

Factor VII (Proconvertina): Es un factor estable, cofactor, acumulador que participa en la vía Intrínseca de la coagulación sanguínea, es activado por el contacto con el calcio y en conjunto con el Factor III (tromboplastina tisular) activa al factor X. Este factor es producido en el hígado, igual que los otros de factores vitamina K dependiente.

Factor X: El factor X es una serino proteasa, vitamina K dependiente que se sintetiza en el hígado y desempeña un papel clave en el sistema de la coagulación, siendo la primera enzima del sistema común y el más importante activador de la Protombina junto con el factor V a y las membranas fosfolipídicas y calcio complejo de protombinasa, acelera 280,000 veces la conversión de protrombina a trombina. El gen se encuentra en cromosoma 13, cerca del gen del Factor VII, con el que está estrechamente relacionado. Es la primera encima de la vía final común hacia la formación de fibrinas.

Factor XI: El factor XI es un cimógeno, precursor de una serino proteasa dimerica, de síntesis hepática, vitamina K dependiente, que una vez activada por el factor XII, activa al factor IX. Es una glicoproteína plasmática. La deficiencia del Factor XI fue descubierta por Rosenthal, Dreskin y Rosenthal, en 1953 en una familia hebrea con una diátesis hemorrágica moderada, cuya forma de transmisión se describió inicialmente como autosómica dominante, aunque después se estableció que el modo de transmisión real era autosómico recesivo, con igual número de mujeres y varones afectados. Posteriormente se han descrito casos en el mundo entero, con prevalencia marcada entre hebreos.

Factor XII (de Hageman)

La existencia de este factor, fue descubierta por Ratnoff y Colopy en 1955 en una guarda de ferrocarril de nombre John H Hageman. El señor Hageman no presentaba historia de sangramientos, pero un examen de rutina se encontró que su sangre era prácticamente incoagulable.

Se han observado valores bajos del factor Hageman en el cordón umbilical y en el recién nacido hasta la segunda semana. En condiciones patológicas, hay reducción del Factor XII en la coagulación intravascular diseminada y en la cirrosis hepática.

Se ha establecido que el factor Hageman, conjuntamente con el factor Fitzgerald participa en otras reacciones tales como fibrinólisis, la formación de quininas y la generación de permeabilidad vascular por la acción de plasma diluido.

Factor XIII (Factor estabilizante de la fibrina).

Fue descrita en 1961 en Venezuela por Duckert y sus colaboradores, en donde se describió el primer caso en 1968.

Factor Fletcher: Fue descubierto en 1965 por Hathaway y sus colaboradores en un paciente de apellido Fletcher, que presentaba TPT alargado. Clínicamente este efecto es asintomático se hereda de forma autosómica recesiva. La

consanguinidad de los padres se ha podido comprobar en un número de casos. Se ha establecido que el factor Fletcher es una precalicreina plasmática que es necesaria para la activación óptima del Factor XI (PTA), Generación de la fibrinólisis, quimotaxis y formación de quininas. Actúa como cofactor no enzimático, jugando papel importante en las reacciones de activación por contacto en el mecanismo de la coagulación.

Factor Fitzgerald: Fue descubierta en 1974 por Walkman y Abrahán, en un negro de 72 años, a quien sin antecedente hemorrágicos presentaba un TPA a con caolín muy prolongado, el cual era corregido con la adición de plasma deficiente en los Factores V, X, XII, IX, XII y Fletcher. Además, a diferencia de Fletcher, la incubación prolongada con caolín no mejoraba el TPT. El paciente presentaba una activación deficiente de la fibrinólisis mediada por el contacto, una leucocitaria típica, liberada deficiente de quininas y no era capaz de producir un aumento en la permeabilidad vascular por la acción desde plasma diluido. Presenta repuesta inflamatoria anormal, no presentan predisposición a infecciones. Hoy piensa que este Factor actúa en el mecanismo de la coagulación en un paso inmediato a la activación del Hageman y Fletcher, ante de la activación del Factor.

Factor Passovoy: Pertenece también al grupo de las deficiencias de los Factores que intervienen en la fase temprana de la coagulación. Fue descrito en 1975 por Hougie y colaboradores en un paciente con una diátesis hemorrágica moderada y una prolongación muy discreta del TPT. Este factor es absorbido por el sulfato de bario y del gel de hidróxido de aluminio, aun se desconoce si actúa en una fase anterior o posterior al Factor XI.

En Nicaragua hay debilidades en la clasificación por falta de recursos económicos por parte del paciente afectado y las instituciones que brindan servicios de salud, dando esto como resultado que se realice una clasificación incompleta de estas deficiencias sanguíneas.

Es de suma importancia ofrecer a través de este trabajo investigativo una exposición detallada de la manera de abordar desde el laboratorio clínico para ofrecer alternativas de diagnóstico adecuadas que permita a la población una mayor expectativa de vida.

Justificación.

El presente estudio, tiene como finalidad profundizar sobre el conocimiento de las pruebas presuntivas para el diagnóstico de estas alteraciones en la sangre que son causa de enfermedades ligadas a los factores de coagulación, específicamente a los factores I, II, V, VII, X, XI, XII, XIII, factor Fletcher, Fitzgerald, Passvovoy, los cuales son objetivo de estudio.

Se pretende facilitar conocimiento científico – técnico a la Universidad como Centro formador para que este material puede ser consultado tanto por docentes, así como estudiantes de las áreas de ciencias medicas .

En muchos países del mundo, las coagulopatias tienen un proceso de seguimiento muy diferente al nuestro, por la posición económica que estos poseen. Es decir por sus grandes avances en la tecnología de equipos y presupuestos para la compra de reactivos que no están al alcance de todos. Por ejemplo el reactivo de Reptilasa.

1. ¿Cuáles son las manifestaciones clínicas para el diagnóstico de las coagulopatias?
2. ¿Cuáles son los métodos o pruebas más comunes para el diagnóstico de las coagulopatias?

II. Planteamiento del problema.

Las Coagulopatias constituyen un estudio muy poco explorado e investigado. Para su respectivo diagnostico se requiere de pruebas especializadas y tecnología que aun no se disponen en algunas instituciones públicas que brindan servicios de salud como son las áreas de investigación muy pocas difundidas en el país dentro de las cuales puedo mencionar las siguientes: Biología molecular (Prueba de ADN y ARN) Inmunodifusion (Detección de Antígenos o Anticuerpos), Electroforesis y Radioinmunoensayo.

Dichas pruebas deben considerarse de suma importancia al igual que los exámenes de rutina (TP, TPT. Tiempo de coagulación, Tiempo de Sangría entre otras) como una vía de estudio y reconfirmación para identificar los posibles factores de la coagulación que se encuentran alterados y poder establecer su diagnóstico.

1. Cuáles son las manifestaciones clínicas para el diagnóstico de las coagulopatías?
2. ¿Cuáles son los métodos o pruebas más comunes para el diagnóstico de las coagulopatías?

III. Objetivos

Objetivo General:

Identificar los métodos y técnicas empleadas para el diagnóstico de las coagulopatías; así como sus manifestaciones clínicas.

Objetivos Específicos:

Conocer las características y manifestaciones clínicas que orienten un diagnóstico de estas anomalías de la sangre.

Conocer los métodos y técnicas que brindarán al médico un diagnóstico definitivo de los trastornos de la coagulación.

IV. Antecedentes

Las coagulopatias son problemas que estimularon desde años remotos su estudio para entender las anomalías que pueda presentar la coagulación sanguínea. La historia de las enfermedades hemostáticas van desde hace 1700 años, donde una gente llamada rabinos se dieron cuenta que muchos niños varones sangraban sin ninguna razón, los cuales fueron asociados al pasar de los años a la Hemofilia que es una de las enfermedades más común que presenta la coagulación sanguínea. En el transcurso de los años las Coagulopatias han dado respuesta definitiva, confirmativa a través de las pruebas de laboratorio porque nos indican las posibles alteraciones existentes en los mecanismos hemostáticos. Dentro de las pruebas más utilizadas están las siguientes:

Tiempo de Tromboplastina (TPT): esta prueba fue descrita y utilizada por Hamman y Rich en 1944. Se utiliza cuando alguien presenta sangrados o formación de coágulos inexplicables. Juntamente con el TP (que evalúa las vías extrínseca y común de la cascada de la coagulación), el TPT se utiliza a menudo como prueba de primera línea en la investigación de la causa de un sangrado o de un episodio trombótico.

Tiempo de Trombina: es un test que diagnostica los defectos en la formación de la fibrina.

Tiempo de Protrombina: fue descrita por el doctor Armand Quick en 1935. Es una de las pruebas de coagulación más popular y usada porque es capaz de detectar deficiencias de los factores V, VII, y X.

Tiempo de Sangría: fue descrita en 1910 por Duke y ha sido muy criticada a través de los años. Esta prueba nos permite valorar la Hemostasia primaria.

Tiempo de Reptilasa: La reptilasa es un veneno de serpiente que contiene una enzima que promueve la conversión del fibrinógeno en fibrina por una reacción proteolítica similar, aunque no idéntica, a la que ejerce la trombina. Es decir se utiliza para valorar el tiempo de trombina prolongado.

Tiempo de Coagulación: fue descrita en 1966 por Hattesly. Es un test funcional que ofrece una idea global de la situación del sistema intrínseco de la coagulación, es decir mide el tiempo que tarda la sangre en coagularse al contactar con superficies artificiales.

Recuento de Plaquetas: fue descrita en 1943 por Owner a través de una operación. Es la prueba q nos indica si los vasos sanguíneos han sufrido alguna daño. La finalidad de esta prueba es contar la cantidad de plaquetas por milímetro cúbico, de esta forma al mismo tiempo evaluar la eficiencia de la producción de estas células por la médula ósea.

Biología Molecular: Fue descrita en 1865 por Gregorio Mendel ya que fue el primer científico en llevar acabo experimentos genéticos con aportaciones de Friedrich Miescher quien en 1869 descubrió el ADN. Las enfermedades de origen genético son estudiadas por la medicina desde múltiples aproximaciones; Originalmente estos estudios abarcaban relaciones familiares y descripciones clínicas de las afecciones su forma de herencia.

Actualmente se considera que un test genético es un análisis de ADN o ARN humano, de sus cromosomas, de proteínas o ciertos metabolitos, con el objeto de detectar una alteración relacionada a un desorden hereditario.

Esto puede ser llevado a cabo examinado directamente lo siguiente:

Midiendo la existencia de alteraciones en el material genético. Es decir determinado por técnicas de biología molecular un cambio en la secuencia de ADN de un determinado gen. Esto se considera que es una determinación directa y en un conjunto de patologías genéticas es el camino más seguro para un diagnóstico acertado.

Puede también ser necesario la determinación de la integridad o la concentración de ARN, lo que también se considera un método directo.

Mediante la aplicación de la Biología molecular que es considerada una prueba confirmativa en el laboratorio clínico podemos descubrir muchas incógnitas por ejemplo: las pruebas que se realizan con técnicas de investigación de ADN sobre todo en mujeres embarazadas para determinar si el feto viene con alguna malformación congénita.

Inmunodifusión: Es un método inmunológico sencillo y rutinariamente usado en el laboratorio clínico para la detección de antígenos o anticuerpos en una muestra biológica. Es considerado el proceso estándar para la detección de Antígenos Nucleares Extraíbles (ENA).

Electroforesis: Es una técnica de laboratorio, en la cual la porción líquida de la sangre (suero) se coloca en un papel especialmente tratado y se expone a una corriente eléctrica. Las proteínas se mueven o migran en el papel, con el fin de formar bandas que muestran la cantidad de cada fracción de proteína, en relación con otras fracciones de proteína.

4.1 Instrucciones generales para la realización de las pruebas de coagulación.

Debido a que el tema abordado es muy importante desde el punto de vista técnico, se exponen algunas recomendaciones técnicas que tienen como objetivo brindar al personal interesado las bases necesarias para la mejor ejecución de los procedimientos de determinación de las pruebas de hemostasia.

Dentro de la realización de las pruebas de coagulación hay que tener en cuenta ciertos aspectos a la hora de determinar ciertas pruebas, los cuales deben ser cumplidos fielmente a fin de obtener resultados confiables y reproducibles.

Una de ellas es la de seleccionar, entre el personal de laboratorio, a una persona para que se encargue de realizar las pruebas de coagulación o, aun mejor, a un equipo, esta sugerencia es debida a que las pruebas deben realizarse sin ningún retraso y sobre todo con personal con entrenamiento especial ya que este, debe tener en cuentas factores que la afectan como: pH, temperatura, tipo de material uso de controles, estandarización de métodos, etc.

Equipo

Baño de María.

Estos deben estar provistos de termostatos que mantengan la temperatura de 37 C o.5 y controladores cuidadosamente ya que variaciones en ella afectan notablemente los resultados.

Nevera

Ciertos plasmas y reactivos necesitan ser guardados en neveras a temperaturas de 4 C.

Fuente de luz.

Una buena fuente de luz es indispensable para una buena observación en la formación de los coágulos; pero ella no debe proporcionar temperaturas altas, por lo que se utiliza una lámpara de luz de neón, que es luz fría.

Cronómetros.

La mayoría de las pruebas de coagulaciones basa en medir el tiempo que tarda en formarse un coagulo e fibrina in Vitro; a veces este tiempo es muy corto, solo en segundos, por lo que es necesario disponer de cronómetros.

Material.

Agujas.

Las agujas recomendadas son las · 20 y de 1 pulgada de longitud; agujas de menor diámetro pueden producir la hemólisis de glóbulos rojos y, por ende, contaminación de la muestra con sustancia tromboplasmáticas. Agujas de más de 1 pulgada, proporcionan mayor superficie de activación.

Jeringas.

Se recomienda el uso de jeringas plásticas descartables; así se carece de ellas, podrían emplearse jeringas de vidrio siliconados. No se recomienda el uso de vacutainer por las siguientes razones:

- a) La mayoría usa tubo de vidrios no siliconados para la recolección de la sangre.
- b) La sangre entra con mucha presión, lo que puede causar, por una parte, hemólisis de los glóbulos rojos y, por otro lado. La activación de los factores de coagulación.
- c) El llenado de los tubos de vacutainer no siempre es uniforme: esto puede traer como consecuencia que no se conserve la relación que debe existir entre la sangre y el anticoagulante, o cual es una causa muy grave entre en la pruebas de coagulación.
- d) También se ha hablado que los tubos vacutainer pueden contener inhibidor.

Tubos.

Tubos para la recolección de sangre. Se debe utilizar tubos de plásticos descartable, preferiblemente provisto de tapa, pues ello disminuye los cambios de pH de la sangre o de plasma.

Tubos para medir el tiempo de coagulación.

Para medir el tiempo que tarda en formarse el coagulo, se utilizan tubos de 10 x 75 mm. Es indispensable que estos tengan un diámetro uniforme, a fin de obtener resultados reproducibles, ya que variaciones en el diámetro y longitud del tubo influyen en la activación de los factores de contacto. Los tubos para colocar reactivos tales como cloruro de calcio, tromboplastina, cefalina, pueden ser de vidrio, de 12x 75 o 13 x 100 mm, pero destinados para las pruebas de coagulación.

Pipetas.

En la mayoría de las pruebas se emplean las llamadas pipetas de protombina que viven graduadas en 0.1 y 0.2 ml, que por ser cortas, permiten el agregado rápido de los reactivos.

Las pipetas automáticas.

También pueden utilizarse con igual fin que las protombina, pero con las ventajas adicionales que sus puntas son plásticas (no contactables) y descartables.

Cuidado y lavado del material de vidrio.

El material de uso para pruebas de coagulación debe lavarse y guardarse aparte del resto del material de uso para el laboratorio. El material de vidrio reusable debe lavarse y enjuagarse escrupulosamente a fin de evitar que les quede restos de fibrina, proteínas, calcio, etc. No debe utilizarse para lavado detergentes tipo Ajax, Ace, etc., para esto, hay detergentes comerciales que contienen proteolíticos especiales. El secado se debe hacer en horno, envolviéndolo previamente para evitar la contaminación con polvo.

Reactivos.

Cuidados que deben observarse.

La calidad de los reactivos es de mucha importancia para las pruebas de coagulación, deben ser de preparación reciente y de buena calidad, si se preparan en el laboratorio, hay que verificar bien el pH, el agua debe ser destilada y de la mejor calidad, anotar la fecha de preparación para respetar el plazo máximo de conservación, así como tomar en cuentas la temperatura de almacenamiento y fecha de expiración. Nunca se debe mezclar reactivos de diferentes lotes y realizar controles de calidad.

Soluciones anticoagulantes.

Las soluciones anticoagulantes empleadas en la mayoría de las pruebas de coagulación se fundamentan en la precipitación de los iones de calcio. Las más empleadas son las de citratos de sodio 0.109 M y la de oxalato de sodio 0.1 M.

Solución de citrato de sodio 0.109 M.

Se utiliza con preferencia sobre el oxalato de sodio, pues preserva mejor los factores lábiles de la coagulación, tales como el factor V y el Factor VIII y, además, la neutralización del calcio es más rápida con citrato que con oxalato.

La solución de citrato de sodio se emplea en la proporción de un volumen de anticoagulante por 9 volúmenes de sangre. Sin embargo en los trabajos de Ingram, cuando utilizo las proporciones, usuales se citrato y sangren pacientes con valores altos de hematocrito, se obtuvo un alargamiento del tiempo de

protombina, debido a la sobrecitración de la reducida proporción de plasma en la muestra de sangre. Esto se explica por las razones siguientes:
La mayoría de las pruebas de coagulación miden el tiempo que tarde en coagular el plasma descalcificado al agregarle cloruro de calcio; por lo tanto, si hay exceso de citrato en el plasma, se combinara con el cloruro de calcio que se agrega quedando poco o nada de calcio disponibles para realiza la coagulación y alargándose las pruebas.

Solución e oxalato de sodio 0.1 M.

Como ya ha comentado, el oxalato preserva menos que el citrato de sodio a los factores lábiles de la coagulación. Se debe emplear oxalato cuando se va a obtener plasma envejecido (plasma desprovisto de factor V) o cuando se va a adsorber plasma con sulfato d bario. La proporción a utilizar es la de un volumen de anticoagulante por 9 volúmenes de sangre.

Solución de citrato-acido-epsilo-amino-caproico (EACA).

Esta solución se utiliza cuando se sospecha que hay actividad fibrinolítica acelerada, ya que al EACA la inhibe. En estos casos es muy importante emplearla en las muestras para la determinación de Fibrinógeno; sin embargo, la adición de EACA prolonga el PTTa, el TT y el test de reptilasa.

Metodologías para las pruebas de coagulación.

Toma de la muestra.

- a- El material para la extracción de la sangre debe ser de jeringas plásticas descartables, si no se dispone de ellas, utilizar de vidrio, pero siliconadas y las agujas deben ser 20.
- b- La sangre debe extraerse con un mínimo de estasis venosa, por lo tanto el torniquete debe utilizarse el menor tiempo posible, pues de lo contrario podría liberarse sustancias tromboplastinicas y activadores de sistema fibrinolítico.
- c- La punción tiene que ser limpia, es decir sin hacer movimientos de exploración a fin de obtener una muestra exenta de tromnoplastina tisular ya que de lo contrario podrían tenerse falso con los tiempos de coagulación más cortos que los reales.

Manejo de la sangre.

Mientras no se hayan centrifugado los tubos con sangre, estos se colocan en una gradilla forrada con el papel aluminio, la cual se introduce en agua helada o hielo picado. El hielo no debe entrar en contacto directo con la sangre por que podría provocar hemólisis, provocando liberación de trombnoplastina tisular y acortamiento de los tiempos de coagulación.

Obtención y conservación de los plasmas.

La mayoría de las pruebas de coagulación requieren de plasma pobre en plaquetas, lo cual la sangre se centrifugara a 3,500 rpm durante 10 minutos, separado luego el plasma, dejando un centímetro por encima d la capa de glóbulos blanco y plaquetas con el objeto de no remover estas células ya que estas poseen sustancias tromboplastinicas. Los plasmas son trasvasados a envases plásticos tapándolos y conservándolos a 4 C en la nevera, hasta la realización de la pruebas. Estas pruebas deben realizarse como máximo antes de las tres horas de haber extraído la sangre, si se emplea como anticoagulante el citrato de sodio, si es oxalato de sodio, se procesara antes de los noventa minutos, la causa es obvia la causa.

Uso de controles de calidad y de la mezcla control/paciente.

Ninguna prueba de coagulación debe realizarse sin el uso de controles. En la actualidad hay controles comerciales, pero también puede realizarse controles con "pool" de por lo menos tres plasmas normales de muestras recién extraídas y tatarreas en idénticas condiciones a la paciente.

AL realizar las pruebas de coagulación, es indispensable introducir una mezcla de plasma control más plasma del paciente (C/P) preparada a igual volumen.

Esta mezcla permite diferenciar si el tiempo de coagulación alargado de una prueba obedece a deficiencia de algún factor o a la presencia de inhibidores. Así, si el plasma de un paciente da un tiempo de coagulación alargado, y en la mezcla C/p, el tiempo de coagulación es normal, se deduce alargado, y en el plasma del paciente hay deficiencia de algún factor de la coagulación, que fue suministrado por el plasma normal. Si por el contrario, la mezcla C/P continua dando tiempos de coagulación alargados, se piensa que se debe a la presencia de inhibidores de la coagulación en el plasma del paciente.

La mezcla C/P se debe realizar en tubos de plásticos con tapa y conservados en el baño de hielo, antes de comenzar las pruebas.

Conservación y agregado de los reactivos.

Es recomendable antes de realizar las pruebas, observar el estado de los reactivos: si tienen precipitaciones, la fecha de expiración, la temperatura a la cual debe mantener y leer cuidadosamente las instrucciones del fabricante.

Cuando se va a agregar los reactivos, la pipeta debe colocarse en posición vertical, de modo que los reactivos no caigan sobre las paredes del tubo, pues como son cantidades tan pecunias, cualquier pérdida de ellos sería muy significativa. Al agregar el reactivo, se comienza el cronometraje y mezclar el tubo algo fuerte de forma rápida sin la formación de espuma.

Movimiento del tubo.

Al agregar el último reactivo, conjuntamente se pone a andar el cronometro y periódicamente se saca e introduce el tubo dentro del baño de María, hasta observar la formación del coagulo, momento en que se detendrá el cronómetro.

El movimiento adecuado debe describir un ángulo de 90 y se repite con una frecuencia no mayor de una vez por segundo. Esto es muy importante para que el tubo pase el menor tiempo posible fuera del baño, evitando que los reactivos pierdan la temperatura adecuada y la obtención de los tiempos de coagulación más largos que los reales.

Punto final de la prueba.

Hay que establecer que se toma como punto final de la prueba; si la formación de la malla de fibrina o la formación de un coagulo solidó, pues el intervalo entre uno y otro puede extenderse a varios segundos.

En la cátedra tomamos como punto final la aparición de las primeras mallas de fibrina. A veces no se observa fácilmente, por lo cual se debe utilizar una fuente de luz: la recomendada es la lámpara de neón.

Estandarización de los métodos.

Debido a la gran cantidad de variables que influyen los resultados de las pruebas de coagulación, se hace necesario estandarizar los métodos en cada laboratorio.

Los métodos deben ser estandarizados en relación a los siguientes puntos:

a) Material utilizado:

- En la extracción: Utilizar siempre el mismo tipo de jeringa o aguja en la recolección de la muestra, tubos del mismo material. No estandarizar la técnica con un tipo e material y luego utilizar otro para realizar las pruebas.

- En la formación de coagulo: Utilizar los tubos de igual diámetro.

- Tipo de pipeta utilizada: De protrombina o automática

b) Reactivos: Emplear un mismo tipo de reactivo, preferiblemente de una sola casa comercial. No mezclar reactivos de diferentes lotes.

c) El tiempo y la velocidad de centrifugación de las muestras para obtener los plasmas deben ser uniformes.

d) El modo de agregar y d mezclar los reactivos, también hay que estandarizarlos.

e) La manera y la frecuencia en el movimiento de los tubos donde se observa la formación del coagulo.

f) El punto final d la prueba: si se acepta como mallas de fibrina o como coagulo formado

g) El modo de reportar los resultados: reportar siempre los tiempos del control y del paciente y los valores normales del método empleado.

4.2 Coagulopatías.

Las Coagulopatías constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que involucran el proceso de coagulación sanguínea del cuerpo, que son producidas por alteraciones de las proteínas plasmáticas. Las cuales pueden llevar a que se presente sangrado intenso y prolongado después de una lesión; ya que existe deficiencia de un solo factor de la coagulación donde el más común es Factor I (Fibrinógeno)

Para determinar las Coagulopatias se dispone de 2 tipos de pruebas: Cualitativas y Cuantitativas.

Cuantitativas: Nos permite la cuantificación individual de los distintos factores.

- Tiempo de Coagulación
- Tiempo de Protombina
- Tiempo parcial de Tromboplastina
- Tiempo de Sangría
- Tiempo de Lisis de Euglobinas.
- Recuento de Plaquetas
- Radioinmunoensayo
- Test de Reptilasa

Cualitativas: Las pruebas que nos permite analizar varios componentes a la vez

- Tromboelastogramas
- Determinación genéticas del ADN
- Métodos Inmunológicos(Inmunodifusion)
- Electroforesis

4.3 Pruebas Cuantitativas:

Recuento de plaquetas.

Introducción.

Los métodos para el conteo de plaquetas tropiezan con muchas dificultades debido a la propiedad que tienen estos elementos de adherirse con gran facilidad a superficies extrañas como vidrios, fibras u otras partículas, y también de unirse entre sí (agregación). Por esto ha que tener en cuenta durante la realización del conteo:

- El tipo de material para la extracción, recolección de la sangre realización de la prueba, este debe ser plásticos o de vidrio siliconado.
- La muestra de sangre ya sea venosa o capilar deberá tomarse con EDTA.
- Con respecto a los líquidos de dilución se utilizara oxalato de amonio al 1%.

Es muy útil porque es fácilmente disponible se corresponde bien con la tendencia hemorrágica. El recuento normal es de 150-400.000 plaquetas/ mmc. Actualmente l métodos de elección es el automatizado, sin embargo en Nicaragua aun se realiza por métodos manuales.

Fundamentos.

La sangre se diluye en una solución de oxalato de amonio al 1%, que produce una lisis de los eritrocitos maduros, preservando las plaquetas, leucocitos y reticulocitos; evita la aglomeración plaquetaria y facilita su disposición para el conteo.

Tiempo de Coagulación (Métodos Lee White).

Introducción.

La prueba de coagulación o método de Lee Cité evalúa el sistema intrínseco de la coagulación y el uso de heparina en la terapia anticoagulante. La prueba consiste en extraer sangre con jeringa descartable y depositarla en 3 tubos previamente rotulados, en los cuales se va a evaluar el tiempo de formación de coágulo.

Tiempo de Protrombina (TP) o (Tiempo de Quick)

Introducción.

El tiempo de Protrombina es utilizado como pruebas de entrada en un estudio de coagulación, también como prueba preoperatorio, y es la más indicada para el control de la terapia anticoagulante con drogas cumarínicas, ya que debido a la gran variación individual a los anticoagulantes, se hace necesario un adecuado control de laboratorio.

Lo que se persigue con la terapia anticoagulante es obtener un efecto antitrombótico mediante la reducción de la coagulabilidad de la sangre, pero manteniendo una buena hemostasia, es decir, que no ocurra sangramientos. El único camino para alcanzar este balance es ajustar las dosis de anticoagulante, de acuerdo a los resultados obtenidos de pruebas de laboratorio (Tiempo de Quick en este caso), realizadas regularmente en la sangre del paciente.

Valora la vía extrínseca a los Factores II, V, VII, VIII, X. El valor normal es de 1-1.2 y en actividad de 75-100%.

El TP está prolongado en deficiencias (30-40%) de factores VII, X, V, II de Fibrinógeno. Un TP a 1.6-1.7 se correlaciona con el déficit de factores de coagulación el riesgo de hemorragia.

Fundamentos.

Esta prueba se utiliza de rutina en los laboratorios de la hemostasia para evaluar el sistema extrínseco de la coagulación. Consiste en medir el tiempo que tarda en

coagular un plasma, al recalcificarlo en presencia de un exceso de tromboplastina tisular.

En ellas se obvia la acción de los factores de la vía Intrínseca para activar al Factor X. Además, como el principio activo de los extractos tisulares es un complejo lipoproteico, los fofolipidos del reactivo actúan como sustitutos de los fofolipidos plaquetarios por tanto, la prueba no requiere de la acción de plaquetas. Se fundamenta en la reacción de la tromboplastina tisular con el Factor VII en presencia de iones de calcio, para activar al Factor X. El factor Xa forma un complejo enzimático con el Factor V, calcio y el fofolipido (del reactivo) para generar actividad tromboplastica por vía Extrínseca, que convierte la protombina en trombina. La trombina transforma el Fibrinógeno en fibrina.

Tiempo Parcial de Tromboplastina (TPT sin activar).

Introducción.

El tiempo Parcial de Tromboplastina es la prueba de selección para medir el sistema Intrínseco de la coagulación. Esta prueba a sustituido al Tiempo de coagulación de sangre total de Lee White, que era la más utilizada para evaluar el sistema Intrínseco de la coagulación para el control de la terapia anticoagulante con heparina, por ser as sensible, precisa reproducible. Se basa en medir el tiempo de coagulación de un plasma al recalcificarlo en presencia de un sustituto plaquetario: la tromboplastina parcial.

La tromboplastina parcial se obtiene de los extractos tisulares de órganos ricos en tromboplastina, como el cerebro. Se sabe que el principio activo, con propiedades coagulantes de estos extractos tisulares es un complejo lipoproteico. Por extracción de ciertos solventes de las grasa como el cloroformo se extrae solo la fracción lipídica por eso se le llama tromboplastina parcial, ella va a realizar en le prueba, el mismo papel de FP - 3, actúa un sustituto.

El reactivo de Tromboplastina Parcial puede venir mezclado con sustancia activadoras por tanto hay 2 tipos de pruebas:

1. TPT no activado.
2. TPT activado.

Fundamentos.

Esta prueba se fundamenta en recalcificar un plasma pobre en plaquetas, en presencia de un sustituto plaquetario. No es utilizada de entrada en un estudio de coagulación, sin embargo se ha incluido aquí para poder explicar mejor la de TPTa.

Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa).

Fundamentos.

Esta prueba mide el tiempo de coagulación de un plasma al ser recalificado en presencia de una tromboplastina parcial (sustituto plaquetario) y de una sustancia activadora, que proporciona una máxima superficie de contacto, obteniéndose resultados más reproducibles.

Valora la vía intrínseca. Detecta deficiencia de todos los factores excepto los Factores VII XIII, así como la presencia de anticoagulantes circulantes. Niveles factoriales inferiores a 20 – 40% alargan el TTPa. Un TTPa 1.5 se correlaciona como déficit de factores y el riesgo de hemorragia. Es la prueba as utilizada para el control del tratamiento con heparina.

Como sustancias activadoras se puede emplear: caolín, ácido elágico, celite, sílica, etc. Como sustituto plaquetario utilizan inosina, cefalina, etc. Esta técnica se utilizara, por ser caolín as sensible que otras sustancias activadoras, para detectar deficiencias leves de los factores VIII y IX y niveles bajos de heparina.

Tiempo de Trombina (TT).

Es el tiempo que tarda en coagular un plasma al añadir trombina. Esta prolongada en la alteraciones del fibrinógeno, presencia de heparina, presencia de inhibidores de formación de fibrina (antitrombinas) y aumento de inhibidores de la polimerización de la fibrina (Productos de Degradación del Fibrinógeno).

Tiempo de Lisis de Euglobinas (TLE).

Valora el tiempo de lisis del coagulo formado con la fracción euglobinica del plasma que tiene casi la totalidad del fibrinógeno, del plasminogeno de los activadores de plasminógeno peor no tiene inhibidores de la fibrinólisis, por tanto nos da información útil sobre la actividad fibrinolítica.

Tiempo de sangría o de sangrado (Método de Duke).

Fundamento.

Mide la duración del sangrado cuando se hace una incisión en el lóbulo de la oreja

Introducción.

El tiempo de sangría mide el tiempo que tarda en detenerse el sangrado de una pequeña herida realizada en la piel, bajo condiciones estandarizada. Es la expresión misa de la hemostasia primaria, ya que el sangrado se detiene porque las plaquetas se adhieren a la membrana basal y al colágeno que han quedado

**BIBLIOTECA
U C E M**

expuesto por la herida, luego sufre agregación lo que da como resultado la formación del tapón hemostático. El tiempo de sangría es, por lo tanto, una medida de número y del estado funcional de las plaquetas. Es influenciado también por la calidad de los pequeños vasos y por un factor plasmático el Factor VIII: Vw, así como también por el fibrinógeno. Es la única prueba global que permite medir in vivo la reacción plaqueta endotelio, demuestra la capacidad hemostática de las plaquetas.

Se han descrito varios métodos, la selección de la técnica varía de laboratorio a laboratorio. Como las técnicas utilizadas son diferentes, resultan difícil interpretar los datos obtenidos, los valores normales oscilan entre un amplio rango. El tiempo de hemorragia normal es de 2 a 3 minutos.

4.4 Pruebas Cualitativas:

Tromboelastogramas:

Es un método que valora la dinámica de la elasticidad del coagulo a su formación, maduración, retracción lisis, ya que examina la coagulación en sangre fresca valorando así la interacción de todos los componentes de la coagulación. Es un método muy útil para valoración de la coagulación durante la cirugía.

Al contrario de los métodos cuantitativos que estudian únicamente muestras de sangre aisladas y tienen el inconveniente de no valorar los efectos de los diferentes elementos celulares y humorales (temperatura, pH, calcemia) que intervienen en las alteraciones de la coagulación, tampoco miden la calidad de los factores, falta por conocer el nivel crítico de cada uno de ellos.

Determinaciones genéticas mediante análisis de ADN.

Este tipo de análisis involucra la determinación de la estructura del ADN en una región limitada del genoma del individuo bajo estudio. También puede analizarse la cantidad de moléculas de ARN, de un determinado gen, presente en un tejido.

Los estudios del ADN de un individuo pueden resultar de utilidad en las siguientes situaciones: en algunos casos se intenta determinar si un individuo normal posee una copia de algún gen alterado que puede ser transferido a su descendencia y bajo otras condiciones o en conjunción con el acervo genético del otro progenitor, generar una enfermedad.

Esto se conoce como análisis de portadores. En este caso, en general, el estudio se orienta a partir de sospechas específicas por datos previos familiares. El estudio de portadores puede además tener como objeto el estudio de la penetración de una determinada anomalía genética en una población.

Inmunodifusión: Es un método inmunológico sencillo y rutinariamente usado en el laboratorio clínico para la detección de antígenos o anticuerpos en una muestra biológica. Es considerado el proceso estándar para la detección de Antígenos Nucleares Extraíbles (ENA).

Electroforesis: Es una técnica de laboratorio, en la cual la porción líquida de la sangre (suero) se coloca en un papel especialmente tratado y se expone a una corriente eléctrica. Las proteínas se mueven o migran en el papel, con el fin de formar bandas que muestran la cantidad de cada fracción de proteína, en relación con otras fracciones de proteína

4.5 Características clínicas de las Coagulopatias

Se caracterizan por:

- Ser afecciones poco frecuentes.
- Presentarse como tasa estable (el factor deficiente en un mismo individuo y en una misa familia).

Por su clínica:

- Menorragias.
- Hemorragias como cutáneo mucosas postoperatorias, equimosis, hemartrosis si es precoz (caída del cordón umbilical).
- Algunos nos presentan síndrome hemorrágico; ni espontáneo; ni traumático

4.6 Sintomatología según los Factores de Coagulación

Factor I:

- Se caracteriza por no presentar hemorragias
- Cicatrización defectuosa post operatorio
- Transcurre asintómicamente durante largo periodos

Factor II:

- Epistaxis
- Hematurias
- Hematoma
- Hemartrosis
- Hemorragia gastrointestinal en el neonato.

Factor V:

- Hemorragias cutáneas.
- Hemorragias en las mucosas.
- Menorragias, postraumáticas y postoperatorias.

Factor VII:

- Este déficit presenta síndrome hemorrágico precoz y severo.
- Menorragia.
- Hemartrosis.
- Hemorragias del SNC.

Factor VIII :

- Se caracteriza por presentar hemorragias precoz, provocadas, retardadas
- Hemartrosis postoperatorios
- Hemorragias del SNC.

Factor X

- Sangrado nasal.
- Sangrado al interior de las articulaciones.
- Sangrado muscular.
- Sangrado de membrana mucosa.
- Sangrado post parto.
- Equimosis.
- Menorragias.
- Sangrado gastrointestinal.
- Sangrado del sistema del Sistema Nervioso Central.
- Severas hemorragias postoperatorias.

Factor XII (Factor Hageman.)

La mayoría de los pacientes son asintomáticos en donde muy raramente se presentan sangrados, presentando también trombosis.

Déficit Factor Passovoy.

Se caracteriza por diátesis hemorrágicas moderadas y su papel en la coagulación no está bien esclarecido.

Factor Fletcher

Se caracteriza por no presentar síndrome hemorrágico.

Factor Fitzgerald.

Este defecto se caracteriza por no presentar síntomas hemorrágicos.

Para el diagnóstico de las coagulopatías se debe proceder según las normas internacionales, las cuales están divididas en tres fases o niveles:

En la primera fase se realiza el diagnóstico general que evalúa la hemostasia primaria secundaria a través de pruebas globales como:

- a) Tiempo de coagulación.
- b) Tromboelastografía.
- c) Tiempo de sangrado.
- d) Conteo global de plaquetas.

En la segunda fase se realizan las pruebas semi-analíticas como:

- a) Tiempo de Quick (Tiempo de Protombina) que mide la vía Extrínseca (Factor VII) más la vía común (Factores X, V, II, I).
- b) Tiempo Parcial de Tromboplastina que evalúa la vía Intrínseca (Factores XII, XI, IX, VIII,) más la vía común (Factores X, V, II, I).
- c) Tiempo de trombina.
- d) Test de Reptilasa que evalúan la fibrinoformación.

En la tercera fase se realiza la dosificación de los diferentes factores individualmente:

- a) Dosificación inmunológica a la detección específicas de anticuerpos
- b) Dosificación físico - química (por ejemplo el Fibrinógeno).

4.7 Métodos y técnicas empleadas para el diagnóstico de las coagulopatias

Las coagulopatias se manifiestan la mayoría de las veces como enfermedades hemorrágicas es por eso que su diagnostico se basa en una buena historia clínica y en estudios de laboratorio. Para cada factor de la Coagulación corresponden las siguientes pruebas y métodos para determinar en q lugar se encuentra el daño.

Factor I: (Fibrinógeno).

Por muchos años, la medida de Fibrinógeno ha sido particularmente dificultosa para los laboratorios clínicos, debido a la gran cantidad de métodos que existen basados en diferentes principios, a la carencia de patrones de Fibrinógeno disponible en el comercio.

Debido a que el Fibrinógeno mide la fase final de la coagulación, no se debe incluir dentro de las pruebas de selección, además, en el uso de diferentes métodos, se ha encontrado variabilidad en los resultados, siendo un objetivo primordial, la búsqueda de un método que reúna condiciones de sencillez, exactitud, rapidez y confiabilidad en el menor tiempo posible.

Mediante la coagulación.

Estos se basan en separar el fibrinógeno del plasma mediante la coagulación por trombina o calcio. Como miden proteína coagulable, son más precisos que los métodos basados en la precipitación del fibrinógeno por sales, ya que en estos últimos pueden precipitarse otras proteínas.

Método de clauss.

La determinación del Fibrinógeno debe realizarse después que el tiempo de Protombina de alargado, para comprobar si la causa de ello es una hipofibrinogenemia.

La prueba de Clauss es en ciertos casos considerada la prueba as útil para el diagnostico, tratamiento intravascular diseminada uno de los mejores ejemplos.

Fundamentos.

Se basa en medir el tiempo de coagulación de un plasma diluido (concentración baja de Fibrinógeno: sustrato) una alta concentración de trombina, lo que hace muy sensible a los cambios de concentración de Fibrinógeno, pero relativamente insensible a los de la concentración de trombina.

Métodos físico-químicos.

Estos métodos utilizan varios procedimientos: unos se basan en precipitar el Fibrinógeno mediante calor (Millar y col...1971), otros en el fraccionamiento de la Proteínas soluble mediante sales (Goodwin 1961; Rampling y Gaffney 1976) otros, en la precipitación por sales, pero estos métodos han sido muy criticados por su falta de precisión (Goodwin 1961) Steven Felippo 1973; Koepke 1975) sin embargo, son as sencillos y consumen menos tiempo que los basados en la coagulación de la proteína, lo cual es de gran valor par a las emergencias del laboratorio clínico, como en casos de CID.

A continuación se menciona los diferentes métodos para la edición del Fibrinógeno mediante métodos físico-químicos.

- Por precipitación mediante calor (Millar, Simpson y Stalker. 1971).
- Por precipitación mediante sales:

Métodos inmunológicos.

Fundamento.

Los procedimientos inmunológicos se basan en la especialidad de la unión Ag- Ac. La propiedad que tiene las Inmunoglobulinas de unirse a un Antígeno, la especialidad de esta unión y el hecho de que pueda ser visualizada por los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, con radioisótopos o con enzimas), hace que estos métodos se empleen ampliamente.

A continuación se menciona los diferentes métodos inmunológicos en el estudio de la coagulopatias, estos se dividen en:

Métodos de precipitación.

Inmunodifusion.

Técnica en la que existe difusión de antígeno o anticuerpo a través de un medio semisólido, usualmente gel de agarosa, siendo el resultado una reacción de precipitina.

Tipos de Inmunodifusión.

Métodos Cualitativos.

- Inmunodifusión sencilla (William 1970).
- Inmunodifusión doble (Garvey 1970).
- Inmunodifusión doble en 2 dimensiones (William 1970).
- Reacción de electroinmunodifusión (Ritzmann 1975).
- Inmunolectroforesis (Rose 1973).

Por Radioinmunoensayo.

El Radioinmunoensayo (RIA) se basa en detección de reacciones Ag- Ac con conjugados marcadas con isótopos radioactivos.

Es de mucha importancia para la cuantificación de hormonas dado la competencia que se establece, para unir anticuerpos específicos, entre la sustancia a cuantificar y cantidades conocidas de la misma sustancia marcada con un isótopo. Al establecerse esta competencia resultan que a mayor cantidad de sustancia a cuantificar, menor será la cantidad de sustancias radioactiva que se une al anticuerpo viceversa.

Tipos de RIA.

- RIA directo.
- RIA de inhibición

Test de Reptilasa.

Fundamento.

La reptilasa es un veneno de serpiente que contiene una enzima que promueve la conversión del fibrinógeno en fibrina por una reacción proteolítica similar, aunque no idéntica, a la que ejerce la trombina.

La reptilasa desdobra los fibrinopeptidos A de la molécula de fibrinógeno; al liberarse los fibrinopeptidos A, el resto de la molécula comienza a polimerizar de modo espontáneo forma el coágulo.

4.8 Pruebas requeridas según cada Factor de la Coagulación

Factor I

- Tiempo de sangría
- Tiempo de Protombina
- Tiempo Parcial de Tromboplastina Activado
- Tiempo de Trombina
- Test de Reptilasa
- Trombina coagulasa
- Nivel de Fibrinógeno
- Ensayo Inmunológico del Fibrinógeno
- Recuento plaquetario
- Test fibrinolítico.

Factor II (Protombina):

- Tiempo de protombina
- Tiempo parcial de tromboplastina
- Tiempo de trombina.
- Recuento Plaquetario
- Métodos del Fibrinógeno

Factor V:

- Tiempo de Quick (Tiempo de Protombina)
- Tiempo Parcial de Tromboplastina
- Determinación de Factor V
- Tiempo de Trombina.
- Tiempo de sangrado.
- Presencia de Ac. Adquiridos.
- Tiempo de coagulación.
- Recuento de plaquetas.

Factor VII:

- Tiempo de Quick (Tiempo de Protombina).
- Tiempo Parcial de Tromboplastinas.
- Tiempo de trombina.
- Tiempo de sangrado.
- Tiempo de coagulación.
- Recuento de plaquetas

Factor X:

- Tiempo de Quick (Tiempo de protombina).
- Tiempo Parcial de Tromboplastina Activado.
- Tiempo de Trombina.
- Tiempo de Sangría.
- Recuento de Plaquetas.

Factor XI:

- Tiempo de Quick (Tiempo de protombina).
- Tiempo parcial de Tromboplastina Activado.
- Protombina Residual del suero.
- Tiempo de Trombina.
- Tiempo de Sangrado.
- Recuento de Plaquetas.

Factor XII:

- Tiempo de Quick (Tiempo de Protombina).
- Tiempo parcial de Tromboplastina Activado.
- Tiempo de Trombina.
- Tiempo de Sangría.
- Recuento de Plaquetas.

Factor XIII:

- Tiempo de Quick (Tiempo de Protombina).
- Tiempo parcial de Tromboplastina Activado.
- Tiempo de Trombina.
- Recuento de Plaquetas.

Factor Fletcher:

- Tiempo de Quick (Tiempo de Protombina).
- Tiempo parcial de Tromboplastina
- Recuento de Plaquetas.

Factor Fitzgerald:

- Tiempo de Trombina
- Tiempo parcial de Tromboplastina

Factor Passovoy:

- Tiempo parcial de Tromboplastina

5.0 Procedimientos Técnicos de las diferentes pruebas de la Coagulación.

Tiempo de sangría o de sangrado

Materiales.

1. Lancetas.
2. Algodón con alcohol y seco.
3. Papel filtro.
4. Bisturí.
5. Laminas porta objeto.
6. Cronometro.
7. Curas.

Procedimiento.

- a. Limpiar el lóbulo de la oreja con alcohol y dejarlo secar.
- b. Hacer una incisión de forma horizontal de unos 3 mm de profundidad, con lancetas descartables o con una hojilla de bisturí, para obtener mejores resultados se puede apoyar un corcho en la parte posterior del lóbulo.
- c. Al realizar la incisión se pone a andar un cronometro.
- d. Cada 30 segundos se van recogiendo con un papel filtro las gotas que van apareciendo sin tocar el coagulo que se está formando, solo la capsula de la gota. Continuar el proceso, hasta que cese el flujo de sangre y detener el cronometro cuando ello suceda.

Valores Normales.

El tiempo de sangría por este método es de 1 a 4 minutos. En ocasiones puede fluir, al principio, gotas de sangre muy grandes y luego detenerse el sangramientos en 2 a 3 minutos. Esto puede suceder por cortar un vasito de mayor calibre que lo estandarizando en la prueba; si el sangramientos no cesa en u tiempo normal, hay que repetir la prueba en el otro lóbulo.

Esta prueba ha sido muy criticada debido a la falta de reproducibilidad de los valores obtenidos en un mismo paciente. Se recomienda realizarla solo en niños pequeños debido en la incomodidad para realizar otros métodos, y utilizar hojillas de bisturí y no lancetas descartables.

Recuento de plaquetas

Materiales.

1. tubos de vidrios o de plásticos.
2. Agujas 21x1/2.

3. Anticoagulante EDTA (Utilizarlo en producción de 1 gota de solución de EDTA al 10% para 5 ml de sangre.
4. Capilares con heparina.
5. Plato de petri.
6. Cámara de Neubauer.
7. Lancetas.
8. Gasas.
9. Microscopio de contraste de fase o de campo claro.
10. Contador manual.
11. Pipetas de Thomas para glóbulos rojos.
12. Solución diluyente oxalato de amonio al 1%.
13. Curas.
14. Agitador de pipetas.

Procedimiento.

- a. La sangre se diluye 1:1000 en una pipeta de Thomas para glóbulos rojos utilizando oxalato de amonio al 1%.
- b. Tomar sangre hasta la división 1 de la pipeta y liquido de dilución hasta que la mezcla llegue al 101, siendo los cuidados conocidos del enrace de las pipetas.
- c. Mezclar en agitador por 3 minutos.
- d. Descartar de 3 a 4 gotas, y colocar 1 gota en la cámara Neubauer en ambas cutículas.
- e. Dejar en reposo por 10 minutos en cámara húmeda.
- f. Proceder a realizar el conteo según procedimiento preestablecido.
- g. Realizar cálculo.
- h. Reportar el conteo global.

Valores Normales.

De 150,000 -450,000x mm³.

Tiempo de coagulación

Materiales.

1. tubos de vidrios de 12x 75 mm.
2. Algodón con alcohol y seco.
3. Jeringas descartables de 5 o 10 cc.
4. Cronometro
5. Torniquete.
6. Baño de Maria.
7. Curas.

Procedimiento.

- a. colocar el torniquete, y seleccionar vena donde se va realizar la punción.

- b. Extraer la sangre, echar andar inmediatamente el cronometro.
- c. Colocar 1 cc de sangre en 3 tubos previamente rotulados.
- d. Colocar 1 de los tubos en baños de Maria a 37 C y los otros 2 a temperaturas ambiente.
- e. Inclinar los tubos cada 30 segundos hasta que se forme la malla de fibrina.
- f. El reporte se hará sumando el tiempo de coagulación de los tres tubos y luego la división de los tres, este será el valor final del tiempo de coagulación.

Valores Normales.
DE 4 a 10 minutos.

Tiempo de Protombina (TP)

Materiales.

1. Pipetas automáticas que midan volúmenes de 0.1 y 0.2 ul.
2. Puntas para pipetas automáticas.
3. Cronometro.
4. Baño Maria.
5. Tubos de ensayos 13 x 75 mm.
6. Coagulometro.
7. Reactivo para la determinación de TO.

Procedimiento.

- a. Calentar a 37 C el reactivo, muestra y controles por 5 minutos.
- b. Mezclar bien el reactivo sin agitarlo.
- c. Pipetear en un tubo de ensayo limpio y seco 100ul de plasma citratado, 200 ul de reactivo de tromboplastina- calcio.
- d. Mezclar y activar el cronometro.
- e. Comenzar a leer, detener el cronometro cuando se hay formado la fibrina.
- f. Reportar el valor obtenido en segundos.

Valores Normales.

De 13 - 17 segundos.

Tiempo Parcial de Tromboplastina (TPT sin activar).

Materiales.

1. Pipetas automáticas que midan volúmenes de 0.1 y 0.2 ul.
2. Puntas para pipetas automáticas.
3. Cronometro.
4. Baño Maria.
5. Tubos de ensayo 13 x 75 mm.
6. Coagulometro.

7. Reactivo para la determinación de TPT (Cefalina) plasma frescos citratados, cloruro de calcio 0.025 M.

Procedimientos.

- a. Extraer sangre con todas las precauciones conocidas, utilizando materia plásticos o vidrio ciliconado y verterla en un tubo plástico o ciliconado que contiene solución de citrato de sodio 0.109 M, en la proporción de 1 volumen de anticoagulante por 9 volúmenes de sangre.
- b. Centrifugar la sangre a 3500 rpm durante 10 minutos, a fin de obtener PPP y remover el plasma, utilizando plásticos, a un tubo plásticos provistos de tapa.
- c. Precalentar la solución de CaCl_2 en el baño de Maria a 37 C.
- d. Colocar 6 tubos 12 x 74 mm en el baño de Maria y agregar en el primero: 0.1 de plasma y 0.1 ml cefalina. Mezclar. Poner a andar el cronometro de incubación, incubar durante un tiempo de 30 segundos
- e. Agrega 0.1 ml de CaCl_2 de modo fuerte para que se mezclen todos los reactivos. Mezclar conjuntamente, poner a andar el cronometro al momento de la mezcla. Dejar el tubo 50 segundos en el baño de Maria.
- f. Sacar el tubo del baño de Maria, inclinarlo en ángulo de 90 e introducirlo de nuevos, repitiendo este proceso periódicamente no más de 1 vez por segundo, hasta observar la aparición de la primeras mallas de fibrinas; conjuntamente detener el cronometro.
- g. Realizar los pasos descritos con el control, con el paciente y con la mezcla C/P, por duplicado y en orden balanceado. Para deducir el promedio, hay que tener presente las diferencias permitidas entre 1 tubo y otro.

Valores Normales.

Los valores normales oscilan entre 60 y 100 segundos. Estos valores corresponden a los que se deben obtener con un plasma control y sirven para chequear los reactivos. En realidad los valores normales de la prueba deben darse en términos de diferencias de tiempo de coagulación del paciente menos el tiempo de coagulación del control (P-C). Una prueba se considera normal cuando esta diferencia no es mayor o menos de 10 segundos.

Tiempo Parcial de Tromboplastina (Activado).

Reactivos.

1. Plasmas citratados.
2. mezclar plasma control/ plasma 50/50 (C/P), prepararla momentos antes de comenzar la prueba.
3. Tromboplastinas parcial(cefalina).
4. Suspensión de caolín al 0.5%.

5. Solución de cloruro de calcio 0.025 M. preincubada por los menos 10 minutos antes de la prueba.

Procedimiento.

- a) Marcar 6 tubos 10 x 75 mm. Del 1 al 6 pipetear 0.1 ml de la suspensión en c/u de los tubos y mantenerlos a temperatura ambiente.
b) Colocar el tubo 1 en el baño de Maria, agrégale 0.1 de plasma

Control, mezclar y conjuntamente marcar el cronometro de incubación.

- a) Cuando el cronometro marque aproximadamente 50 segundos, elevar el tubo 2 al baño de Maria y al minuto exacto agregarle 0.1 ml de plasma del paciente y mezclar.
b) A los 2 minutos 50 segundos se lleva el tubo 3 al baño de Maria y a los 3 minutos exactamente se agrega 0.1 de la mezcla C/P, se mezcla.
c) A los 4 minutos 50 se lleva el tubo 4 al baño de Maria y a los 5 minutos exactamente, se agrega 0.1 ml de la mezcla C/P, se mezcla.
d) A los 6 minutos 50 segundos aproximadamente se lleva el 5 al baño de Maria y a los 7 minutos exactos se agrega 0.1 ml de plasma paciente, se mezcla.
e) A los 8 minutos 50 segundos aproximadamente se lleva el tubo 6 al baño de Maria y a los 9 minutos se agrega 0.1 ml de plasma control.
Así se tienen en incubación muestras del control, paciente y mezcla C/P por duplicado y en orden balanceado.
f) Cuando el cronometro se aproximen a los 10 minutos, se agrega 0.1 ml de cefalina al tubo 1 y a los 10 minutos exactos, se le añade la solución de CaCl₂ preincubada, se mezclan y conjuntamente se marca otro cronometro para medir el tiempo de coagulación.
g) A los 10 minutos 50 segundos, en el cronometro de incubación, se agrega 0.1 ml de cefalina al segundo tubo y exactamente a los 11 minutos, agrega 0.1 ml de CaCl₂, se marca otro cronometro y se mide el tiempo de coagulación.
h) El procedimiento anterior es repetido con dos minutos e intervalos en los tubos 3, 4, 5 y 6; así, a los 12 minutos 50 segundos se agrega 0.1 ml de cefalina al tubo 3 y a los 13 minutos exactos, 0.1 ml de CaCl₂ y se mide el tiempo de coagulación.

Se continúa de igual modo hasta llegar al sexto tubo.

Si el plasma del paciente es muy normal, el tiempo de coagulación en los tubos que contiene plasma del paciente, puede pasar de 2 minutos, y por los tanto, traspasar el intervalo establecido para probar el próximo tubo en la serie.

Así, un tubo no ha coagulado a 1 minuto y 45 segundos de haber agregado el CaCl₂, se pone en la gradilla dentro del baño de Maria, mientras se produce se

procede con el tubo siguientes; tan pronto como se ha completado el proceso de agregarle el CaCl₂ se vuelve a inspeccionar el tubo anterior y con algo de práctica, se puede ver los dos tubos conjuntamente hasta que coagulen utilizando relojes por separados para medir los tiempos de coagulación.

Valores Normales.

En términos generales, se da como valores normales de 30 a 50 segundos, pero como se comentó en el TPT estos valores se refieren a los de un plasma control y sirven para chequear el estado de los reactivos. En realidad, los valores del TPTa se dan en términos de diferencia del tiempo de coagulación del paciente menos el tiempo de coagulación de control (P-C). Considerando como cifras normales si la diferencia es menor de 6 segundos.

Ejemplo	Control	45 segundos.
	Paciente	32 segundos.
	Diferencia P-C	-13 segundos.

Esta prueba es anormal, aunque el tiempo de coagulación del paciente se encuentre dentro de los rangos 30-50 segundos.

Tiempo de Trombina (TT).

Reactivos.

- 1) Plasmas citratados: control y paciente.
- 2) Solución de trombina humana o bovina. Diluir de tal forma que los controles estén entre 10 y 22 segundos.

Procedimiento.

a) Se coloca en un tubo 10 x 75 en baño de María a 37 C y en el se agrega:

- 0.2 ml de plasma. Incubar 1 minutos.
- 0.2 ml de la solución de trombina ajustada.

Mezclar y medir el tiempo de coagulación. En esta prueba las mallas de fibrina son muy delicadas, a veces difíciles de observar, por lo que hay que ser cuidadoso en la observación.

b) La prueba se realiza por duplicado, tanto con el control como el paciente y en orden balanceado; siempre hay que procesar el control y no tomar como tiempo el que se obtuvo, cuando se ajusto la trombina.

Valores Normales.

Se considera como valores normales si la diferencia entre los tiempos del paciente y del control no es mayor de 2 segundos.

Ejemplo: Modo de Reportar

Control

20 segundos.

Paciente

21 segundos.

Diferencia P-C

+1 segundo.

V.N de Diferencia

Hasta + 2 segundos.

Test de Reptilasa.

Reactivo.

A) Hay dos tipos de reactivos de reptilasa:

1. Reptilasa R es el nombre del reactivo disponible en el comercio: es un veneno de serpiente Bothrops Atrax y presentado como un polvo por Paines y Byrne LTd, cada vial se reconstruye con 1 ml de agua destilada.
2. El veneno de Bothrops jararacá viene en solución salina en concentraciones aproximadamente de 0.05 mg/ml.

B) Plasma PPP citratados y del paciente.

Procedimiento.

a. Colocar en un tubo 10 x 75 mm pre incubado a 37 C.

-0.2 ml de plasma. Incubar 1 minutos, agregar:

-0.1 ml de reptilasa. Mezclar y conjuntamente marcar un cronometro, medir el tiempo de coagulación.

b. Realizar el mismo procedimiento con plasma control y plasma paciente por duplicado y en orden balanceado.

Valores Normales.

Se considera como valores normales si la deferencia entre los tiempos del paciente y de control no es mayor de 2 segundos.

Ejemplo: Modo de Reportar.

Control

22 segundos.

Paciente

24 segundos.

Diferencia P-C

+2 segundos.

Hasta 2 segundos.

Valores normales de Diferencia:

Observación: Un tiempo de trombina prolongada y un test de reptilasa normal sugieren fuertemente la presencia de heparina; por el contrario un Tiempo de trombina prologado con un test reptilasa alargado, inducen a pensar en un defecto cuantitativo del fibrinógeno, en niveles elevados de PDF o en defectos estructurales del fibrinógeno (disfibrinogenemia).
El test de reptilasa con Bothrops jararacá es más sensible a los PDF que con Bolaos Atox según Giddings 1980.

BIBLIOTECA
U C S M

V. Conclusiones

1. Las características clínicas de los trastornos hemorrágicos son: epistaxis, metrorragias, hemorragias gastrointestinales post operatorias el cual algunos enfermos transcurren prácticamente asintomático durante largos períodos. En la mayoría de los casos a estos pacientes se les detecta estas anomalías hasta el momento de realizar exámenes preoperatorios o cuando estos presentan ciertos síntomas que hacen pensar al médico la presencia de algún defecto en los factores de la coagulación sanguínea.
2. Los métodos a utilizar para el diagnóstico de las coagulopatías, son inicialmente pruebas globales. Luego se realizan pruebas semianalíticas para determinar el déficit de algunos factores, concluyendo el estudio con las pruebas confirmatorias (individuales) de los diferentes factores de coagulación. Entre la más importante están: medidas de polimerización de fibrina, método inmunológico, RIA, medición celular, tromboelastogramas y para confirmar, biología molecular.

BIBLIOTECA
U C E M

VI. Bibliografía

TEXTOS DE REFERENCIA

- Gaudens Lola. "Manual de hemostasia y coagulación sanguínea", Ediciones de la Biblioteca, 1984 Caracas.
- Harmening Dense M. "Clinical hematology and Fundamentals of homeostasis", Thied Edition, 1997.
- Huffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H. *Hematology; Basic Principles and practice*. 4th ed. Philadelphia, Pa; Churchill Livingstone: 2004.
- Pizzuto Javier, Durantes Samuel "Hemorragia Trombosis", Grupo cooperative latinoamericano de hemostasis y trombosis, 1982, México, DF.
- Mackenzie Shirlyn B. "HEMATOLOGIA CLINICA" 2da. Edición, Editorial manual Moderno, 2000, México, DF.
- McPherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 21 st ed. St. Louis, Mo: WB Saunders; 2006: 741.
- María Luz Marcos.ana I Rosell Mas.F.Javier Rafecas Renau.Hemostasia y trastornos Hemorrágicos.

REFERENCIAS ELECTRONICAS.

- Bases bioquímicas de la coagulación sanguínea.
www.uv.es/oconnor/edicina/hemostasia-AB.ppt.
- Jaime Escobar Cardona, M. D.Sangrados gastrointestinales.
Encolombia.com/.../images/gastro/16101-10-4.jpg
Epitaxis.

María Luz Juan Marco, Ana I. Rosell Mas, F Javier Rafecas Renal, Hemostasia y
trastorno hemorrágico
www.google.com
www.encarta.com

Dra. Susana Der Parsehian. Pruebas de Hemostasias para detecta trastornos
adquiridos congénitos Parsegh@dynamo.com.ar