

## ORGANIZACIÓN DE LA SECCIÓN DE HEMOSTASIA

*Autoras*                      Dra. Tania Carballo Treto  
                                     Lic. Rosalia Baltar López  
                                     Lic. Gladys Fleites Herrera

*Departamento*            Laboratorio Clínico

### CONTENIDO

- Organigrama de la sección
- Preparación de los reactivos
- Estudios que se realizan en la sección:
  - ✧ Tiempo de protrombina (método de Quick)
  - ✧ Tiempo parcial de tromboplastina con caolín (método de Rapaport)
  - ✧ Tiempo de trombina.
  - ✧ Curva patrón para dosificar factores
  - ✧ Dosificación de factores II, V, VII, VIII, IX, X, XI.
  - ✧ Corrección de Factor II, V, VIII, IX.
  - ✧ Prueba cualitativa para determinar presencia de inhibidores Factor VIII
  - ✧ Inhibidores de Factor VIII (cuantitativo)
  - ✧ Estabilizador de fibrina factor XIII.
  - ✧ Generación de trombina.
  - ✧ Consumo de protrombina o protrombina residual (método de Stefanini)
  - ✧ Tiempo de reptilasa.
  - ✧ Conteo de células endoteliales.
  - ✧ Prueba de gelación con etanol.
  - ✧ Prueba de sulfato de protamina.
  - ✧ Prueba de sulfato de protamina (semi-cuantitativa).
  - ✧ Lisis de la euglobulina.
  - ✧ Productos de degradación del fibrinógeno (Thrombo Wellcotest)
  - ✧ Dosificación de plasminógeno.
  - ✧ Tiempo de sangramiento. Ivy.

- ✧ Prueba del lazo (Método de Rumpel Leede)
- ✧ Plaquetas por láminas.
- ✧ Conteo de plaquetas.
- ✧ Adhesividad plaquetaria. Método de Salzman.
- ✧ Agregación plaquetaria. Microscópica. Método de Born.
- ✧ Disponibilidad de Factor Plaquetario (Hardisty)
- ✧ Liberación de Factor Plaquetario 3 (Prueba de Spaet)
- ✧ Retracción cuantitativa del coágulo.
- ✧ Tromboelastografía.
- ✧ PDF
- ✧ Dímero D
- ✧ Funcionamiento del coagulómetro Start 4
  - ✦ Técnica del Tiempo de Protrombina
  - ✦ TPT activado
  - ✦ Dosificación cuantitativa de fibrinógeno (método de Quick)
  - ✦ Tiempo de trombina
  - ✦ Curva de dosificación de factores

### **Organigrama de la sección**

En el laboratorio de hemostasia se realizan los estudios de la coagulación, fibrinólisis y plaquetas mediante un grupo de procedimientos a los pacientes ingresados, pacientes de consulta externa y pacientes remitidos de otros centros.

### **Preparación de reactivos**

#### **Citrato de sodio 0.109 M**

Citrato sodio 3.8 g, sal cristalizada 5.5 H<sub>2</sub>O en 100 mL H<sub>2</sub>O destilada.

Citrato sodio 3.2 g, sal cristalizada 2 H<sub>2</sub>O en 100 mL H<sub>2</sub>O destilada.

#### **Cloruro de calcio 0.1M**

Cl<sub>2</sub> = 35,5 X 2 = 71.0

Ca = 40

111.0 g es el PM

11,1 g -----> 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada

Si el PM es 147.02 g: disolver 7,351 g en 500 mL de agua destilada

#### **Cloruro de calcio 1.29 %**

CaCl <sub>2</sub> -----	1.29 g
H <sub>2</sub> O csp-----	100 mL

### **Cloruro de calcio 0.025 M**

Mezclar 25 mL solución 0.1 M en H<sub>2</sub>O destilada hasta 100 mL.

### **Cloruro de calcio 0.033 M**

Mezclar 33 mL solución 0.1 M en H<sub>2</sub>O destilada hasta 100 mL.

### **Veneno de víbora de Russell (VVR) (Wellcome)**

Existen 2 formas para reconstituir el reactivo:

- 0.2 mg de material seco: preparar dilución 1-10 000 a partir de solución 0,2 % de lecitina de huevo en solución salina isotónica
- 0.2 mg de material seco: disolver en 2 mL de sol. salina 0.9 %

### **Oxalato de amonio 1 %**

Oxalato de amonio -----	1 g
H <sub>2</sub> O bidestilada -----	100 mL

*Disolver en baño termorregulado a 37°C; almacenar en refrigerador a 4°C*

### **Cloruro de sodio 0,9 %**

Cloruro de sodio -----	9 g
H <sub>2</sub> O destilada, csp.-----	1000 mL

### **Ácido acético 1 %**

Acido acético concentrado ----	1 mL
H <sub>2</sub> O dest. -----	100 mL

### **Ácido tricloroacético 5 % o 50 g/L**

Acido tricloroacético -----	5 g
H <sub>2</sub> O destilada, csp -----	100 mL

### **Ácido monocloraacético 1%**

Acido monocloraacético -----	1 mL
H <sub>2</sub> O destilada, csp -----	100 mL

### **Carbonato de sodio 20 %**

Carbonato de sodio -----	20 g
H <sub>2</sub> O destilada, csp -----	100 mL

### **Hidróxido de sodio 10 %**

Hidróxido de sodio (sosa) ---	10 g
H <sub>2</sub> O destilada, csp -----	100 mL

#### ***Azida Sódica 1 %***

Azida sódica -----	1 g
H <sub>2</sub> O destilada, csp -----	100 mL

#### ***Solución de borato***

Borato de sodio -----	1 g
Cloruro de sodio -----	9 g
H <sub>2</sub> O destilada, csp -----	1000 mL

*(pH 9.0)*

#### ***Plasma adsorbido con sulfato de bario***

- Modo de empleo: por cada mL plasma oxalatado; agregar 75 mg de sulfato de bario; agitar 10 minutos en mezclador; centrifugar por 10 minutos a 3 000 rpm y extraer sobrenadante por decantación. Congelar a -20°C en alícuotas de 1 mL

#### ***Plasma adsorbido con hidróxido de aluminio***

Hidróxido de aluminio-----	1 g
H <sub>2</sub> O destilada_____	4 mL

De esta mezcla utilizar de acuerdo a la titulación

***Titulación:*** hacer diluciones para ver la actividad de hidróxido de aluminio:

- De un pool de plasma poner 1 mL en varios tubos agregándose los siguientes volúmenes de hidróxido aluminio, 0.05 mL, 0.07 mL, 0.1 mL 0.15 mL y 0,2 mL; se adsorbe el plasma y se le realizan tiempos de protrombina según la técnica descrita a continuación. Se escoge la dilución que de más de 5 min. de TP.

#### ***Método de preparación de plasma adsorbido***

- ✧ Preparar pool de plasma normal.
- ✧ Por cada mL de pool de plasma agregar hidróxido de aluminio
- ✧ Colocar en Baño termorregulado a 37°C agitando con aplicadores constante
- ✧ mente, por 5 min.
- ✧ Centrifugar a 3 000 rpm 10 minutos.
- ✧ Adsorber los factores del complejo protrombínico II, VII, IX, X.
- ✧ Decantar en tubo limpio.

- ✧ Realizarle tiempo protrombina que debe ser > 5 min. (asegurar que no hay factores del complejo protrombínico).
- Realizarle también tiempo de trombina que debe dar acortado (hasta 3 sobre control, asegurando aporte de fibrinógeno)

### ***Solución de caseína***

Caseína (Hammaster) -----	15 g
Buffer fosfato salino 0,1M-----	175 mL

- La mezcla es calentada en baño termorregulado a 100°C por 15 o 20 minutos y el pH es ajustado a 7,4 con hidróxido de sodio y el volumen es elevado hasta 250 mL con sol. salina tamponada. La solución puede ser guardada a -20°C en volúmenes de 20 mL.

### ***Buffer fosfato***

Preparar soluciones madres A y B:

#### ***Solución A***

Fosfato monobásico potasio --	20.4 g
H <sub>2</sub> O destilada, csp -----	1000 mL

#### ***Solución B***

Fosfato dibásico de sodio-----	21.3 g
H <sub>2</sub> O destilada, csp -----	1000 mL

#### ***Preparación de Buffer a distintos pH***

<b>pH</b>	<b>sol. A</b>	<b>sol. B</b>
7.2	24 mL	76 mL
7.4	18 mL	82 mL
7.6	13 mL	87 mL
7.7	9.5 mL	90.5 mL
6.4	67.6	32,3

### ***Buffer fosfato salino 0,1 M***

Buffer fosfato pH 7.4 -----	1 volumen
Cloruro sodio 0,9 % -----	1 volumen

### ***Buffer fosfato salino pH 6.4***

Buffer fosfato 0.15 M -----	1 volumen
Cloruro sodio 0,9 %-----	1 volumen

### ***Buffer fosfato citrato pH 6,4***

Sol. stock buffer fosfato 0,15 M	1 volumen
Citrato de sodio 0,1 M -----	1 volumen
• Sol. stock de fosfato disódico anhidro:	
Fosfato disódico anhidrico ----	21.3 g
H <sub>2</sub> O destilada, csp -----	1000 mL
• Sol. stock de fosfato monopotásico:	
Fosfato monopotásico -----	20.4 g
H <sub>2</sub> O, csp -----	1000 mL
Buffer fosfato 0,15 M:	
Sol. stock fosfato disódico anhidrico	27 mL
Sol. stock fosfato monopotásico -----	73 mL

*Este buffer queda con pH = 6.4*

### ***Buffer de imidazol***

Sol. stock de Imidazol 0.2 M	
Imidazol -----	13.6 g
H <sub>2</sub> O bidestilada, csp -----	1000 mL
<i>Solución de trabajo Buffer de imidazol: 0,05 M- pH 7,35</i>	
Solución stock de imidazol ----	25 mL
Ácido clorhídrico 0,1M -----	18.6 mL
Completar con H <sub>2</sub> O destilada hasta ----	100 mL

### ***Buffer Veronal (Owren) Para sustituir al imidazol***

Dietil barbiturato de sodio ----	1175 g
Acido clorhídrico 0.1 M -----	430 mL
Cloruro de sodio -----	14.67 mL
H <sub>2</sub> O bidest. csp -----	2 000 mL

*Ajustar pH % 7.35 y 7.4*

### ***Caolín 40 mg/mL o 4 g %***

Polvo de caolín -----	4 g
Sol. salina fisiológica, csp ----	100 mL

### ***Caolín 5 mg/mL (para la técnica de anticoagulante lúpico)***

Polvo de caolín-----	2.5 g
Diluir en sol. salina	500 mL

### ***Patrón de tirosina (para plasminógeno en plasma)***

Las soluciones stock contienen 36.0 mg

Tirosina -----	36 mg
HCl 0.1N -----	900 mL
Isopropanol --	100 mL

### ***Patrón de plasma normal conteniendo 5 U de trasylol/mL***

- Preparar anticoagulante como:

Citrato de sodio 3.8 %----	95 mL
Agregar un ampula de trasylol---	5 mL
- Se extrae sangre con este anticoagulante en una proporción de 1:10.
- Hacer pool de plasma con muestras de sangre extraídas con anticoagulante indicado
- Realizar dosificación de fibrinógeno a este pool de plasma.
- Conocida la cifra fibrinógeno almacenar en pequeñas cantidades (0,2 mL aproximadamente) a -20°C.

### ***Polvo de cerebro deshidratado***

- Extraer el cerebro de conejo o humano lavando bien con solución salina hasta extraerle toda la sangre adherida a él.
- Extraerle la piamadre y todos los vasos (meticulosamente) con una pinza de disección sin dientes.
- Llevar a un mortero y cubrir con acetona triturar durante 15 minutos.
- Filtrar con gasa triple fina; realizar la operación 3 veces (para deshidratar).
- Llevar a un papel de filtro grande desplazando todo el cerebro por el mismo, cubriéndolo con otro papel hasta que quede bien seco el cerebro, si es necesario cambiar varias veces los papeles de filtro, quedando listo para usar; almacenar a -20°C (congelación).

### ***Preparación tromboplastina***

- Pesar 1 g de polvo de cerebro y agregar 50 mL de solución salina, incubar en baño termorregulado a 45°C por 15 minutos y agitar a intervalos de 5 dos minutos. Filtrar con gasa. Exprimir bien. Almacenar a 4°C.

### ***Preparación de tromboplastina en solución salina***

- Cerebro humano (conejo) negativo para antígenos de los virus B y C y para el virus de inmunodeficiencia humana; son lavados con abundante agua corriente, eliminándose todos los vasos sanguíneos y la mayor materia blanca posible.

- El material es cortado en pequeñas piezas. Se mezclan 100 g del material con 150 mL de solución tampón salino (\*) precalentada entre 37-39°C.
- Licuar la mezcla con una batidora durante 10 minutos o triturar en un mortero hasta que no se detecten partículas.
- Mezclar todas las porciones en un baño termorregulado a 37°C, incubar durante 2 horas y seguidamente añadir el tampón salino en la cantidad de 1/3 de todo el material.
- Centrifugar en porciones por 30 minutos a 1250 g (3 000 rpm).
- Obtener el sobrenadante. Ajustar el pH a 7.3 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Antes de alicuotar se realiza un tiempo de protrombina a un plasma fresco normal, el resultado debe estar entre 12 y 14 segundos. Si el tiempo está acortado menor de 10 segundos diluir con tampón hasta que sea mayor a 10 segundos. La tromboplastina se divide en alicuotas de 2 mL en tubos de cristal bien limpios, se cierran herméticamente y se conservan a -20°C hasta su uso.

(\*) ***Tampón salino***

Solución salina 0.9 %----- 7 partes.

Tampón Veronal pH 7.3 ----- 3 partes:

Tampón Veronal:

Dietilbarbiturato de sodio ---- 5.875 g

Cloruro de sodio ----- 7.335 g

H<sub>2</sub>O destilada ----- 600 mL

Acido clorhídrico 0.1 N ----- 215 mL

*Medir pH 7.3 y completar el litro con H<sub>2</sub>O*

***Cefalina***

- Pesar 1 g de cerebro deshidratado.
- Agregar en una probeta con tapa esmerilada 25 mL de cloroformo.
- Agitar en agitador magnético 2 horas.
- Filtrar en un frasco Kitasato con papel de filtro llevando al vacío (después de filtrar se retira el embudo y se tapa el frasco para continuar con el vacío, mezclando suavemente hasta que se evapore el cloroformo).
- Disolver los lípidos en 12.5 mL de solución salina en agitador magnético.
- Envasar en tubos plásticos pequeños con tapa en volúmenes de 1 mL cada uno y congelar a -20°C.



### **Ácido clorhídrico al 0.1N a partir de HCl concentrado 37 %**

$$N = \% \text{ pureza} \times \text{densidad} \times 10$$

$$\text{Eq-gr} \rightarrow \text{M}$$

$$N = \frac{37 \times 1.19 \times 10}{36.46 \text{ peso molecular}} = 12.07$$

$$36.46 \text{ peso molecular}$$

$$CV = CV$$

$$(12.07)(x) = (1N)(1000 \text{ mL})$$

Donde

- X es 82.85 mL de HCl completar a 1000 mL de agua destilada para obtener 1 000mL de HCl 1N.
- 8.25 ml de HCl a 1000 ml para 0.1N
- Si el por ciento de pureza de HCl es 32 %: 4,8 mL HCl 500 mL.

### **Plasma bovino para la técnica de generación de trombina**

Plasma bovino sacado con oxalato potasio 0.15 M----1 volumen

Buffer fosfato 0.03 M PH 8----- 2 volúmenes

Buffer barbital 0.04 M PH 7.35----- 2 volúmenes

#### **Buffer fosfato:**

- A)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.4535 g/50 mL agua destilada
- B)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  5.933 g/500 mL = 0.067 M

*Si el B es anhidro, en vez de 5.933 se pesa 4.732 g*

Tomar A-27.5 mL y B-472.5 mL Llevar a pH 8 500 mL.

Diluir el doble y queda listo para usar 0.03 M

#### **Buffer barbital:**

0.825 g barbital sódico/100 mL

Ajustar pH 7.35 con 16 mL HCl 0.2M

*Pese 8.25 para 1000 mL*

### **Suero envejecido**

- Incubar un tubo de sangre normal coagulado tres horas a 37°C; adicionar una parte de 0.109 M de sodio citrato a nueve partes de sangre total a el tubo precedido, incubar los tubos por 2 horas adicionales a 37°C, centrifugar 10 min y sacar el suero.
- El suero puede ser usado inmediatamente o guardado a -20°.

- Antes del uso diluir el suero envejecido 1 en 5 con 0.85 % de NaCl (una parte de suero y 4 partes NaCl)

### **Plasma adsorbido**

- El plasma adsorbido es rico en factor V, VII, XI y XII.
- Adicionar 100 mg de sulfato de bario a cada 1 mL de plasma fresco oxalatado (sodium oxalato).
- Mezclar la mezcla por 10 min a temperatura ambiente y 10 min con hielo o refrigeración.
- Centrifugar a 2 500 rpm por 10 minutos y remover el plasma sobrenadante.
- Diluir el plasma adsorbido 1 en 5 con 0.85 % de cloruro de sodio (1 parte de plasma y 4 partes de 0.85 de NaCl)

### **Buffer isotónico salino IBS para preparar el ADP**

2.2 g NaCl: añadir a 1 litro 0.05 M tris buffer pH 7.4

Para preparar el buffer tris se pesan 6.057 g y se completa con 1 000 mL de agua destilada.

### **Tiempo de protrombina (*Método de Quick*)**

#### **Fundamento**

- Cuando a un plasma citratado le agregamos un exceso de tromboplastina y lo recalificamos, el tiempo que demora en producirse el coágulo lo podemos tomar como índice de concentración de los factores que intervienen en la fase extrínseca de la coagulación (I, II, V, VII, X).
- La protrombina también llamada factor II se sintetiza en el hígado siendo uno de los factores vitamina K-dependiente.
- Los anticoagulantes orales inhiben la producción de los factores dependientes de la vitamina K, que son los II, VII, IX y X.
- Esta prueba es más sensible a los defectos de los factores VII, X y V que a la deficiencia de II. El método no detecta disminuciones moderadas de fibrinógeno.
- El calcio actúa en forma iónica y no se consume en el proceso de la coagulación.
- El citrato ioniza el calcio y el oxalato lo precipita.

#### **Objetivos**

- Medir la fase extrínseca de la coagulación sanguínea.

#### **Materiales y equipos**

- Tubos de Kahn (10x75)

- Baño de agua regulable
- Cronómetros

### ***Reactivos***

- Citrato de sodio 3.8 %
- Cloruro de calcio 0,025 M
- Tromboplastina tisular de cerebro humano (curva pat cada vez que se prepara la tromboplastina)

### ***Toma de muestra***

- Se hace una dilución 1:10 con citrato de Na 3,8 %.
- Se toma 1 mL de citrato de Na 3,8 % para 9 mL de sangre total en tubo de plástico o de vidrio siliconado
- Se centrifuga a 3 500 rpm, durante 20 minutos.

### ***Desarrollo de la técnica***

- En un tubo de Kahn (10x75) añadir:
  - ✧ 0,1 mL de plasma pobre en plaquetas
  - ✧ 0,1 mL de tromboplastina
  - ✧ 0.1 mL de  $\text{CaCl}_2$  (0.025 M)
- Echar a andar el cronómetro y esperar 8 seg. a temperatura de 37°C, agitándolo un poco fuerte; posteriormente mirar la formación del coágulo.

### ***Como control se utiliza pool de plasma***

- Valores normales: hasta 3 seg. por encima del control
- Valor terapéutico: el valor terapéutico ideal será de 2: 2,5 veces sobre el tiempo control (en segundos).

### ***Interpretación de los resultados***

#### ***Los resultados pueden expresarse de distintas formas***

- Tiempo de protrombina o tiempo de Quick en segundos.
- Porcentaje actividad protrombínica respecto de un plasma normal (100 % de actividad): para ello se debe trazar la curva de actividad protrombínica de un pool de plasmas frescos normales.

### ***Curva de calibración***

- En tubos de cristal preparar 5 diluciones (cada una por duplicado) de un pool de por lo menos 3 plasmas normales, según:

<b>Diluciones</b>	<b>1 en 1</b>	<b>1 en 2</b>	<b>1 en 3</b>	<b>1 en 4</b>	<b>1 en 8</b>
Porcentaje de actividad	100 %	50 %	33.3 %	25 %	12.5 %
Pool de plasmas normales	0.5 mL	0.3 mL	0.3 mL	0.2 mL	0.2 mL
Solución fisiológica	-	0.3 mL	0.6 mL	0.6 mL	1.4 mL

- Determinar el TP para cada dilución empleando el procedimiento descrito.
- En un papel milimetrado graficar los resultados en un sistema de coordenadas. Colocar los TP en segundos sobre el eje de las ordenadas y los porcentajes de actividad protrombínica en el eje de las abscisas.
- Cada laboratorio debe trazar su propia curva de calibración correspondiente al lote de reactivos en uso. Repetir con cada nuevo lote de reactivos.

### ***Cociente de calibrado internacional (CCI)***

Debido a la dispersión de los resultados provenientes de los distintos laboratorios y en 1977 la OMS preparó un patrón primario (Preparación Internacional de Referencia 67/40) con el que luego se obtuvieron patrones secundarios, con el fin de poder valorar las tromboplastinas de origen comercial y que los laboratorios bioquímicos expresen sus resultados en una escala común, logrando así la normalización del control de la terapéutica anticoagulante oral. De la técnica de valoración utilizada surge la siguiente fórmula:

$$CCI = 1 + \frac{(r-1)}{CIC \text{ Lote}}$$

Donde

C.C.I = Cociente Calibrado Internacional de muestra de plasma en cuestión

CIC Lote = Constante Internacional de Calibración de la tromboplastina en uso

**r** = TP del plasma del paciente (seg)

TP del pool de plasma normal (seg)

*El valor de CCI de una muestra de plasma es independiente de la tromboplastina empleada.*

### ***Razón internacional normalizada (RIN o INR)***

La OMS ha recomendado el uso de INR para el monitoreo de la terapia con medicamentos anticoagulantes a base de cumarina, a fin de que resulten comparables los datos obtenidos en distintos laboratorios y con tromboplastinas de distintos orígenes. La conversión del TP a INR se hace así:

$$INR = \text{cociente de TP}^{ISI} = R^{ISI}$$

Donde

$$R = \frac{\text{TP de plasmas cumarinizados}}{\text{TP de plasma normal}} = \frac{\text{TP del paciente}}{\text{TP normal}}$$

TP del paciente y del control normal: determinados con igual tromboplastina

ISI: Índice de sensibilidad internacional: constante que permite determinar la sensibilidad de cada lote de tromboplastina en relación a la preparación Internacional de Referencia Primaria. Los ISI se calculan para cada lote.

### ***Interpretación semiológica***

Esta prueba se ve alterada en pacientes que presentan déficit en la vía extrínseca de la coagulación y común. Factores I, II, V, VII

### ***En el coagulómetro***

- 50 microlitros de plasma
- 50 microlitros de tromboplastina
- 60 segundos de incubación
- 50 microlitros de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$

### ***Tiempo de tromboplastina parcial activada con kaolin***

#### **Método de Rapaport**

##### ***Fundamento***

- Al poner en contacto en plasma citratado con el polvo de caolín es capaz de activarse en un determinado tiempo el factor XII (factor de contacto) de la coagulación que, a su vez, en presencia de los fosfolípidos (cefalina, que sustituye el factor plaquetario 3) mas un buffer regulador de pH y aportándole  $\text{Ca}^{+++}$  se formara un coagulo que estará en relación con los factores que intervienen en la fase intrínseca de la coagulación que son: XII, XI, IX, VIII, V, I, II, kalicreinas y kininógeno de alto peso molecular (KAPM, HMWK).
- Si el TP y TPT caolín están prolongado quiere decir que le faltan todos los factores o presencia de anticoagulante lúpico.
- Los activadores pueden ser caolín, celite, ácido elágico, vidrio y tierra de diatomeas.

##### ***Objetivos***

- Medir la fase intrínseca de la coagulación

##### ***Reactivos***

Cefalina-Imidazol-Caolín..... 3.75 mL de una mezcla de Caolín 0.5 % en solución amortiguadora Imidazol-salino +50 microlitros de cefalina.

La cantidad de cefalina que se echa puede variar en dependencia de como den los valores normales de TPT-A con Caolín; por ejemplo, ahora se está echando 25 microlitros de cefalina para 3,75 mL de la mezcla de imidazol-salina-caolín.

### ***Buffer Imidazol salina-caolín***

- ✧ 25 mL del stock de buffer imidazol
- ✧ 18.6 mL de HCl 0,1 N
- ✧ Completar a 100 con solución salina
- ✧ Añadir 0,5 g de Caolín

Para preparar 500 mL:

- ✧ 125 mL del stock de buffer imidazol
- ✧ 93 de HCl 0.1 N
- ✧ Completar a 500 mL de solución salina.
- ✧ Echar 2.5 g de Caolín

### ***Técnica***

- ✧ 0,1 mL de plasma pobre en plaquetas
- ✧ 0,1 mL de la mezcla ClK
- ✧ Incubar 4 minutos a 37°C agitando cada 30 seg
- ✧ 0,1 mL de  $\text{CL}_2\text{Ca}$  0,025 M

### ***Valores normales***

- |  |                |
|--|----------------|
| ✧ Hasta 6 segundos por encima del control-   | <b>Normal</b>  |
| ✧ De 6 a 10 segundos por encima del control- | <b>Dudoso</b>  |
| ✧ 10 seg por encima del control-             | <b>Anormal</b> |

En nuestro laboratorio se informa valores normales hasta 10 segundos por encima del control.

### ***Interpretación semiología***

Esta prueba se ve alterada en:

- Déficit de factores plasmáticos intrínsecos (Factor VIII, IX, XI, XII, Precalicroina o Factor Fletcher, Kininógenos de alto peso molecular o factor Fitzgerald)
- Afibrinogenemia.
- Anticoagulantes circulantes tipo heparinoides, contra un factor o anticoagulantes lúpicos.
- Tratamientos con dicumarínicos.

### ***En el coagulómetro***

- 50 microlitro de plasma
- 50 microlitro ClK
- 180 seg de incubación
- 50 microlitros de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$

## ***Tiempo de trombina***

### **Fundamento del método**

- El tiempo de trombina mide la velocidad en que el fibrinógeno contenido en el plasma se transforma en fibrina por la acción de una cantidad estandarizada de trombina.

### **Objetivos**

- Medir la velocidad de formación de la fibrina teniendo en cuenta la trombina adicionada.

### **Reactivos**

- Plasma citratado (centrifugado a 2 500 rpm durante 15')
- Solución de trombina 20 U/mL

### **Equipos**

- Baño de agua regulable.
- Cronómetro

### **Desarrollo de la técnica**

- Tomar 0,2 mL de plasma en baño de María a 37°C.
- Añadir 0,1 mL de la de trombina
- Echar a andar el cronometro y medir el tiempo que demora en aparecer el coagulo.

**Valores normales:** Hasta 3 seg. sobre el control

*Nota: Esta técnica se puede realizar también con Zimotrombina.*

### **Interpretación semiología**

El Tiempo de Trombina se observa prolongado en:

- Hipofibrinogenemia congénita.
- Coagulación intravascular diseminada.
- Fibrinolisis primaria.
- Presencia de antitrombina, especialmente heparinas y anticoagulantes tipo heparinoides.

- Hepatopatías
- Alteraciones moleculares del fibrinógeno.
- En presencia de productos de degradación del fibrinógeno.
- Hiperfibrinogenemia severa.

La dilución será la siguiente que es la que hacemos el pomito para 100 mL H<sub>2</sub>O destilada para preparar:

- Para 50 u-- 2,5-22.5 mL H<sub>2</sub>O destilada
  - Para 20 u-- 1 mL-24 mL de H<sub>2</sub>O destilada
- total: 25 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

**Valores normales** 3 seg. por encima del control

Reactivo de trombina a partir de 1 mg-- 50 VI pq el frasco tiene 1g 50 000

1 mL --- 500 u

0,1 mL-- 50 u y queda 50 u en 1 mL

Llevar a 1 mL o sea, echar 0,9 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

### **Curva patrón para dosificación de factores**

Con un pool de plasma normal hacer las siguientes diluciones:

Tubo #1: 4.5 mL de Buffer Imidazol + 0,5 mL pool= 100 %

Tubo #2: 1 mL de Buffer Imidazol + 1 tubo #1 = 50 %

Tubo #3: 1 mL de Buffer Imidazol + 1 tubo #2 = 25 %

Tubo #4: 1 mL de Buffer Imidazol + 1 tubo #3 = 12.5 %

A cada dilución se le realiza la determinación del factor que va a clasificar se debe realizar cada vez que se clasifique.

En el papel semilogaritmico se transportan las concentraciones del factor sobre las abscisas y los T de coagulación en seg. sobre las ordenadas y de la recta resultante se puede deducir la concentración del factor en el plasma que se estudia por interpolación.

El papel es semilogaritmico de triple ciclo

### **Dosificación de factores II, V, VII**

#### **Fundamento**

- Conociendo la dilución óptima del plasma a utilizar en la dosificación, se incorporan los factores necesarios para la formación del coagulo con excepción del factor que se dosifica, el tiempo de coagulación obtenido es proporcional al nivel de este factor expresado en forma porcentual.

#### **Objetivos**



- Medir la concentración del factor que se clasifica en el plasma

### **Materiales y Equipos**

- Baño de agua regulable a 37°C. y cronómetro

### **Reactivos**

- Buffer Imidazol PH 7,35
- Tromboplastina
- $\text{CaCl}_2$  0,025M
- Plasma sustrato con déficit del factor a dosificar

### **Desarrollo de la técnica**

En un baño de agua a 37° C, colocar tubo de Kahn y añadir:

- 0,1 mL de tromboplastina
- 0,1 mL de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ - 0,025M
- 0,1 mL plasma sustrato con déficit de II, V, o VII (según el que dosificó)
- 0,1 mL de plasma paciente Imidazol 1:10 (0,9 mL de Buffer Imidazol pH:7,35-0,1 plasma) o 0,1 mL del tubo #1, #2, #3, o 4 al hacer la curva patrón
- Echar a andar el cronómetro
- Ver como tiempo de protrombina. Regularmente da tiempos cortos.

### **Calculo de los resultados**

- Los resultados son expresados en porcentaje de actividad que se deducen a partir de una curva constituida, utilizando mezclas de plasmas normales frescas (pool).

### **Valores normales**

Factor II    68-118 %----- 50—150 %

Factor V    30-160 %----- 50—150 %

Factor VII   71-119 %----- 50—150 %

In.Ang.            IHI

### **Interpretación semiología**

- La concentración de estos factores se ve afectada en enfermedades hepatocelulares, cuando hay déficit de vitamina K por varias causas; por ejemplo: déficit por microorganismos del tracto gastrointestinal (enfermedad hemorrágica del recién nacido), o por trastornos en la absorción a nivel del intestino (esteatorrea, íctero obstructivo).
- Déficit congénito del factor II, V y VII

### En el coagulómetro

- 50 microlitro cada dilución
- 50 microlitro de plasmas sustratos
- 50 microlitro de tromboplastina

60 segundos de incubación

- 50 microlitro de  $\text{ClCa}$

### *Dosificación de factor VIII*

#### Fundamento

- Incorporación a un sistema para la formación del coágulo, excepto el factor VIII; el tiempo que demora en formarse el coágulo es proporcional al nivel de este factor, expresado en forma porcentual.

#### Objetivo

- Determinar la concentración de un factor de la fase intrínseca, el VIII, en plasma.

#### Equipos

- Baños de agua regulable.
- Cronómetro

#### Reactivos

- Plasma sustrato con déficit de VIII.
- Plasma Imidazol (dilución 1:10)

El mismo reactivo que utiliza para realizar determinación de TPTA con Caolín

#### Desarrollo de la técnica

En un tubo seco

- 0,1 mL de plasma sustrato con déficit de VIII.
- 0,1 mL de plasma del paciente, Imidazol (si es curva lo que se está realizando se toma el tubo #1, #2 #3 o #4)
- 0,1 mL de mezcla cefalina. Imidazol-Caolín
- Dejar en reposo en Baño de María  $37^{\circ}\text{C}$  durante 4 min; mezclar cada 2 min.
- Apagar el cronometro y añadir 0,1mL de  $\text{CaCl}_2$  0,025 M
- Dejar tiempo indicada por 30 seg.
- Mirar la formación del coagulo como un tiempo de protrombina.

**Regularmente da valores largos**

#### Cálculo de los resultados

El resultado debe llevarse a la curva correspondiente.

**Valores normales:** > 50 % (IHI)

### **Interpretación semiología**

- La concentración de este factor se ve disminuida en la hemofilia tipo "A". También se ha referido la existencia de niveles elevados de este factor durante episodios trombóticos.

### **En el coagulómetro:**

- 50 microlitros de cada dilución
- 50 microlitros de plasma sustrato
- 50 microlitros de ClK

3 minutos de incubación

- 50 microlitros de ClCa

### **Dosificación factor IX**

#### **Fundamentos**

- A un plasma deficiente en factor IX se le agregan los factores necesarios para la formación del coagulo, que es proporcional a la concentración del factor IX la cual es expresada en forma porcentual.

#### **Objetivos**

- Determinar la concentración del factor IX en plasma.

#### **Desarrollo de la técnica**

En un tubo seco:

- 0,1 mL de plasma sustrato con déficit de IX
- 0.1 mL de plasma paciente-Imidazol (si es la curva lo que se está realizando se toma el tubo #1, #2, #3, y #4)
- 0.1 mL de mezcla cefalina. Imidazol-Caolín.
- Dejar en reposo en Baño María a 37°C durante 4 min; mezclar cada 2 min.
- Apagar el cronometro y añadir 0.1mL de  $\text{CaCl}_2$  0,025 M
- Dejar temperatura indicada por 30 segundos
- Mirar la formación del coagulo como un tiempo de protrombina.

*Regularmente da valores aproximados al factor VIII (largos).*

#### **Cálculos de los resultados**

- Ver dosificación de factores de la fase extrínseca.

**Valores normales:** Mayor de 50 % (IHI)

## Interpretación semiología

- El déficit de este factor provoca un estado hemorrágico similar a la hemofilia. El factor IX se ve disminuido cuando existe déficit de vitamina K de cualquier etiología y por acción de los agentes anticoagulantes orales.

## Dosificación de factor X

### Fundamento

- Esta técnica se basa en incorporar a un sistema los factores necesarios para la formación del coagulo, con excepción del factor que se dosifica, que es en este caso el factor X, entonces el tiempo de coagulación obtenidos es proporcional al nivel de este factor expresado en forma porcentual.

### Objetivos

- El objetivo de esta técnica es medir la concentración en plasma del factor X.

### Equipos

- Baño de agua regulable a 37°C
- Cronómetro

### Reactivos

- Buffer Imidazol PH: 7,35
- $\text{CaCl}_2$ --- 0,025M
- Plasma sustrato con déficit de X (viene comercial en 1 frasco y se reconstituye en 3 mL  $\text{H}_2\text{O}$  destilada)

### Desarrollo de la técnica

- 0.1 mL plasma sustrato con déficit de X.
- 0.1 mL plasma imidazol (dilución 1:10)
- 0.1 mL cefalina imidazol
- 0.1 mL calcio 0.025M

*Echar a andar el cronometro y observar como el TP regularmente da valores cortos.*

- **Calculo de los resultados:** Los resultados se calculan de la misma forma anteriormente descrita.

Valores normales: 50 a 140 % (Instituto de Angiología)

### Interpretación semiología

- La concentración de este factor se ve afectado en enfermedades hepatocelulares en patologías en la que exista déficit de vitamina K o en caso de déficit congénito de este factor.

- También la concentración de este factor se ve disminuida cuando se aplica terapia con anticoagulantes orales.

### **En el coagulómetro**

- 50 microlitro cada dilución
- 50 microlitro plasma sustrato
- 50 microlitro tromboplastina  
*60 seg. de incubación*
- 50 microlitros de ClCa

## **Dosificación factor XI**

### **Fundamento**

- Esta técnica se basa en agregar a un plasma deficiente de factor XI los factores necesarios para la formación del coagulo, excepto el factor a dosificar. El tiempo de coagulación obtenida será proporcional a la concentración del factor en plasma y se expresara en forma porcentual.

### **Objetivo**

- Determinar la concentración de factor XI.

### **Equipos**

- Baño de agua regulable.
- Cronómetro

### **Reactivos**

- Plasma sustrato deficiente en XI.
- Buffer Imidazol pH: 7.35
- Cefalina. Caolín
- CaCl<sup>++</sup> 0,025

### **Desarrollo de la técnica**

En un tubo seco

- 0,1 mL de plasma sustrato deficiente en XI.
- 0,1 mL de plasma-Imidazol (dilución 1:10) (en caso de realizarse la curva sería: tubo #1, #2, #3 o #4).
- 0,1 mL de mezcla cefalina Imidazol. Kaolin
- Reposar en Baño de María a 37°C por 6 min.
- Poner en marcha el cronometro mezclando cada 2 min.
- Levantar al cabo de 4 min como tiempo protrombina; echar el calcio y mirar

## Cálculo de los resultados

- Ver dosificación de los factores de la fase extrínseca

**Valores normales:** Mayor de 50 %

## Interpretación semiológica

- El déficit de este factor produce un estado hemorrágico, no tan inmenso como el producido por la hemofilia. Se ve disminuido en estados cirróticos. Se han reportado niveles normales de este factor en la diabetes, enfermedad de arterias coronarias y en algunos pacientes con arteriosclerosis periférica.

*NOTA: El plasma sustrato con déficit de VII es el X sin VVR*

## Para cuando no posea plasma-sustrato de distintos factores

### Corrección de factor II

## Fundamentos del método

- Si a un plasma con un TP alterado se le aporta suero viejo y plasma adsorbido y no se corrige, podemos decir que estamos frente a un paciente con déficit de factor II.

## Método

Se hace una mezcla de la siguiente forma

- 0,05 mL de suero normal
- 0,45 mL de plasma del paciente (realizar un TP)
- 0,05 mL de plasma adsorbido (realizar un TP)
- 0,45 mL de plasma paciente

*Si no se corrige con ambos*

**déficit de factor II**

*Si se corrige con suero normal*

**déficit de factor VII o X**

*Si se corrige con plasma adsorbido*

**déficit de factor V o fibrinógeno**

## Plasma adsorbido con sulfato de bario

- Contiene **I, V, VIII, XI y XII**
- No contiene **II, VII, X, IX**

## Suero normal

- Contiene **VII, IX, X, XI, XII**
- No tiene **II, I, V**

### Corrección de factor V

## Fundamento del método

- El tiempo de protrombina alterado por déficit de factor **V** se corrige si se añade al plasma del paciente una pequeña porción del plasma adsorbido normal rico en factor V.

### Método

Realizar una mezcla 1:10

- 0,05 mL de plasma adsorbido (realizar un TP)
- 0,45 mL de plasma paciente

*Si el TP se corrige*

**déficit de V**

*Si no se corrige descartar*

**déficit de factor VII o X**

### Corrección de factor VIII

### Método

Cuando hay un Caolín alterado se hace la mezcla:

- 0,1 mL plasma adsorbido (realizar un TPT caolín)
- 0,45 mL de paciente

*Si se corrige o se acorta el tiempo* **déficit de factor VIII o de V** (que se averigua por la vía extrínseca)

### Corrección del factor IX

### Método

Ante un caolín alterado: se hace la mezcla:

- 0,1 mL de suero normal
- 0,45 mL de plasma paciente (realizar un caolín)

*Si se acorta el tiempo*

**déficit de factor IX**

*Nota: El suero normal aportó II, VII, IX (y XI y XII parcialmente)*

### Presencia de inhibidores del factor VIII (prueba cualitativa)

### Método

Plasma normal	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Paciente	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0

- A 0,1 mL de estas mezclas se le realiza un TPT Caolín
- Se incuban sin caolín a 37°C 1 hora y 2 horas.
- Pasado ese tiempo realizar nuevo TPT Caolín a otro 0,1 mL de esas mezclas

### Interpretación

- Si existe la presencia de inhibidores: se alargan los tiempos ya que el inhibidor consume el factor VIII al control.
- Con esta técnica se sabe groseramente si hay o no inhibidores. Posteriormente se debe saber las unidades Bethesda/mL de inhibidores.

### **Presencia de inhibidores de factor VIII (prueba cuantitativa)**

Esta técnica se realiza con celite.

#### **Fundamento**

- Al suministrar crioglobulina a un paciente hemofílico A, este crea inhibidores contra dicho factor VIII.

#### **Técnica**

- Se diluye el plasma control con buffer imidazol salino  
BIS-- 0,2 mL) tubo control 1ro.  
PC--- 0,2 mL)
- Se diluye el plasma control con el plasma del paciente.  
PC--- 0,2 mL) tubo paciente 2do.  
PP--- 0,2 mL)
- Diluir el plasma del paciente de acuerdo a la cantidad de inhibidores el 1/2 y 1/5 con buffer. Imidazol salino.  
3er. tubo: 0,2 del 1/2 + 0,2 mL de plasma normal o control.  
4to. tubo: 0,2 del 1/5 + 0,2 mL de plasma normal o control.

Estas diluciones (4 tubos) se incuban a 37°C durante 2 horas.

Cuando estas mezclas lleven 1 hora de incubación tiramos la curva de factor VIII:

#### **Curva de factor VIII:**

Tiempos de la curva:

1:10 --- 100 %	0,9 de Buffer I Salino 0,1 mL de plasma (pool)
1:100 --- 10 %	0,9 de BIS 0,1 de la mezcla anterior 1:10
1:20 ---- 50 %	1.9 de BIS 0,1 de la plasma (pool)
1:200---- 5 %	0.9 de BIS 0.1 de la mezcla anterior 1:20

*La curva se realiza con el mismo plasma control que se utiliza para las diluciones.*



Buffer imidazol salino

1 mL de BI sol de W PH: 7,35

9 mL de sol salina 0,9 %

Realizada la curva de factor VIII se realizan diluciones 1:10 de las muestras que incubamos 2 horas para dosificarles el factor VIII (en la curva realizada anteriormente)

Preparación del celite (mezcla)

5 mL de celite\*

0,025 mL de cefalina

(\*) Preparación de celite

0,7 g de celite

100 mL de Buffer I.S.

Técnica:

- 0,1 mL de celite-cefalina

- 0,1 mL de plasma con déficit de factor VIII

- 0,1 de la dilución del plasma

Incubar 3 minutos

- 0,1 mL de calcio m/40 0,025 M

- Se mira la formación del coagulo (tiempo de protrombina)

- Se tiran los tiempos por duplicado

- Se busca % que tiene C y P esto será el factor VIII residual

Ejemplo: Control 50 ---- 100 %

Paciente 40 ---- X                      X = 80 %

Buscar 80 % del factor VIII residual (buscar en la curva del factor VIII) en curva estándar que nos da VB/mL de inhibidores de factor VIII (0,3 VB/mL)

Ejemplo: Caolín--- 105 %

F VIII ----2,1 % = Inhibidores de F VIII---- 0,75 VB/mL

*Cuando hay que hacer diluciones según la cantidad de inhibidores se multiplicará por 2 si la dilución es 1:2, por 5 si la dilución es 1:5, o 20 si es 1:20 etc.*

## **Estabilizador de fibrina Factor XIII**

### **Fundamento**

- En ausencia del factor XIII la polimerización de los monómeros de fibrina es imperfecta y el cálculo se efectúa por lisis en una 5 M o ácido monocloroacético 1 %.

**Técnica:** (siempre se debe hacer un control)

- 0,1 de Buffer Imidazol
- 0,2 de plasma citratado
- 0,2 de calcio M/ 40 (0,025 M)
- Incubar a 37°C a 30 min
- Añadir 3 mL de urea 5 M
- Dejar en reposo durante 24 horas si se utiliza urea 5 M.
- Observar la lisis de coagulo.

**Interpretación**

- Normalmente no debe ocurrir lisis:
  - ✧ Antes de 24 horas cuando utilizamos una 5M.
  - ✧ Antes de 6 horas cuando se utiliza ácido monocloroacético 1 %.

**Valores normales**

- Cuando se lisa todo el coagulo en el tiempo señalado..... (+)
- Cuando no se lisa todo el coagulo (aunque quede un pedacito)..... (-)
- Si ausencia de factor XIII: en el tromboelastograma habrá un **Am** reducido.

**Generación de trombina**

**Fundamento**

- Cuando se agrega calcio a un plasma se pone en marcha las reacciones de coagulación. Si a intervalos determinados, después de la adición de calcio, se toman muestras de ese plasma recalcificado y se agrega a una fuente de fibrinógeno, podía calcularse la concentración de trombina existente en el plasma recalcificado, en cualquier momento dado. Se verá así que la trombina continúa generándose una vez el plasma a coagulado. Se puede elaborar, de esta forma, curvas de generación de trombina, las cuales indicarán la velocidad con que se forma la trombina en un plasma determinado.

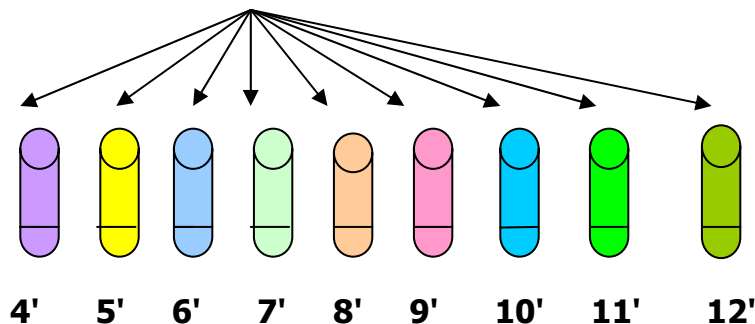
**Reactivos**

- Trombina de 30 unidades
- Plasma bovino diluido como fuente de fibrinógeno (preparación de plasma bovino en la sección de reactivos)
- CaCl<sub>2</sub> 0,025M

## Desarrollo del método

- Se obtiene sangre con citrato de sodio 0,109 M (10:1).
- Se obtiene PRP por centrifugación a 1 500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente
- Se ajusta el número de plaquetas a  $200 \times 10^9$  con plasma pobre en plaquetas obtenido a 3 000 rpm durante 20 minutos.
- Se mezclan 0,4 mL de solución salina
- 0,4 mL de PRP paciente ajustado
- Se incuba a 37°C durante 3 minutos
- Después se añade a ese tubo 0,4 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,025 M
- Se mezcla y se introduce un aplicador; a los 3 min. y 45 seg. se exprime el coágulo contra las paredes y se desecha la fibrina
- Se toman alícuotas de 0,05 mL de la mezcla
- Se añade a tubos que contienen previamente incubado 0,2 mL plasma bovino diluido y se mide el tiempo de formación del coágulo
- Las alícuotas se extraen a los 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 minutos exactamente.
- Si a los 4 minutos no hay coágulo en el aplicador empezar por 5 minutos

Esquema:



**V**

-0,4 mL salina

-0,4 mL PRP ajustado

Incubar 3 minutos a 37 °C

Empezar por 0 en el cronómetro.

-0,4 mL de  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  0,025M

-Se introduce un aplicador, se exprime el coágulo 15 segundos antes de cumplirse el tiempo de cada tubo

-Se añade 0.05 mL de la mezcla a cada tubo en el tiempo exacto.

Los tubos contienen 0.2 mL de plasma bovino previamente incubado.

**Valores de referencia:** el tiempo de máxima generación se produce a los 7 minutos de incubación:

Minutos	Valores refer	Medias
4	8.5-59 seg	29.5
5	10.0-30 seg	20.0
6	10.0-20.5 seg	15.0
7	9.0-18 seg	13.5
8	8.5-18 seg	14.2
9	10.0-24 seg	15.6
10	10.5-25 seg	18.0
11	14.0-32 seg	21.5
12	13.0-37 seg	25.0

### Interpretación

- Después que se saca la media y DS se desechan los tiempos 4 y 5, 11 y 12 en que la variabilidad es muy grande ploteándose, en papel milimetrado, media y desviación estándar a los puntos de menos variabilidad donde la generación sea máxima.

### Test de screening para el factor Fletcher

- Una deficiencia de factor Fletcher puede ser determinado por una modificación del APTT.

### Reactivos y equipos

- $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0,025 M
- APTT que contiene Caolín, silica o celite como el activador. Ácido elágico no puede ser usado como un activador ya que este no corrige el APTT en deficiencia del factor Fletcher.
- Plasma control normal.
- Cronómetro.
- Plasma citratado. Dilución de 1 en 9 con citrato. Inmediatamente después de la colección de sangre ponerlos en el hielo.

### Principio

- Pacientes con deficiencia de factor Fletcher tienen prolongado el APTT. Si la mezcla de reactivo de APTT con el plasma se incuba por 10 minutos, en vez

de la rutina de 3 a 5 minutos la prolongación del APTT puede ser acortada, normal o casi normal, si la deficiencia es dada por el factor de Fletcher.

### **Procedimiento**

- Centrifugar el plasma del paciente a 1 200 o 1 500 g por 15 minutos decantar el plasma y ponerlo en baño de hielo.
- Realizar el APTT sobre el paciente y un plasma de control normal. Si los resultados del paciente son normales no hay deficiencia del factor Fletcher.
- Si son prolongados hacer un APTT del paciente y a un control normal incubando el plasma con APTT por 10 minutos:
- Añadir ClCa y determinar el tiempo de coagulación
- El APTT por 10 minutos puede corregirse a normal o casi normal. Si el APTT no se corrige con el incremento del tiempo de incubación es patológico.
- El plasma normal puede permanecer dentro o cerca del rango normal en un período de 10 minutos de incubación

### **Discusión**

- La coagulación normal ocurre con una concentración de factor Fletcher de 1.5 % a 2 y más. Para confirmar la deficiencia de factor Fletcher, un APTT puede ser desarrollado en una dilución 1/1 de plasma del paciente y plasma sustrato del factor Fletcher. El APTT no se corrige usando este sustrato; si se corrige, no existe deficiencia del factor Fletcher.

### **Consumo de protrombina o protrombina residual**

- Introducción. Durante el proceso de la coagulación sanguínea, la protrombina (factor II) del plasma es progresivamente convertida en trombina, enzima proteolítica activa, que induce la transformación del fibrinógeno en fibrina. Cuando se realiza la coagulación de la sangre en ausencia de tromboplastina tisular, se considera imprescindible la participación de los factores XII, XI, IX, VIII, V, X, y el factor plaquetario 3, lo que, por un mecanismo de cascada enzimática, generan un activador de la protrombina, denominado *protrombinasa*, que la transforma en trombina.
- Si se cuantifica la protrombina Factor II antes y después de realizado el proceso de coagulación, es posible determinar la proporción consumida, al ser convertida en trombina. Las experiencias acumuladas con el procedimiento usual para cuantificar el consumo de protrombina, en el cual se emplean tubos de vidrio convencionales y una hora de coagulación a 37°C, han demostrado que practicado de este modo, la prueba carece de la suficiente sensibilidad como para justificar su inclusión como método rutinario de orientación

- Basados en estas consideraciones, hemos procedido a modificar algunos detalles de la técnica original, con resultados muy favorables en cuanto al incremento de su sensibilidad.
- Para mayor precisión preferimos, además, la determinación específica del factor II, tanto en el suero de 3 horas, como en el plasma correspondiente, en sustitución del tiempo de protrombina de Quick, comúnmente aplicado para este fin.

## Material

- Oxalato de sodio 0.1 M o citrato de sodio 3.8 %
- Reactivos para la determinación específica del factor II

## Método

- La sangre es extraída en ayunas, con muy leve presión del torniquete y con el menor trauma posible.
- Transferir 2 mL de la sangre a tubos de 13 x 100 mm plásticos o siliconados e incubarlos a 37°C por 3 horas en completo reposo.
- Transferir 4.5 mL a un tubo plástico con citrato de sodio como anticoagulante.
- Exactamente a las 3 horas de incubación, se añade 0,2 mL de citrato al tubo de sangre que no lleva anticoagulante, para detener el proceso de consumo y se despega suavemente el coagulo adherido a la pared del tubo con un palillo de madera.
- Centrifugar los tubos 1 500 rpm a 3 000 rpm durante 10 minutos y separar los sueros.
- Determinar el contenido de factor II en los sueros de tres horas y en el plasma respectivo.
- Para calcular la protrombina consumida se considera arbitrariamente el valor de protrombina en el plasma autólogo como 100 % y se determina % en el suero de tres horas proporcionalmente X :

Por ejemplo:            plasma tiene 150 %-----100 %

   suero de tres horas 50 %-----X

**X =** 33,4 % es la protrombina residual

La consumida es 100-33,4= 66.6 %

## Resultados

- Los valores normales son 90 % o más de protrombina consumida en tres horas tanto en vidrio siliconado como en plástico, aunque es conveniente que cada laboratorio establezca sus propios valores normales. La

protrombina sérica es más o menos de 10 % y la variabilidad de los duplicados no deben sobrepasar 6 %.

### **Observaciones**

- Es menester tomar en cuenta que éste procedimiento es de muy limitada utilidad si el factor inicial del plasma se encuentra muy disminuido por deficiencias congénitas, terapias anticoagulantes, etc.
- Aunque el procedimiento practicado del modo descrito permite descubrir deficiencias moderadas aun leves de los factores que intervienen en la generación del activador intrínseco de la protrombina.

### **Principio**

- Añadir un exceso de trombina a la muestra diluida de plasma citratado y medir el tiempo hasta la aparición de un coágulo de fibrina. Bajo estas condiciones el tiempo de coagulación es proporcional a la tasa de fibrinógeno en la muestra.

### **Reactivos**

- La sangre se extrae sobre solución de citrato de Na 3,8 % (1 vol x 9 vol de sangre). El plasma se obtiene por centrifugación a 3 000 rpm durante 5 minutos.
- Solución de trombina a 50 unidades NIH/mL en Buffer Michaelis.

### **Técnica**

- Se preparan 1 dilución de plasma a estudiar en buffer Michaelis.
- En un tubo de vidrio en baño de María a 37°C se introduce 0,2 mL de la dilución 1/10.
- Pasados 2 minutos (para asegurar el equilibrio térmico) añadir 0,2 mL del sol. de trombina y de el tiempo de coagulación.

### **Resultados**

- Los resultados se expresan en gramos de fibrinógeno x L (g/L) de plasma (o en mg x 100 mL) por medio de una curva estándar. Para construir dicha curva se determina la concentración exacta de fibrinógeno de un plasma control por otro método de referencia y se procede a la medida de los tiempos de coagulación de diferentes concentraciones de ese plasma (1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/50) en presencia de la solución de trombina 50 U/mL en las mismas condiciones. Sobre papel logarítmico, plotear en las abscisas las concentraciones de fibrinógeno en g/L de plasma y en las ordenadas los tiempos de coagulación obtenidos.
- El nivel de fibrinógeno del plasma a estudiar es obtenido por un cálculo simple teniendo en cuenta la dilución efectuada. En estas condiciones a

nivel de fibrinógeno esta comprendido normalmente entre 2.5 y 4 g/L de plasma a 250-400 mg/100 mL.

### En el coagulómetro

- Se diluye el plasma pobre en plaquetas 1,9 mL de buffer-0,1 mL de plasma o 0,95 mL de buffer-0,05 mL de plasma.
- 0,1 mL de la dilución del plasma
- 0,05 mL de trombina

Medir formación del coagulo

### Tiempo de reptilasa

#### Técnica

- Plasma citratado                      0,3 mL
- Reactivo reptilasa                      0,1 mL
- Valores normales                      17-20 seg.
- Valores patológicos                      más de 24 seg.

Ver la formación del coagulo desde 0 hasta que se forme el coagulo.

- Si es plasma citratado:    0,2 mL
- Reactivo reptilasa:                      0,1 mL
- Valores normales media    17 seg.
- Valores patológicos                      22 seg.

#### Interpretación

- Se ve alterada en desordenes tromboembólicos, circulación extracorpórea.
- La pequeña especificidad del reactivo de reptilasa, puede ser utilizada en la preparación de fibrinopéptidos y para la investigación de defectos estructurales en patologías fibrinógeno.

*Nota: Al igual que el tiempo de trombina, se altera por hipofibrinogenemia, disfibrinogenemia, inhibidores de la polimerización del fibrinógeno y PDF.*

### Conteo de células endoteliales

#### Principio

- Las células endoteliales se preparan en 1 mL de PRP y se cuentan en la cámara de Frish-Rosental. Deben dar aumentadas cuando hay angina de pecho e infarto del miocardio, últimamente se plantea en trombosis venosa y se va a investigar en aterosclerosis.

#### Método

En tubos siliconizados



- Obtención PRP, sangre citratada (dilución 1: 10 citrato trisódico 3,8 % (centrifuga 10 minutos a 1000 rpm).
- Tomar 1 mL de PRP y adicionar 0,2 mL de ADP (1 mg/mL), agitar en zaranda 20 minutos (sin poner en contacto el líquido con el tapón), el ADP es para agregar y precipitar las plaquetas.
- Centrifugar a 4°C refrigerada 10 minutos a 2 000 y (1 000 rpm MSE) para precipitar las plaquetas.
- Enriquecimiento de las células endoteliales. Se vacía el sobrenadante de la centrifugación anterior a un tubo siliconizado a plástico y centrifugar 20 minutos a 4°C y 1 200 y (2500 rpm MSC) para precipitar las células endoteliales)
- Se desprecia el sobrenadante.
- Mezclar el precipitado con 0,2 mL de NaCl 0.9 % durante 10 minutos en zaranda (evitar que toque el líquido el tapón)
- Contar las células endoteliales en la cámara Fuchs-Rosenthal en microscopio de contraste de fase con objetivo 16 (contar la cámara completa y los bordes en forma de L)

Valores normales RDA: 238-669 cel/mL de PRP  
(equivale a 14-42 células contadas)

Tabla de valores de células endoteliales:

Valores normales 238-669

### **Test de gelación con etanol. Test de paracoagulación**

#### **Fundamento del método (método grosero)**

- La aparición de un gel se debe a la presencia de monómeros o de complejos solubles en el plasma (formados entre monómeros de fibrina y de fibrinógeno o entre un monómero de fibrina y los productos de degradación precoces de fibrinógeno)

#### **Objetivos**

- Para conocer si hay presencia o no en el plasma de los monómeros de fibrina anteriormente mencionados. Este resultado conjuntamente con el obtenido con otras pruebas resulta de utilidad en el diagnóstico de algunas patologías con la CID (coagulación intra vascular diseminada).

#### **Reactivos, equipos y cristalería**

- Etanol 50 % en H<sub>2</sub>O destilada.
- Centrífuga
- Cristalería: Tubos 12 x 75 y pipetas 0,5 mL

### **Desarrollo de la técnica**

- Se utilizan 0,5 mL de plasma citratado al que se añaden 0,15 mL de etanol 50 % se mezcla suavemente (bruscamente se echa el etanol) y se deja en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Al cabo de este tiempo observar la presencia o no de un gel (coágulo).

### **Resultado**

- El resultado se considera positivo si se observa la presencia del gel y negativo si no se observa.
- Valores normales: negativo (Instituto Angiología). Informar positivo o negativo

### **Interpretación semiológica**

- Test de gelación con etanol positivo autoriza el diagnóstico de CID, pero un resultado negativo no permite este diagnóstico. Asimismo, el resultado positivo, puede reflejar la existencia de una trombosis venosa.

### **Test de sulfato de protamina**

#### **Fundamento**

- La aparición de un gel se debe a la presencia de monómeros o de complejos solubles en el plasma (formados por los monómeros de fibrina). Mide los productos intermediarios de degradación de la fibrina.

#### **Objetivos**

- Se realiza para detectar la presencia en el plasma de los monómeros o complejos solubles mencionados anteriormente.

#### **Reactivos, equipos y cristalería**

- Sulfato de protamina (ámp. 50 mg 1 %). (Este reactivo viene en ampulas)
- Equipos: Centrifuga, baño de agua regulable
- Cristalería: Tubos de 12 x 75 y pipeta 1 mL y 0,5 mL

#### **Desarrollo de la técnica**

- Utilizar 1 mL (PPP) al que se añaden 0,1 mL de sulfato de protamina, se mezcla suavemente y se coloca en Baño de María a 37°C durante 15 min.
- Al cabo de este tiempo se observa si existe o no, formación de grumos.

#### **Cálculo de los resultados**

- Se considera que el resultado es positivo si se observa formación de grumos o arenilla y negativo si no se observa.

Valores normales: Negativo. Se informa negativo o positivo.

#### **Interpretación semiológica**

- Se plantea que un resultado positivo puede indicar la presencia de un proceso tromboflobítico. Es positivo también en la coagulación intravascular.

### **Test de sulfato de protamina. Test de paracoagulación** (semi-cuantitativa)

#### **Fundamento**

- Mide los productos de degradación-monómeros de fibrina.

#### **Reactivos**

- Sulfato de protamina 1 %.
- Tomar 0,6 mL de ampula y completar hasta 3 mL con solución salina, o sea 0.6 mL de sulfato de protamina 1 %.

#### **Técnica**

- Tomar 5 tubos y agregar en el orden lo que sigue

<b>Tubo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Solución salina	1.0	1.0	1.0	1.0	
	0.5	0.5	0.5	0.5	
Sulfato protamina	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	
	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL	

*Enjuagar la pipeta cada vez que se pasa de un tubo a otro*

- De cada una de estas diluciones tomar 0,2 mL y agregarle 0,2 mL de plasma del paciente, (para echar 0,2 mL de las diluciones a otros 5 tubos se puede empezar del más diluido al mas concentrado o cambiar la punta o la pipeta cuando se va del mas concentrado al mas diluido)
- Mezclar inmediatamente.
- Mantener los tubos durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Mirar cada tubo para ver si hay formación del coagulo o grumos grandes.

#### **Cálculo de los resultados**

- Se informa si es positivo o negativo. Si es positivo se informa en que dilución o hasta qué dilución se formaron esos grumos grandes o coágulos.

### **Lisis de la euglobulina**

#### **Fundamento**

- Este método consiste en precipitar la fracción euglobulínica del plasma con ácido, para luego redissolverla con un buffer adecuado y finalmente formar un coágulo. La desaparición de éste, representa la lisis de euglobulinas y se debe a la presencia, en esta formación del plasma, tanto de plasminógeno como de activador de mismo.

## Objetivos

- El T de lisis de euglobulinas se considera un índice de la actividad del activador del plasminógeno.

## Cristalería, equipos y reactivos

- Cristalería: tubos de centrifuga lisos, pipetas 10 mL, pipetas 1 mL.
- Equipos: centrífuga, baño de agua regulable.
- Reactivos:
  - ✧ Plasma citratado
  - ✧ Citrato de Na 3,8 %
  - ✧ Ácido acético 1 % para llevar pH a 5,3
  - ✧ Cloruro de calcio 0,025 M
  - ✧ Solución de borato de sodio

## Desarrollo de la técnica

- Se toma la muestra de 0,5 mL de citrato sódico para 5 mL de sangre.
- Se recoge la sangre y se mantiene en H<sub>2</sub>O helada hasta el momento de la centrifugación (no más de 20 minutos)
- La sangre se centrifuga a 3 000 rpm durante 10 minutos.
- En tubos cónicos de centrífuga, se mezclan 9 mL de H<sub>2</sub>O destilada y 0,1 mL de ácido acético 1 % (pH 5,3)
- Se añaden 0,5 mL de plasma, se mezcla y se mantiene a 4°C durante 30 minutos para que precipite la fracción euglobulínica del plasma.
- Se centrifuga a 3 500 rpm en centrífuga refrigerada durante 5 min, descartándose el sobrenadante y se colocan los tubos invertidos sobre un papel de filtro para que el precipitado quede libre de sobrenadante.
- Se redisuelve el precipitado en 0,5 mL de buffer borato de Na, se mueve con una varilla de cristal para redissolver el precipitado y se añade además 0,5 mL de Cl<sub>2</sub>Ca 0,055 M para obtener el coagulo se mueve un poquito.
- Se colocan los tubos a Baño de María a 37°C observándose cada cierto tiempo hasta que se forme el coagulo se apunta el tiempo.
- Se observa al cabo de las 2 horas si ocurre lisis (si se lisa antes de las 2 horas es positivo, si se lisa después de las 2 horas es negativo)

## Resultados

- Se toma como tiempo de lisis el tiempo transcurrido desde la formación del coágulo hasta su completa lisis.

Valores normales: entre 2 horas y 3 horas (Instituto de Angiología); más de 120 minutos (IHI)

### **Interpretación semiológica**

- El test de lisis se acorta por el déficit de fibrinógeno, la presencia de plasmina o activadores de plasminógeno.
- Se aumenta cuando hay presencia de: procesos inflamatorios crónicos, embarazos, nefropatías, procesos tromboembólicos.

### **Productos de degradación del fibrinógeno (Trombo-Wellcotest)**

#### **Procedimiento**

- Se toman 2 mL de sangre venosa del paciente y se vierten en el tubo que contiene trombina, mezclando por inmersión. El tubo tiene trombina para que se acelere la coagulación y se forme la fibrina y fibrinolisis y un antifibrinolítico para que no se forme la fibrinolisis en ese momento ya que quiere medir son los productos de degradación de la fibrinolisis que hay en la sangre para ver como es la fibrinolisis en la sangre y no la fibrinolisis que ocurre en ese momento, cuando la sangre se coagula en el coágulo queda el fibrinógeno y la fibrina y lo que se toma es el suero que están los PDF.
- Se incuba durante 30 min y al cabo de ese tiempo se desprende el coágulo con un aplicador, centrifugando a 4 000 rpm durante 5 minutos.
- El suero así obtenido se hacen 2 diluciones.  
Dilución (1)            5 gotas de suero + 0,75 mL de buffer  
Dilución (2)            1 gotas de suero + 0,75 mL de buffer  
1 gota de suero control + paciente 1 gota de la del 1  
1 gota de suero control - paciente 1 gota de la del 2
- Después añadir esas gotas se añade 1 gota de látex (partículas de poliestireno con anticuerpos de productos de degradación del fibrinógeno) o sea, a un animal se le inyecta PDF y eso crea anticuerpos contra ese PDF; entonces se toma ese suero que tiene anticuerpo y en el ensayo como tal lo pongo a reaccionar con los PDF de la sangre del paciente como tal hasta que se forme aglutinación, agitándolo en cada anillo con un palito hasta cubrir la superficie del anillo.
- Después de agitar se acciona el cronometro y se le imprime a la placa de cristal un suave movimiento de desplazamiento horizontal, observando atentamente con buena iluminación hasta la aparición. Si no aparece dentro de 2 min. se da el resultado de la prueba como negativo ( $< 10 \mu\text{g/mL}$ )

#### **Resultados**

Positividad en la del 1---            10-40  $\mu\text{g/mL}$

Positividad en la del 2--- > 40 µg/mL

*Las pipetas que se usan en la técnica son las del kit*

## **Dosificación de plasminógeno**

### **Fundamento del método**

- El plasma se trata con ácido para destruir los inhibidores de la fibrinólisis, posteriormente se utiliza estreptoquinasa para convertir el plasminógeno en plasmina. La caseína se utiliza como sustrato de la enzima proteolítica plasmina, liberándose tirosina que es cuantificada con el reactivo de Folin C.

La estreptoquinasa tiene 750 000 U y se desea 2 000 en 0,5 mL:

$$\begin{array}{rcl} 2\,000\text{-----} & 0,5\text{ mL} & \\ 750\,000\text{-----} & x & X = 187\text{ mL} \end{array}$$

### **Reactivos**

- Citrato de sodio 38,3 g/L
- Estreptoquinasa
- Solución de caseína (actúa como sustrato para actuarla plasmina)
- Buffer fosfato salino
- Buffer fosfato isosmótico
- Buffer imidazol pH: 7:35 (preparación igual al del TPT con Caolín.
- Reactivo de Folin C
- Ácido tricloroacético 5 %
- Ácido tricloroacético 10 %
- Hidróxido de sodio 0,5 M

### **Equipos**

- Baño de agua regulable.
- Centrifuga
- Espectofotómetro o fotolorímetro
- Cronómetro

### **Desarrollo de la técnica**

- Se preparan mezclas por duplicado (en el Instituto de Angiología no se hace por duplicado) de 0,5 mL de plasma pobre en plaquetas y 0,5 mL de HCl 0,166 M en tubos de vidrio 13 x 100 y se dejan 15 minutos.
- Se agita sin que se forme espuma.
- Se añade a cada tubo 0,5 mL NaOH 0,166 M

- Se agrega además 1 mL de buffer imidazol pH: 7.35. 0,5 mL de estreptoquinasa y 2 mL de solución caseína accionando de inmediato el cronómetro y mezclando bien para colocar en baño de María a 37°C.
- A los 2 minutos se transfiere 1 mL de cada muestra a tubos que contienen 1 mL de TCA 10 %, se agitan bien y se guardan a 4°C. Las muestras se mantienen en baño a 37°C durante 60 minutos (contando los 5' mas o menos) al cabo de los cuales se transfiere 1 mL a tubos que contienen 1 mL de TCA 10 % se mezclan bien y se centrifugan todos los tubos (incluidos los que se quedaron con anterioridad a 4°C, que son los blancos)
- Se toman 0,5 mL del sobrenadante y transferir a tubos de 121 x 12 mm.
- Se añaden
  - 2,5 mL de NaOH 0.5 M.
  - 0,75 mL de TCA 5 %
  - 0,75 mL de FOLIN (dil 1:3)

Diluir 10 mL (a completar 30 mL) con H<sub>2</sub>O destilada.

- Se preparan conjuntamente el blanco y los patrones de la siguiente forma:

<b>Reactivo</b>	<b>Blanco</b>	<b>P1</b>	<b>P2</b>
Tirosina	-	0,25	0,5
H <sub>2</sub> O dil.	0.5	0,25	-
NaOH 0,5M	2.5	2.5	2.5
TCA 5 %	0.75	0.75	0.75
Folin1:3	0.75	0.75	0.75

- Se mantienen los tubos en reposo durante 15 minutos para el desarrollo del color y se lee a 650 nm.

## Resultados

- Al estándar de tirosina que contiene 0,5 mL de la solución stock de tirosina se le ha asignado un valor arbitrario de 4 unidades de plasminógeno, por tanto, para conocer la concentración de plasminógeno en la muestra realizamos el cálculo siguiente:

$$CM = \frac{DO \text{ muestra}}{DO \text{ patrón}} \times C \text{ patrón}$$

Valores normales: 1 a 3.6 U (Instituto de Angiología)  
1.5 a 4 U/mL de plasma

## Interpretación semiológica

- Una disminución en el contenido plasmático de plasminógeno puede deberse a su activación a plasmina; siendo un reflejo, por tanto, de una

activación de la fibrinólisis, estado que se presenta por ejemplo en las sepsis.

### Preparación de reactivos

- Estreptoquinasa: cada frasco contiene un liofilizado con 100 000 U; este disuelve en 50 mL de solución salina 0,9 % para obtener 2 000 U/mL (en volumétrico de 50 mL)

- Caseína:

Caseína (Hammaester)--- 15 g

Buffer fosfato-salino--- 175 mL

Se calienta la mezcla en baño de María hirviendo durante 15 o 20 o 30 minutos. Se filtra con algodón en caliente.

Se ajusta el pH a 7.4 con hidróxido de sodio y se lleva el volumen hasta 250 mL, con el buffer utilizando (se hace a cálculo global porque puede ser que no se disuelva)

- Buffer fosfato salino 0,1M--- este es el de la caseína.
- Buffer fosfato isosmótico----- 1 volumen pH: 7 o 7.4
- Cloruro de sodio 0,9 %----- 1 volumen (0,9 g en 100 mL H<sub>2</sub>O destilada)
- Buffer fosfato isosmótico

Solución A fosfato disódico-- 0,15 M(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12 H<sub>2</sub>O)

Fosfato disódico ----- 20,4 g (se puede pesar 2.04 para 100):

(varia para preparar la solución A y B: no se puede pesar arbitrariamente lo que dice; fijarse en la cantidad de moléculas de H<sub>2</sub>O, por ejemplo:

Utilizamos solución A de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O

1mol----- 358,15

0,15mol---- X                      X = 53,7225

entonces, en vez de pesar 20,4 como dice delante hay que pesar más

53,7225 g porque tiene 12 moléculas de H<sub>2</sub>O

Y la solución B NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O

1mol----- 137,99

0,15mol--- X                      X = 20,6985

o sea, en vez de pesar 21,3 (ver más adelante) hay que pesar 20,6985 g. Se puede pesar menos para preparar solo 100 mL de A y 100 de B.

Sln B fosfato monosódico-- 0,15 M (Na H<sub>2</sub> P04. H20)

Fosfato monosódico ----- 21.3 g (varia, se puede pesar 2.13 para 100)



H<sub>2</sub>O destilada ----- 1 000 mL

*Preparación del buffer pH 7,4*

Solución A --- 18 mL

Solución B-- 92.2 mL

Completar a 200 mL con H<sub>2</sub>O destilada.

- Tampón Imidazol pH:7.35

Imidazol-- 3.4 g

Cl Na---- 5.85 g

H<sub>2</sub>O dest. ----- 00 mL

Se añaden 18.6 mL de HCl IN y se completa a 1 000 mL con H<sub>2</sub>O destilada.

Comprobar el pH- 7.3--7.4

*Se puede utilizar el mismo buffer imidazol del caolín (es el mismo, pero con diferente preparación)*

- Tirosina: Se pesa en un beaker pequeño 0,0036 g para diluir ahí mismo o 3.6 g de tirosina en 90 µL en HCl 0,1n  
10 mL de isopropanol (propanol 2.CH<sub>3</sub> CH(OH) CH<sub>3</sub>)  
- HCl 0.166N

Se hace lo mismo con NaOH 0.166 N cuando se prepara a través del fixanal: se destapan los 2 huecos y se le echa H<sub>2</sub>O hasta 1 000 mL por el mismo embudo del fixanal.

Valores normales: hallados en el laboratorio del Hospital "Hnos.Ameijeiras"

N-	84
DS-	0,633223
V-	24,8295
Promedio + s =	3,18351
Promedio + 2s=	3,81673
Promedio + 3s=	4,44996
Promedio - s =	1,91706
Promedio - 2s=	1,28384
Promedio - 3s=	0,650616

Para el test de Filliben con v- 0,995505 como es mayor o igual al de la tabla.

<b>1 %</b>	<b>5 %</b>	<b>10 %</b>
0,977259	0,984654	0,987359

**Tiempo de sangramiento. Ivy**

## Fundamento

- Se mide el tiempo de sangramiento después de tres punciones en el antebrazo, elevando la presión capilar en 40 mm de mercurio y 20 mm de mercurio en niños.

## Objetivos

- Estimar simultáneamente el grado de vasoconstricción y el tiempo que tarda en formar el botón plaquetario hemostático.

## Materiales

- Papel de filtro # 389
- Lancetas (Flather)
- Algodón
- Alcohol
- Esfigmomanómetro

## Desarrollo de la técnica

- Colocar el manguito del esfigmo por encima del codo, a una presión de 40 mm Hg (según Wintrobe) y mantenerlo durante toda la prueba.
- Desinfectar con el algodón la parte antero-superior del antebrazo.
- Secar con una torunda (seca). A los 2' realizar 3 punciones con una lanceta en lugares donde no hayan venas visibles: la 1ra. a los 4 cm por debajo del pliegue y las otras 1.5 cm entre ellas.
- Tomar cada 15' las 3 gotas de sangre (una a una) con un papel de filtro (evitar tocar la piel con el papel) para evitar la formación de trombos.
- Los coágulos que se formen, naturalmente sobre las heridas, no deben tocarse porque se prolongará de modo artificial el tiempo de sangramiento.

### *Valores normales*

X +-2DS
2' 30"-- 7' 15" (Instituto Angiología, 1977)
1'-5' (IHI)

## Interpretación semiológica

Se observa prolongado en:

- Trombosis venosa
- Déficit plaquetario cualitativo
- Trastornos vasculares
- Tromboastenias (plaquetas en cantidad normal pero deficientes en calidad).
- Trombocitopenias severas

- Drogas (aspirina).

*Esta técnica, aunque es grosera, se puede usar como indicador de la eficiencia de tratamientos con DDAVP y concentrados de FVW. Valor predictivo en pacientes con altas dosis de penicilina sintética y pacientes urémicos.*

### **Prueba del lazo (método de Rumpel Leede)**

#### **Fundamentos**

- Consiste en apreciar el grado de resistencia de los capilares, tratando de provocar la aparición de una púrpura experimental.

#### **Objetivos**

- El objetivo de esta técnica es medir la resistencia capilar.

#### **Materiales**

- Esfigmomanómetro y estetoscopio

#### **Desarrollo de la técnica**

- Se coloca el manguito de un esfigmomanómetro en el brazo por encima del codo, a una presión entre la mínima y la máxima alrededor de 80 mm Hg en niños y 100 en adultos, manteniéndose por espacio de 5 minutos en niños y por espacio de 10 minutos en adultos.

#### **Valores normales**

- Cuando no aparecen petequias negativas en el antebrazo en la zona del pliegue del codo.

#### **Interpretación semiológica**

- La prueba es de tipo cualitativo y se informa positiva cuando se observa la presencia de petequias en el antebrazo y negativa cuando no aparecen.

#### **La prueba de Rumpel Leede es positiva en:**

- Trombocitopenias severas
- Fragilidad capilar, congénita o adquirida
- Vasculitis alérgica de Schönlein-Henoch
- Tromboastenias  $\pm$  (para actividad plaquetaria en la retracción)
- Trombopatias  $\pm$
- Von Willebrand  $\pm$
- Diabetes Mellitus
- Hipertensión
- Sepsis

En la mayoría de estos casos, con tratamiento prolongado de vit. C suele corregirse la alteración en la pared vascular.

La fragilidad vascular se puede estudiar aumentando la presión sanguínea intracapilar por obstrucción de retorno venoso o disminuyendo la presión extracapilar por aplicación de una presión negativa sobre la piel. El número de petequias obtenido está relacionado con la presión capilar alterada y la fragilidad capilar. La fragilidad capilar depende del estado de elasticidad de la pared capilar y de la función plaquetaria.

La fragilidad capilar es un atributo primordial de la concentración de la vitamina C tisular, aunque se puede tener una severa deficiencia de Vit. C y una prueba del lazo normal.

### **Conteo de plaquetas**

#### **Fundamento**

- Utilizar oxalato de amonio con el fin de destruir los eritrocitos, diluir los leucocitos y dejar libres las plaquetas.

#### **Objetivos**

- Determinar de forma cuantitativa de plaquetas.

#### **Materiales**

- Lancetas
- Pipeta de Thomas para glóbulos rojos.
- Cámara contadora de Neubauer

#### **Desarrollo de la técnica**

- Se punciona el pulpejo del dedo desechando las 2 primeras gotas, tomar de una gota de sangre, hasta la marca 1 de la pipeta de Thomas para glóbulos rojos, completando hasta la marca 101 con oxalato amonio 1 % quedando así una dilución 1:100.
- Dejar en reposo de 5 a 10 min. Agitar, desechando las primeras gotas.
- Montar una cámara contadora de Neubauer, dejar en reposo en cámara húmeda durante 5 o 10 minutos para sedimentar las plaquetas.
- Posteriormente se cuenta el cuadrículado central completo y se multiplica el número de células por 1 000 o por las UI; se le agrega al número contado x 109 g/L.

Valores normales: 150,000-350,000 (IHI)

Dilución 100 x altura cámara = 1 000 o UI 150-350 x 10<sup>9</sup>/L

### **Plaquetas por láminas**

#### **Coloración de las láminas**

- May Grumwald- 1 minuto

- H<sub>2</sub>O destilada, echar sin que se bote de la lámina por 1 minuto
- Se enjuaga
- Giemsa (hay que filtrar después de diluir) 1:2, 20 minutos.
- Ver si están bien teñidas las plaquetas.
- Enjuagar.

### Conteo de láminas

- 1 o 2 por campos y pasar 2 campos y no ver < 50 000
- 3 o 4 plaquetas por campo subnormales 100 000 ±
- 8 a 10 plaquetas por campo = 150 000 ±
- Grumos o aglomeraciones en todos los campos- Trombocitosis

*Cuando las plaquetas están bajas se cuentan 10 campos, se suma el total y se multiplica por 2,000. Unidad:  $\times 10^9/L$*

### PFA-100

- Es un método basado en un equipo desarrollado para evaluar la función plaquetaria y se utiliza cuando se sospecha trombocitopatía y antes de realizar la agregación plaquetaria por ser más barato y más rápido.
- Es el paso de la sangre anticoagulada a través de una abertura con una membrana revestida con colágeno y remojado con ADP; se somete a un flujo y se convierte en un test cuantitativo.

### Adhesividad plaquetaria (Método de Salzman)

#### Fundamento

- Tiene su fundamento en la valoración del número de plaquetas que se adhieren a una columna de esferas de vidrio cuando a través de la misma se hace pasar sangre del paciente impulsada para una sección negativa y así hallar diferencia entre el conteo de plaquetas venoso y el conteo de plaquetas después de pasar por la columna de perlas de cristal.

#### Objetivo

- Se realiza para determinar el % de plaquetas que se adhieren en las esferas de vidrio contenidas en la columna atravesada.

#### Materiales

- Jeringuillas plásticas o siliconadas de 20 mL
- Agujas siliconadas o desechables
- Columnas de esferitas de vidrio de 40 mm aproximadamente
- Frasco colector siliconado conteniendo 10 mg de EDTA (EDTA K2) PM

404 47 BDH) al cual se le ha hecho vacío.

- Llave de tres pasos
- Pipeta de Thomas
- Cámara de Neubauer

### Reactivos

- Anticoagulante EDTA 10 mg
- Oxalato de amonio 1% (conteo de plaquetas)

### Equipos

- Balanza
- Microscopio óptico
- Retapadora
- Extractor

### Desarrollo de la técnica

- Extraer con la jeringuilla plástica hasta 10 mL de sangre venosa y sin extraer la aguja.
- Retirar la jeringuilla e instalar una columna plástica de 15 cm de longitud. La columna plástica contiene esferas de vidrio en una extensión de 9 cm del tubo. En los extremos de la columna hay 2 boquillas una para conectar con la aguja de extracción, otra para conectar con la aguja que se introduce en el frasco colector (este contiene 10 mg de EDTA en polvo y se hace vacío anteriormente en el durante 8 minutos. Los extremos de la columna permiten separar su boquilla correspondiente para que la columna y las esferas puedan ser lavadas (la columna es desechable, pero las esferas se recuperan y se lavan cuando estén en cantidades suficientes) para lavarlas depositarlas en mezcla sulfocrómica 24 horas, lavar mucho con H<sub>2</sub>O destilada, ponerlos a secar en horno.
- Colectar la sangre filtrada hasta 1/3 del volumen del frasco (2 mL aproximadamente)
- Efectuar conteo de plaquetas a partir de la jeringuilla y de la sangre del frasco colector.

### Cálculo de los resultados

Conteo de plaquetas en sangre venosa----- 100 %

Conteo de sangre colectada ----- x

X = % de adhesividad

**Valores normales:** 21-58 % (IHI)

*Nota: Los frascos que contienen EDTA hay que siliconizarlos*

### **Interpretación semiología**

- La cifra de plaquetas adhesivas se muestra francamente disminuida en la tromboastenia y la fibrinogenemia, pero en este último defecto se logra la corrección con el agregado de fibrinógeno a la muestra.
- Una moderada disminución se halló en pacientes con deficiencia de F XII.
- No hay alteraciones en pacientes con deficiencia de factor VIII.
- En la enfermedad de Von Willebrand los valores son contradictorios oscilando desde bajos a aumentados.
- Valores bajos de adherencia en uremia.
- Valores aumentados en la diabetes.

### **Agregación plaquetaria macroscópica. Método de Boon**

#### **Fundamento**

- El ADP (adenosin difosfato) en soluciones muy diluidas es un potente agente agregante de las plaquetas *in vitro*.

#### **Objetivos**

- Mediante el ADP se logra una agregación de las plaquetas, que en esta técnica se realiza para medir el tiempo que demora en comenzar dicha agregación y así valorar la actividad plaquetaria.

#### **Reactivos**

- Plasma citratado rico en plaquetas del paciente y de un sujeto normal control.
- Difosfato de adenosina (ADP)

#### **Desarrollo de la técnica**

- Se ponen 2 tubos de Kahn en Baño de María a 37°C rotulados. *Control* (c) y *Muestra* (M)

0,2 mL de PRPc    0,2 mL de PRPp

0,1 mL de ADP    0,1 mL de ADP

Echar a andar el cronómetro y a los 5 seg. empezar a mirar la agregación planetaria. Se observa como una pequeña aglutinación o pequeños grupos que son las plaquetas agregándose.

**Valores normales:**        Hasta 30 seg. (I.H.I)

#### **Interpretación semiología**

- Se altera en tromboastenias (enfermedad de Glazman).

### **Agregación Plaquetaria por método automatizado**

## Fundamento

- Se estudia la respuesta del plasma a tratar con diferentes agentes agregantes, colágeno, epinefrina, ácido araquidónico y ADP midiendo las variaciones de turbidez del medio, en la transmitancia de la luz a través del plasma rico en plaquetas.

## Técnica

- Se centrifuga la sangre a 1 000 rpm por 10 minutos y se extrae el plasma rico en plaquetas, al cual se le cuenta la cantidad de plaquetas con un equipo automatizado.
- La sangre que queda en el tubo después de extraído el PRP, se centrifuga de nuevo 2 500 por 15 min para extraer plasma pobre en plaquetas.
- Se calibran los PRP a 200 plaquetas haciendo diluciones adecuadas con el plasma pobre en plaquetas.

*Esta calibración se hace a los pacientes y a controles, que se buscan en el Banco de Sangre después de asegurarnos que no tomen ningún medicamento*

Se utiliza ADP, colágeno y epinefrina y se mide la agregación en el equipo:

### ADP

Pesar 0,01 g y diluir en 20 mL de IBS (ver reactivos)-stock ADP 100  $\mu$ M

0,4 mL stock ADP + 1.6 mL de BIS---20  $\mu$ M

0.17 mL del 1 + 1.83 mL de BIS—1.7  $\mu$ M

Se toman 200  $\mu$ L de PRP ajustado a 200 plaquetas + 50  $\mu$ L de ADP

Si se realiza la técnica de *hiperagregación plaquetaria*, se valora con las concentraciones de ADP 2), 3), 4) y 5).

- |    |  |             |
|----|--|-------------|
| 1) | 0.4 mL del stock ADP + 1,6 mL del IBS----- | 20 $\mu$ M  |
| 2) | 0.34 mL del 1) + 1,66 mL del IBS-----      | 3.4 $\mu$ M |
| 3) | 0,17 mL del 1) + 1,83 mL del IBS-----      | 1.7 $\mu$ M |
| 4) | 0.08 mL del 1) + 1,92 mL del IBS-----      | 0.8 $\mu$ M |
| 5) | 0.04 mL del 1) + 1,96 mL del IBS-----      | 0.4 $\mu$ M |

### Colágeno

0,05 mL del stock donado por el IHI + 7,5 mL de solución salina

Se toman 250  $\mu$ L de PRP ajustado a 200 plaquetas + 0.025 mL del colágeno

### Epinefrina

0,1 mL de epinefrina (ámpula) + 9,9 mL de solución salina 0,9 %

Se toman 250  $\mu$ L de PRP ajustado a 200 plaquetas + 50  $\mu$ L del agregante.

**Valores normales:**



✧ ADP-	56.9-87.5 %
✧ Colágeno-	80 -96 %
✧ Epinefrina-	64 -87 %

### **Disponibilidad del factor plaquetario 3 (HARDISTY)**

#### **Fundamento**

- La incubación del PRP citratado con Caolín hace posible que alrededor de 5 % de los fosfolípidos plaquetarios sean aprovechados para la coagulación. La máxima aceleración de la formación del coagulo inducido por el Caolín refiere que las plaquetas y los factores del plasma sean activados simultáneamente.

#### **Objetivos**

- Medir la función planetaria y los factores del mecanismo intrínseco de la coagulación en relación con un plasma control en mezcla de PPP y PRP.

#### **Toma de muestras**

- Tubo de centrifuga graduado siliconado 1 mL citrato de Na 3.8 % 9 mL de sangre. Debe ser jeringuilla plástica, si la jeringuilla es de vidrio se desechan los 2 mL primeros pero tratar de que la jeringuilla sea plástica.

#### **Desarrollo de la técnica**

- Centrifugar a 1 500 rpm por 10 seg. para obtener plasma rico en plaquetas del paciente (PRPp).
- Decantamos parte de ese plasma en tubos plásticos o siliconas.
- Se vuelve a centrifugar la sangre restante a 3 000 rpm durante 30 min. para obtener plasma pobre en plaquetas del paciente (Pe) procediendo de igual forma con el control normal.
- Se preparan 4 tubos de Kahn en baño de María a 37°C procediendo a colocar las muestras y controles de la forma siguiente.

Al tubo 1 y 2 poner --- 0,1 mL de PRPc

Al tubo 3 y 4 poner---- 0,1 mL de PRPpte

Al tubo 1 y 3 poner---- 0,1 mL de PPPc

Al tubo 2 y 4 poner---- 0,1 mL de PRP pte

<b>Tubos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
PRPc	0,1	0,1		
PRPp			0,1	0,1
PPPc	0,1		0,1	
PPPpte		0,1		0,1

- A cada tubo agregar 0,2 mL de Caolín 5 mg en salina poniendo en marcha el cronometro por espacio de 20 minutos, mezclar suavemente cada 2 minutos. Parar el cronómetro y por orden sucesivo.
- Agregar 0,2 mL de ClCa 0,033M. Midiendo como tiempo de protrombina (se queda unos 15" en el baño y se ve cuando empiezan a aparecer los grumos.

**Valores normales:** 5 Segundos sobre el control (IHI)

### Interpretación semiológica

- Resultados patológicos cuando el tiempo de los pasos III y IV sea mayor en 3 al tiempo del paso I.
- En el caso de que se encuentre alterado en el paso II es compatible con alteración en los factores plasmáticos del mecanismo intrínseco de la coagulación.
- En el caso que de alterado el tubo #4 con respecto al #1 se debe hacer liberación de factor 3 plaquetarios.
- Control hasta 38 seg. en tubo 1
- T2 prolongado en hemofílicos o en pacientes con déficit de factores plásticos (Tiempo caolín IX, VIII, XI)
- Si el tubo 3 y 4 o el 4 solo dan prolongado se corrobora con tiempo de caolín si es déficit plasmático o plaquetario; si este da prolongado entonces quiere decir que tiene un déficit plasmático y entonces le clasificamos VIII, X y II si estos factores dan normales dosificamos X y I y hacemos tiempo de protrombina para la otra vía (extrínseca)
- Los pacientes con enfermedad de Von Willebrand tienen disminuida la adhesividad plaquetaria y la agregación planetaria con ristocetina alterada.

Nuevo reactivo de Kaolín: 0.5 % de kaolín en buffer imidazol salino

Buffer imidazol salino = 25 mL de stock de buffer imidazol  
 18.6 mL de HCl 0.1 N  
 Completar a 100 mL con solución salina  
 Tomar de esa solución 10 mL y completar hasta 100 mL con solución salina

### **Liberación del factor plaquetario 3 (Prueba de Spaet)**

#### **Fundamento**

- Cuando se produce la activación plaquetaria sobre la superficie de la membrana quedan expuestas los fosfolípidos con actividad procoagulante que facilitan la activación del factor X y la protrombina. Esta actividad se conoce como disponibilidad del factor 3 plaquetario y puede ser evaluado con el tiempo de stypven del PRP activado con Kaolín.

#### **Para paciente y control**

Reactivos:	Imidazol	0.86 g
	ClNa	1,76 g
	Buffer ClH IN	3,092 mL

Se lleva a 200 mL con H<sub>2</sub>O destilada

Se pesan 5 g de kaolín y se añaden 100 mL de buffer.

### **Desarrollo de la técnica**

- ✧ 0,9 mL de PRP
- 0,1 mL caolín 5 % (buffer con kaolín 5 mg)
- 0,45 mL de PRP
- 0,05 mL de caolín 5 % tubo plástico
- ✧ Se incuba 30 minutos a 37°C
- ✧ Pasado ese tiempo se toma
- 0.1 mL de la mezcla incubada
- 0.1 mL de V.V.R. diluido 1:10 en Imidazol (prepararlo al momento)
- 0.1 mL calcio al 0,025 mL
- ✧ Se mira la formación del coagulo.

**Valores normales:** 17 a 23 segundos

### **Retracción cuantitativa del coagulo**

<b>Tubo control</b>	<b>Tubo paciente</b>
3.9 mL de solución salina	3.4 mL solución salina
1 mL de PPP control	1 mL PPP control
0,1 mL de trombina (50 U)	0,5 mL PRP del paciente
	0,1 mL de trombina 50 U/mL
- mezclar rápidamente y esperar 2 a 3 min. a temperatura ambiente	
- incubar 1 hora a 37°C	
- Decantar el plasma y después se obtiene la proporción	
5 mL	-- 100 %
4 mL	-- X
	X= 400 = 80 %

**Cifras normales:** más de 90 %

### **Tromboelastografia**

#### **Fundamento**

- Al transformarse el fibrinógeno en fibrina, la sangre citratada y el plasma recalcificado modifican su consistencia (elasticidad). Si la sangre o el plasma se colocan entre un péndulo elástico que cuelga libremente y un vaso exterior que gira en un ritmo determinado el péndulo se moverá más o menos en dependencia de la coagulación de la sangre o el plasma.
- Puede registrarse fotoquimográficamente la amplitud de las oscilaciones del péndulo elástico mediante un dispositivo especial o algunos equipos que trabajan con papel termosensible, cuya gráfica sale al momento.

### **Objetivos**

- Esta técnica permite estudiar con precisión de forma continua el proceso de la coagulación de la sangre y su potencial dinámico así como todas las causas de influirlo, completando notablemente la exploración de la hemostasia con los test bioclínicos.

### **Materiales**

- Tubos de 10 x 55 mm plásticos
- Tubos de centrifuga
- Pipetas

### **Reactivos**

- Citrato trisódico 9 %
- Citrato trisódico 3.8 %
- Cloruro de Na 0,035 M

### **Equipo**

- Tromboelastógrafo

### **Desarrollo de la técnica**

- Se toman 5 mL de sangre venosa, se centrifuga a 1 000 pm 5 min. para obtener plasma rico y el resto 3 500 rpm a 20 min. para obtener plasma pobre.
- Se extrae 1 mL para un tubo donde hay 0.05 mL de Citrato Trisódico 9 %.
- Colocar en la copilla de la torre número 1 del tromboelastógrafo 0,25 mL de sangre mas 0.1 mL de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0,645 % (sangre) y se baja el embolo de esta torre hasta la aparición de la línea amarilla en la pizarra hasta que vibre poniéndose a correr el papel de fotografía y que empiece a recoger la imagen.
- En la cubeta de la torre #2 se añaden 0,25 mL de plasma rico en plaquetas y 0,1mL  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  1.29 % en la torre #3 0,25 mL de plasma pobre y 0,1 mL de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  1.29 % y se sigue la misma operación explicada anteriormente.

- Se mantiene funcionando el equipo por espacio de 35 min, al cabo de este tiempo se saca el rollo, se revela y se hacen las mediciones del gráfico con una regla graduada en mm.

### Calculo de los resultados r, k y Am (amplitud máxima)

#### Valores normales

- En población mayor de 64 años sana desde el punto de vista vascular periférico.  $X \pm 2DS$

*Nota: Las cubetas se lavan con un palillo con algodón en la punta y mezcla de sulfato de bario igual cantidad, se filtra con una gasa doble. para que no quede algo grueso que pueda rayar*

- **Objetivo 1:** obtener una representación gráfica de todo el curso del proceso de la coagulación.
- **Objetivo 2:** medir la velocidad y la cinética de la disolución fibrinolítica del coágulo.

#### Se ha mostrado de gran utilidad para:

- Detección de deficiencias en el proceso de la coagulación.
- Estudios de la hipercoagulabilidad.
- Alteraciones plaquetarias no trombopénicas.
- Determinación e identificación del déficit de un factor de la coagulación.
- Obtener información sobre la efectividad de los anticoagulantes indirectos. Mediante evolución de los cambios de consistencia del coágulo.
- Cinética de su tesis.

#### Causas de error

- Incorrecta limpieza del cilindro.
- Separación del plasma de la sangre no inmediatamente.
- Que el cilindro no descienda bien.
- Sedimentación de los hematíes.
- Centrifugación muy intensa, sedimentación plaquetas.
- Vibración de la mesa del equipo

**r-** Desde que se le añade ClCa hasta que la curva tome amplitud de 1 mm.

**r-** 8 a 9 min. tiempo de formación de tromboplastina (se le dice al complejo antes de la protrombina) (Instituto de Angiología)

**r-** 4-12 mm (hospital "Hnos.Ameijeiras")

**K** tiempo de formación de trombina 5 a 8 mm (Instituto de Angiología)

**k** 2 a 6 (hospital "Hnos.Ameijeiras")

**r + k** groso modo: tiempo de coagulación en tubo.

**Am**: hasta la formación del coagulo 50 a 60 mm (Instituto de Angiología)

50-74 mm (hospital "Hnos.Ameijeiras")

- |  |  |
|--|--|
| ➤ <b>r</b> esta prolongado   | Defecto de la coagulación  |
| ➤ <b>r</b> corto y <b>k</b> corto o <b>r</b> normal <b>k</b> corto | Hipercoagulabilidad.   |
| ➤ <b>Am</b> disminuido:  | Déficit plaquetario (cualitativo o cuantitativo) o hipofibrinogenemia.   |
| ➤ Interrupciones bruscas del trazado tromboelastográfico           | Alteraciones estructurales del coagulo, descritas en caso de anomalías plaquetarias y en presencia leucos patológicos. |

*Nota: En anemias el coágulo aparece en tiempos prolongados al igual que en falta de fibrinógeno; se pueden definir los casos de hipercoagulabilidad y de hipocoagulabilidad.*

**Am.** Mide la intensidad máxima de las propiedades dinámicas globales del coagulo. A 60 y A 120-60 o 120 min después de la aparición de las propiedades dinámicas máximas del coagulo.

Sangre total decalcificado: sangre con citrato trisódico 9 %.

### **Desarrollo de técnica con el tromboelastógrafo Hellige**

- Sacar 5 mL de sangre total con 0.5 mL de citrato de sodio 3.8 %
- Centrifugar 5 min a bajas soluciones para obtener PRP.
- Poner en copillas y el péndulo después de haberlo lavado con detergente y bario.
- Encender el equipo para que se caliente tanto el equipo como las copillas por espacio de media hora.
- Echar 0.3 mL de PRP en cada copilla.
- Echar el  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  en la 1 copilla 0.06 mL; bajar el embolo 3 veces; poner con el botón de posición donde está el palito; marcar con el botón de *marker* y echar a andar el papel 2 gotas de parafina aceite
- Hacer lo mismo con la otra copilla: 1 copilla control, otra copilla paciente.
- Poner a rodar 30 min.
- Quitar copilla.
- Lavarla con detergente y sulfato de bario.

## **PDF – plasma**

- 1 x 1,3 mL Vial React 1 (Látex )
- 1 x 20 mL Vial React 2 ( Buffer )
- 1 x 0,5 mL Vial React 3 ( Control Neg. )
- 1 x 0,5 mL Vial React 4 ( Control Post )
- 10 Test Tarjetas.
- Mezcladores.

## **Fundamento**

- Detección y semicuantificación de PDF (Producto de la degradación de fibrina / fibrinógeno) en plasma por el uso de partículas de Látex cubierta con Ac Mo para PDF.

## **Explicación**

- El Fibrinógeno es una glicoproteína con un PM 340 000 Daltons, *In Vivo* la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina insoluble. La plasmina rompe el fibrinógeno y fibrina en producto de degradación. Fragmento **X** e **Y** constituyen los primeros productos del fibrinógeno y desde fibrina no entrecruzada; fragmentos D y E constituyen los últimos PDF.
- La degradación de la fibrina estabilizada por plasmina llevan a formación de complejos llamados oligómeros **X** (YXD/DXY, YY/DXD, DY/YD) y finaliza el producto terminal D – Di.
- En condiciones normales el proceso fibrinolítico es localizado sobre el coágulo de fibrina ya que  $\alpha$ -2 antiplasmina y el plasminógeno, impiden la fibrinólisis.
- Durante la CID la fibrinólisis se hace sistémica. Los fragmentos que son producidos son muy heterógenos, productos derivados de fibrina, complejos solubles, PDF y de fibrina no estabilizada.

***Una anormal activación fibrinolítica y fibrinogenolítica con PDF elevados se pueden obtener en:***

- ✧ Eclampsia
- ✧ Carcinomas (leucemia promielocítica)
- ✧ Complicaciones post quirúrgicas.
- ✧ Complicaciones cardiovasculares y hepáticas.
- ✧ Fibrinólisis.
- ✧ Embolismo pulmonar.
- ✧ Trombosis venosas profundas.

- Los PDF son rápidamente aclarados. Así niveles de PDF persistentemente elevados indican que los procesos fibrinolíticos continúan y sugiere que el agente causal mantiene su efecto.

### Principio del test

- En la presencia de Ags las partículas de látex cubierto con Ac Mo anti – PDF aglutinan para formar *clumps* macroscópicos.

### Reactivos

Reactivo 1: 1,3 mL Suspensión látex cubierto con Ac Mo Anti PDF humano.

Reactivo 2: 20 mL Vial de Buffer Glicina.

Reactivo 3: 0,5 mL de Solución Libre de PDF (Control Neg.)

Reactivo 4: 0,5 mL de Solución Libre de PDF (Control Post)

✧ Tarjetas para Test.

✧ Mezcladores.

### Colección de muestras

- Muestra de sangre (9 vol.) es colectada en 0,109 M con citrato trisódico (1 vol.) sol. anticoagulante.
- Centrifugar 10 min. a 2 500 g.
- Almacenar plasma: 8 horas a  $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$   
1 mes a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Poner a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 min. antes del Test.*

### Preparación de reactivos

Reactivo 1: Mantener a temp. ambiente ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ) por 30 min antes de usar

Reactivo 2: Mantener a temp. ambiente ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ) por 30 min.

Reactivo 3 y 4: Se reconstituyen los viales con 1 mL de agua destilada. Mantener a temp. ambiente por 30 min.

Mezcle gentilmente antes de usar.

Estabilidad después de reconstituido: 2 Meses a  $2-8^{\circ}\text{C}$

4 Meses a  $-20^{\circ}\text{C}$

### Procedimiento

- Plasma del paciente: En este protocolo cada plasma es tratado en 2 diluciones:  
1: 2 (50 mL de plasma de paciente + 50  $\mu\text{L}$  de reactivo 2)  
1: 8 (50  $\mu\text{L}$  de plasma de paciente + 350  $\mu\text{L}$  de reactivo 2)

### Ensayo



- Pipetee 20 µL del plasma del paciente 1:2 en un anillo del Test de Tarjeta y 20 µL de dilución 1: 8 en otro anillo.
- Sacuda el reactivo 1 para resuspender y pipetee 20 µL en cada uno de los círculos.
- Mezcle gentilmente el contenido de todos los anillos. Balancear gentilmente las tarjetas, de manera que el líquido no se derrame (por 3 min.)
- Compare el Patrón de Aglutinación de cada dilución de plasma con los Controles: Posit. y Neg.

**Resultados:** Aglutinación **+**: Indica presencia de PDF a concentraciones igual ó mayor de 25 µg/mL

Dilución 1: 2 ES	Dilución 1: 8 ES	Nivel de PDF en plasma no diluido es (µg/mL)
Negativo	Negativo	< 5
Positivo	Negativo	≥ 5 < 20
Positivo	Positivo	≥ 20

(-) (Negat.): No aglutinación. (+) (Posit.): Presencia de aglutinación.

**Valores esperados:** (I. Ref) < 5 µg/mL

#### **Protocolo – semicuantitativo**

- Por testar el plasma a diluciones mayores. Seguir las instrucciones arriba descritas, en cualquiera de los niveles de PDF **se obtienen por multiplicar el límite de detección de PDF del plasma por el número de dilución:**

Por ejemplo: dilución 1: 32 Es la mayor dilución que produce aglutinación; entonces el nivel de PDF es ≥ 80 µg/mL (2,5 µg/mL x 32).

#### **Dímero - D**

#### **Aglutinación por látex (cuantitativa y semicuantitativa)**

Kit para 60 Test.

1 x 1,3 mL Vial Reactivo 1 (Látex)

1 x 20 mL Vial Reactivo 2 (Buffer)

1 x 1 mL Vial Reactivo 3 (Control Neg)

1 x 1 mL Vial Reactivo 4 (Control Posit.)

- Tarjetas para 10 test.
- Mezcladores.

#### **Fundamento**

- Test de Aglutinación en placa, usa Ac Mo de ratón para la determinación cuantitativa y semicuantitativa del D-Di del plasma.

### Explicación

- La degradación específica de la fibrina es el mecanismo reactivo; responde a la formación de fibrina.
- Plasmina es la enzima fibrinolítica la cual deriva del plasminógeno inactivo.
- 2 Vías diferentes de la activación del plasminógeno han sido identificadas:
  - ✧ El activador tisular del plasminógeno, liberado por células endoteliales unidas a fibrina para la cual el ATP tiene una afinidad fuerte y esto lleva a la conversión de plasminógeno en plasmina.
  - ✧ La pro-uroquinasa es activada en uroquinasa por el sistema de contacto de la vía intrínseca, sobre el coágulo la UQ transforma el plasminógeno en plasmina, restringiendo su actividad fibrinolítica y consecuentemente resulta en la localización de su acción fibrinolítica sobre el coágulo de fibrina.
- La plasmina sobre el coágulo de fibrina degrada la fibrina en varios productos para los cuales hay Ac Mo específicos los que no reconocen el fibrinógeno. El D-Di es el fragmento terminal en la degradación de la fibrina.

### Niveles patológicos del D-Di

- Valores aumentados, denota estados de activación de la coagulación, lo cual es seguido por la formación de fibrina y así lleva a la fibrinólisis lo cual es generalmente una respuesta reactiva a:
  - ✧ Trombosis de Venas Profundas.
  - ✧ Embolismo.
  - ✧ CID, hemorragias, cirugías, cáncer, cirrosis.

### Aplicación clínica

- Aunque un nivel elevado de D –Di no es totalmente específico de trombosis, varios estudios demuestran su valor predictivo. En caso de que sea negativo, se excluye la trombosis.
- En el contexto quirúrgico, D-Di aumentado 2-3 días post-cirugía, es evidencia de acción lítica y actividad directa contra la fibrina que es formada como respuesta de la actividad quirúrgica. Así D-Di positivo inmediatamente después de una Cirugía es esperado; por el monitoreo diario deben disminuir los niveles progresivamente en operaciones no complicadas.
- Si D-Di aumentado persiste o tiende al aumento progresivo, es un signo de que puede desarrollar complicaciones tromboembólicas.

### Principio del test

- Las partículas del látex en el test están cubiertas con Ac Mo de ratón contra D-Di; cuando se mezclan con partículas del látex hace que aglutinen, a una concentración predeterminada.

### Colección de muestras

- Muestra de sangre (9 vol.) es colectada con citrato trisódico 0,109 M (1 vol.) como sol. anticoagulante.
- Centrifugar 10 min. a 2 500 g.
- Almacenar plasma: 8 horas a  $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$   
1 mes a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

*Poner a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 min. antes del test.*

### Preparación de reactivos

Reactivo 1: Mantener a temp. ambiente ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ) por 30 min antes de usar

Reactivo 2: Mantener a temp. ambiente ( $18-25^{\circ}\text{C}$ ) por 30 min.

Reactivo 3 y 4: Se reconstituyen los viales con 1 mL de agua destilada. Mantener a temp. ambiente por 30 min.

Mezcle gentilmente antes de usar.

Estabilidad después de reconstituido: 2 Meses a  $2-8^{\circ}\text{C}$

4 Meses a  $-20^{\circ}\text{C}$

### Proceder

- En cada círculo debidamente identificado de la placa, eche 20  $\mu\text{L}$  de muestra (plasma, reactivo 3 y reactivo 4)
- Sacuda el vial del reactivo 1 varias veces, ponga 20  $\mu\text{L}$  de reactivo 1 cerca de muestra en cada círculo. Combine y mezcle las 2 gotas en cada círculo.
- Mueva la Tarjeta por 2- 3 min. de forma que el líquido no sea derramado.
- Compare el patrón de aglutinación de cada círculo con los controles positivo y negativo.

**Resultados:** patrones positivos (+) y negativos (-) deben ser interpretados como sigue:

Plasma no diluido	Presencia de aglutinación	Nivel de D-Di $\mu\text{g/mL}$ FEU
Caso 1	NO	$< 0,5$
Caso 2	SI	$\geq 0,5$

### Determinación semicuantitativa

- Use el Reactivo 2 para diluir el plasma, seguidamente siga los mismos procedimientos descritos arriba.

## Resultados

- Niveles plasmáticos del D-Di son obtenidos multiplicando el límite de detección del Test D-Di por el número de la dilución.

Por ejemplo: si la dilución 1: 8 es la mayor dilución que produce aglutinación: entonces el nivel del D-Di es igual (=) ó mayor (>) 4  $\mu\text{L/mL}$  ( $0,5 \mu\text{g/mL} \times 8$ ).

Plasma muestra					Nivel de D-Di	
Plasma	1: 2	1: 4	1: 8	1: 16	$\mu\text{g/mL FEU}$	
(-)					< 0,5	
(+)	(-)				$\geq 0,5$	< 1.0
(+)	(+)	(-)			$\geq 1.0$	< 2.0
(+)	(+)	(+)	(-)		$\geq 2.0$	< 4.0
(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	$\geq 4.0$	< 8.0
(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	$\geq 8.0$	

## Funcionamiento del coagulómetro Start 4

- El ST 4 es un instrumento que permite realizar estudios de la coagulación sanguínea en una muestra de plasma.

## Características generales

- Temperatura de medición e incubación:  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$
- Expresión de los resultados: en segundos, como una razón, INR, g/L, mg/dL, UI/mL
- Posiciones incubación para muestras: 16 posiciones (4 celdas x 4 columnas)
- Posiciones de medición: 4 posiciones (1 columna)
- Posiciones para los reactivos: 2, una con agitador magnético.
- Posiciones para las pipetas: 2
- Una posición de almacenaje para el dispensador de la bola

## Principio de medición

- La detección del tiempo de coagulación se basa en el aumento de la viscosidad del plasma que se está estudiando; este incremento es medido a través del movimiento pendular de una bola de acero inoxidable.
- El movimiento constante, a una viscosidad constante, se logra a través de dos carriles curvados en las cubetas y un campo electromagnético creado en lados opuestos al pozo de medición. A viscosidad constante el movimiento de la bola permanece constante; cuando la velocidad aumenta por el desarrollo de la coagulación, la amplitud de oscilación de la bola disminuye. Un algoritmo usa estas variaciones en la amplitud de oscilación para determinar el tiempo de coagulación.

## Puesta en marcha

- Encienda el instrumento
- Tan pronto como lo esté se observa en la pantalla el **Menú Principal**:

DIAGNOSTICA STAGO			
1: Test Mode		2: Calibration	
3: Test Parameters		4: System Check	

Presione la tecla # 4, dar **Enter** y observará en pantalla:

System Check	
1: Setup	
2: Diagnostic Test	
Enter code number	

El Setup define la fecha, hora, tipo de identificación del paciente, tipo de pipeta. Presione entonces la tecla # 1 y **Enter** para introducir esos datos:

Date: Mes/día/año
Time: Horas: minutos
Patient ID #: seleccionar la identificación manual o automática

Confirmar siempre con la tecla **Enter** cada dato introducido; esto moverá el cursor para el siguiente parámetro.

Comenzar la realización de los estudios presionando la tecla # 2 y **Enter**, entonces al salir la pantalla seleccione el número de la prueba que usted va a realizar y **Enter** para comenzar el test deseado.

## Funcionamiento del equipo

Para encender el equipo, accionar el interruptor que se encuentra detrás. Cuando aparezca en la pantalla **Fin de Auto Test OK**, se presiona **Enter** y sale el menú principal:

Diagnostica Stago


- |                    |                 |
|--------------------|-----------------|
| 1. Test Mode       | 2. Calibration  |
| 2. Test Parameters | 4. Setup Check. |

## Funcionamiento de la pipeta

Se coloca la punta de 1.25 mL a presión y se baja el dispositivo azul, para llenar la punta de reactivo. Para dispensar el reactivo se aprieta hacia abajo la pestaña que queda del lado opuesto de la anterior.

## Programación del Equipo para realizar Tiempo de Protrombina.

Es necesario programar algunos datos para realizar determinaciones de TP:

- ✧ Presionar el # 3, confirmar con **Enter** (

Para mover el cursor presionar **Enter**.

- ✧ Precisión ----- Poner 5 %

Presionar **Enter** para que salgan las unidades.

En las unidades va a salir la numeración del 1 hasta el 8, donde cada número corresponde a la o las diferentes unidades; presionar el número y **Enter**, en el número de la unidad o unidades que se desee.

Los resultados pueden ser expresados y salir impresos en diferentes formas.

- ✧ Segundos.
- ✧ Proporción (Ratio), tiempo del paciente comparado con tiempo normal.
- ✧ Porcentaje de actividad.
- ✧ Razón Internacional Normalizada (INR)

Para expresar en segundos se presiona el número 6 en las unidades.

Para expresar en INR, presionar la tecla 8 y **Enter**; pero es necesario introducir los valores de la Media Normal del Tiempo de Protrombina (MNPT) y el valor de Índice de Sensibilidad Internacional (ISI).

$$\text{INR: } \left( \frac{\text{ISI}}{\text{TP Pte}} \right)$$

## **MNPT**

- ✧ Poner valor ISI: mover cursor hasta palabra ISI, teclear el # y **Enter**.
- ✧ Para introducir el valor del MNPT, a partir del menú principal:
  - Presionar #2 Calibration, **Enter**
  - Teclear el #1, **Enter**.
  - Introducir la numeración del Lote que corresponda, **Enter** 3 veces

- Sale en la pantalla que introduzca el MNPT por duplicado y se escapa para volver al menú principal.

Para conectar o desconectar la pipeta, introducir el día, la hora y programar si los resultados se quieren de forma individual o automática.

- Para volver a menú principal presionar Escape (tecla del *hombrecito pintado*)
- A partir del Menú Principal, presionar #4 (Setup) y confirmar con **Enter**.
- Presionar #1 (Parameters Systems) y **Enter**
- Teclee día, mes, año (cada vez que fije algún parámetro confirmar con **Enter**)
- Teclear hora, **Enter**.
- En # de pacientes, cambiar con la tecla de triángulo si se quiere la forma de introducir la identificación del paciente individual o automática.
- Seleccionar si se desea trabajar con la pipeta conectada o no.
- Para volver al Menú Principal Escape 2 veces.

### **Técnica del Tiempo de Protrombina**

En el menú principal (Main menu):

- Seleccionar Test Mode, presionando el # 1 y confirmar con **Enter**.
- Aparece en la pantalla todas las determinaciones, presionar 1, que es el Tiempo de Protrombina (TP) y **Enter**, para empezar a introducir las identificaciones de las muestras que se van a procesar.
- Se puede introducir de forma individual o de forma automática (ver más adelante cómo se programa para seleccionar si se quiere individual o automática)
  - ✧ Si se programó de forma individual, teclear las numeraciones de las muestras seguidas de Enter, para terminar se presiona 2 veces **Enter**.
  - ✧ De forma automática, teclear el primer número, a partir del cual, saldrán los próximos números, presionando **Enter**, consecutivamente, terminar presionando al presionar 2 veces **Enter** termina el proceso; no se admiten letras.
- Se colocan las cubetas en el área de incubación de 37°C, por al menos 3 minutos e introducir 1 balín en cada pocillo de la cubeta, 4 pocillos por cada cubeta.
- Se dispensa 50 microlitros de plasma del paciente, estándar o controles.
- Presionar el cronómetro del equipo, situado delante de cada fila del área de incubación, esperar 60 segundos, cuando el instrumento comienza a emitir un sonido agudo, transferir las cubetas al área de prueba.

- Colocar la cubeta en el área de prueba.
- Colocar la punta de 1.25 mL en la pipeta y seleccionar el # 4 en el dispositivo que se encuentra en la posición superior de la pipeta para dispensar 100 microlitros, llenar la pipeta del reactivo tromboplastina cálcica y presionar el botón que está delante de la fila del área de prueba, lo cual activa la pipeta.
- Si la pipeta se puso conectada (ver acápite conexión de la pipeta) adicionar el reactivo de tromboplastina a las 4 casillas de la cubeta, accionando la pestaña de la pipeta hacia abajo.
- Si la pipeta se puso desconectada, hay que activar o sea presionar el botón que está delante de la fila del área de prueba, cada vez que se adiciona el reactivo a cada una de las 4 casillas.

***Salen los resultados en segundos en la pantalla, de cada casilla de determinación.***

### ***Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada***

Es necesario programar algunos datos para realizar las determinaciones.

- Presionar # 3: aparece en la pantalla Test Parameters; confirmar con **Enter**
- Presionar el # 2, aparece TPTA; confirmar con **Enter**:

Se ve: Max time-----	poner 120 seg
Incubation times-----	poner T2: 180 sec. T1:0 sec.
Single/Duplicate-----	Poner <b>Enter</b> cuando salga la palabra simple, si lo desea hacer simple; duplicado, si lo desea hacer duplicado. Para cambiar de simple a duplicado o viceversa, presionar el botón con un triángulo pintado.

Para mover el cursor presionar **Enter**

Precisión -----	Poner 5 %
-----------------	-----------

En las unidades van a salir la numeración del 1 hasta el 8, donde cada número corresponde a la o las diferentes unidades, presionar el número corresponde a la o las diferentes unidades; presionar el número y **Enter**, en el número de la unidad o unidades que se desee.

Los resultados pueden ser expresados y salir impresos en diferentes formas.

- ✧ Segundos.
- ✧ Proporción (Ratio), tiempo del paciente comparado con tiempo normal.
- ✧ Porcentaje de actividad.
- ✧ Razón Internacional Normalizada (INR).



✧ Como TTPA se expresa en segundos, se presiona el # 6.

### ***Técnica del Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada***

En el menú principal (Main menu):

- Seleccionar Test Mode, presionando el # 1 y confirmar con **Enter**.
- Aparece en la pantalla todas las determinaciones, presionar 2, que es el Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TPTA) y **Enter**, para empezar a introducir las identificaciones de las muestras a las que se le quiere hacer la prueba de TPTA.
- Se puede introducir de forma individual o de forma automática (ver más adelante cómo se programa para seleccionar si se quiere individual o automática)
  - ✧ Si se programó de forma individual, teclear las numeraciones de las muestras seguidas de Enter, para terminar se presiona 2 veces **Enter**.
  - ✧ De forma automática, teclear el primer número, a partir del cual, saldrán los próximos números, presionando **Enter**, consecutivamente, terminar presionando al presionar 2 veces **Enter** termina el proceso; no se admiten letras.
- Se colocan las cubetas en el área de incubación de 37°C, por al menos 3 minutos e introducir 1 balín en cada pocillo de la cubeta, 4 pocillos por cada cubeta.
- Se dispensa 50 microlitros de plasma del paciente, estándar o controles.
- Presionar el cronómetro del equipo, situado delante de cada fila del área de incubación, esperar 60 segundos, cuando el instrumento comienza a emitir un sonido agudo, transferir las cubetas al área de prueba.
- Colocar la cubeta en el área de prueba.
- Colocar la punta de 1.25 mL en la pipeta y seleccionar el # 4 en el dispositivo que se encuentra en la posición superior de la pipeta para dispensar 100 microlitros, llenar la pipeta con la mezcla tromboplastina parcial (cefalina o componente fosfolipídico), activado con caolín o ácido elágico, celite, en dependencia del reactivo que se este utilizando y colocadas las cubetas en el área de incubación, dispensar el reactivo.
- Presionar el cronómetro del equipo, situado delante de cada fila del área de incubación, cuando el instrumento comienza a emitir un sonido agudo e intermitente, que es cuando han transcurrido 180 seg, transferir las cubetas al área de prueba.
- Colocar la cubeta en el área de prueba.
- Colocar la punta de 1.25 mL en la pipeta, llenar la pipeta con el reactivo Cloruro de Calcio, seleccionar el # 2 en el dispositivo que se encuentra en la

posición superior de la pipeta para dispensar 50 microlitros, activar la pipeta presionando el botón que está delante de la fila del área de prueba.

- Si la pipeta se puso conectada (ver acápite conexión de la pipeta) adicionar el reactivo de Cloruro de Calcio a las 4 casillas de la cubeta, accionando la pestaña de la pipeta hacia abajo.
- Si la pipeta se puso desconectada, hay que activar o sea presionar el botón que está delante de la fila del área de prueba, cada vez que se adiciona el reactivo a cada una de las 4 casillas.

***Salen los resultados en segundos en la pantalla, de cada casilla de determinación.***

### ***Programación para realizar dosificación de fibrinógeno***

Es necesario programar algunos datos para realizar las determinaciones.

- Presionar el # 3; aparece en la pantalla Test Parameters y confirmar con **Enter**.
- Presionar el # 3, aparece fibrinógeno y confirmar con **Enter**.

Se ve Max time-----	poner 120 seg
Incubation times-----	poner T2: 60 sec. T1:0 sec.
Single/Duplicate-----	Poner <b>Enter</b> cuando salga la palabra simple, si lo desea hacer simple o duplicado, si lo desea hacer duplicado. Para cambiar de simple a duplicado o viceversa, presionar el botón con un triángulo pintado. Se aconseja en esta determinación poner duplicado
Precisión -----	Poner 5 %

En las unidades van a salir la numeración del 1 hasta el 8, donde cada número corresponde a la o las diferentes unidades.

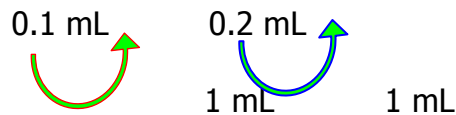
Los resultados pueden ser expresados y salir impresos en diferentes formas: g/L o mg/dL. Para expresar en g/L se presiona el número 3 en las unidades al aparecer en la pantalla Test Parameters.

#### ***1.1.1 Preparación de curva estándar***

- ***Cada dilución de la curva se realiza por duplicado***
- Por definición la dilución 1:20 del calibrador corresponde al valor de fibrinógeno reflejada en el prospecto del calibrador. Suponiendo que el calibrador que se va a utilizar tiene una concentración de 3.20 g/L:

Dilución	1:7	1:10	1:20	1:40
Buffer Owren-Koller	0.6 mL	1.8 mL	1 mL	1 mL

Calibrador



Niveles de fibrinógeno (g/L) 9.14 6.40 3.20 1.60

- Realizar la determinación a cada dilución de la curva, para obtener los valores en segundos.
- Para guardar los datos de las concentraciones con los segundos e imprimir la curva
  - ✧ Desde el menú principal presionar 2 y **Enter**.
  - ✧ *Calibration* e ir introduciendo los segundos y las concentraciones según indica.

### ***Dosificación de fibrinógeno***

En el menú principal (Main menu)

- Seleccionar test Mode, presionando el # 1 y confirmar con **Enter**.
- Aparece en la pantalla todas las determinaciones, presionar 3, que es la dosificación de fibrinógeno y **Enter**; para empezar a introducir las identificaciones de las muestras a las que se le quiere hacer la prueba de dosificación de fibrinógeno.
- Se puede introducir de forma Individual o Automática. (ver en la Técnica de TP como se programa para seleccionar si se quiere individual o automática.)
- Si se quiere de forma individual, teclear las numeraciones de las muestras seguidas de **Enter**, para terminar se presiona 2 veces **Enter**.
- De forma automática, teclear el primer número a partir del cual saldrán los próximos números, presionando **Enter**, consecutivamente, al presionar 2 veces **Enter** termina el proceso, no se admiten letras.
- Se diluyen las muestras y los controles con una dilución 1:20 (0,1 mL de plasma +1.9 mL de buffer Owren Koller)
- Se colocan las cubetas en el área de incubación de 37°C por al menos 3 min e introducir 1 balín en cada pocillo de la cubeta, (4 pocillos por cada cubeta)
- Se dispensa 100 microlitros de la dilución plasma del paciente, estándar o controles.
- Presionar el cronómetro del equipo, situado delante de cada fila del área de incubación, esperar 60 segundos, cuando el instrumento comienza a emitir un sonido agudo, transferir las cubetas al área de prueba.

- Salen los resultados en segundos en la pantalla, de cada casilla de determinación.**

- Seleccionar test Mode, presionando el # 1 y confirmar con **Enter**.

- Aparece en la pantalla todas las determinaciones, presionar 6, que es otras determinaciones (Others) y presionar 2, que es Tiempo de Trombina, confirmar con **Enter**, para empezar a introducir las identificaciones de las muestras a las que se le quiere hacer la prueba de Tiempo de Trombina.
- Se puede introducir de forma individual o de forma automática. (ver en tiempo de protrombina como se programa para seleccionar si se quiere individual o automática)
- Si se quiere de forma individual, teclear las numeraciones de las muestras seguidas de **Enter**, para terminar se presiona 2 veces **Enter**.
- De forma automática, teclear el primer número a partir del cual saldrán los próximos números, presionando **Enter**, consecutivamente, al presionar 2 veces **Enter** termina el proceso, no se admiten letras.
- Se colocan las cubetas en el área de incubación de 37°C por al menos 3 min e introducir 1 balín en cada pocillo de la cubeta (4 pocillos por cada cubeta).
- Se dispensa 100 microlitros de plasma del paciente, estándar o controles.
- Presionar el cronómetro del equipo, situado delante de cada fila del área de incubación, esperar 60 segundos, cuando el instrumento comienza a emitir un sonido agudo intermitente, transferir las cubetas al área de prueba.
- Colocar la cubeta en el área de prueba.
- Colocar la punta de 1.25 mL en la pipeta y seleccionar el # 4 en el dispositivo que se encuentra en la posición superior de la pipeta para dispensar 100 microlitros, llenar la pipeta del reactivo de trombina. y activar la pipeta presionando el botón que está delante de la fila del área de prueba.
- Si la pipeta se puso conectada (ver acápite conexión de la pipeta en Tiempo de Protrombina) adicionar el reactivo de trombina a las 4 casillas de la cubeta, accionando la pestaña de la pipeta hacia abajo.
- Si la pipeta se puso desconectada, hay que activar o sea presionar el botón que está delante de la fila del área de prueba, cada vez que se adiciona el reactivo a cada una de las 4 casillas.
- Salen los resultados en segundos en la pantalla, de cada casilla de determinación

### **Curva de dosificación de factores**

#### **Preparación de la curva para todos los factores**

- Es necesario realizar la curva para dosificar cada factor.
- Si se tiene calibradores con las concentraciones de los factores, la dilución 1:10 corresponde al valor de la concentración indicada en el prospecto del calibrador.

- Si no se tiene calibradores, se prepara una mezcla de plasma de 10 donantes de banco de sangre, supuestamente normales y por definición la dilución 1:10 corresponde al 100 % de la concentración de los factores.

Suponiendo que el calibrador que se va a utilizar tiene concentración de 100%:

Dilución	1:10	1:20	1:40	1:80
Buffer Owren-Koller	1.8 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Calibrador	0.2 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Concentración de Factores	100 %	50 %	25 %	12.5 %

### **Dosificación de Factores II, V, VII, X**

#### **Programación equipo para realizar dosificación de factores II, V, VII, X**

- El procedimiento para dosificar los factores II, V, VII, X es el mismo, lo único que varía es el reactivo factor deficiente, este reactivo contiene todos los factores, menos el que se va a dosificar, por lo que si dosificamos el factor II, contiene todos los factores excepto el factor II, si dosificamos el factor V contiene todos los factores, excepto el factor V y así sucesivamente.
- Primeramente se debe realizar la técnica de dosificación de factores a cada uno de las diluciones de la curva para obtener los tiempos que se demoran en coagular cada dilución, introducir esos tiempos y las concentraciones correspondientes, en un programa que se explicará más adelante y posteriormente realizar el control y los pacientes para obtener el % de factores que presenta.
- Es importante diluir el plasma de los pacientes 1:10 con buffer
- Es necesario programar algunos datos para realizar las determinaciones de Factores.

#### **1.2 Desde el menú principal**

- Presionar el # 3, aparece en pantalla Test Parameters; confirmar con **Enter**.
- Presionar el # 4, aparece dosificación de factores. y confirmar con **Enter**.
- Seleccionar el factor II, presionando el número 1, dependiendo el factor que se va a realizar, hay que teclear el número que corresponda a cada factor y así para el factor V el número 2, el factor VII el número 4 y X el número 5.

Se ve            Max time-----            poner   120 seg  
                     Incubation times-----            poner T2: 60 sec. T1:0 sec.  
                     Single/Duplicate-----Poner **Enter** cuando salga la palabra simple, si lo desea hacer simple o duplicado si lo desea hacer duplica-

do. Para cambiar de simple a duplicado o viceversa, presionar el botón con un triángulo pintado. Se aconseja poner duplicado.

Precisión -----

Poner 5 %

En las unidades van a salir la numeración del 1 hasta el 8, donde cada número corresponde a la o las diferentes unidades, presionar el número y **Enter**, en el número de la unidad o unidades que se desee.

Los resultados pueden ser expresados y salir impresos en diferentes formas.

- ✧ Segundos.
- ✧ Proporción (Ratio), tiempo del paciente comparado con tiempo normal.
- ✧ Porcentaje de actividad.
- ✧ Razón Internacional Normalizada ( INR)

*Se debe seleccionar la unidad Porcentaje de Actividad.*

Procedimiento para realizar la dosificación de factores a muestras, controles y cada dilución de la curva estándar:

En el menú principal (Main menu)

- Seleccionar Test Mode, presionando el # 1 y confirmar con **Enter**.
- Aparece en la pantalla todas las determinaciones, presionar 4, que es Dosificación de Factores y **Enter**.
- Dependiendo el factor que se va a realizar, hay que teclear el número que corresponda a cada factor, por ejemplo, si se quiere realizar la dosificación del factor II se presiona el número 1 y a continuación **Enter**, y así para el factor V el número 2, el factor VII el número 4 y el X el número 5, a continuación empezar a introducir las identificaciones de las muestras que se van a procesar.
- Las identificaciones de las muestras, se pueden introducir de forma individual o de forma automática. (ver en TP como se programa, para seleccionar si se quiere individual o automática)
- Si se programó de forma individual, teclear las numeraciones de las muestras seguidas de **Enter**, para terminar se presiona 2 veces **Enter**.
- De forma automática, teclear el primer número a partir del cual saldrán los próximos números, presionando **Enter**, consecutivamente, al presionar 2 veces **Enter** termina el proceso, no se admiten letras.
- Se colocan las cubetas en el área de incubación de 37°C por al menos 3 min e introducir 1 balín en cada pocillo de la cubeta (4 pocillos por cada cubeta).
- Colocar la punta de 1.25 mL en la pipeta y seleccionar el # 2 en el dispositivo que se encuentra en la posición superior de la pipeta para

dispensar 50 microlitros, llenar la pipeta del reactivo de factor deficiente II, V, VII o X en dependencia del factor que se este dosificando y activar la pipeta presionando el botón que está delante de la fila del área de prueba.

- Dispensar 50 microlitros de la dilución del plasma del paciente, estándar o controles.
- Presionar el cronómetro del equipo, situado delante de cada fila del área de incubación, esperar 60 segundos, cuando el instrumento comienza a emitir un sonido agudo intermitente transferir las cubetas al área de prueba.
- Colocar la cubeta en el área de prueba.
- Colocar la punta de 1.25 mL en la pipeta y seleccionar el # 4 en el dispositivo que se encuentra en la posición superior de la pipeta para dispensar 100 microlitros, llenar la pipeta del reactivo de tromboplastina cálcica y activar la pipeta presionando el botón que está delante de la fila del área de prueba.
- Si la pipeta se puso conectada (ver acápite conexión de la pipeta) adicionar el reactivo de tromboplastina cálcica a las 4 casillas de la cubeta, accionando la pestaña de la pipeta hacia abajo.
- Si la pipeta se puso desconectada, hay que activar o sea presionar el botón que está delante de la fila del área de prueba, cada vez que se adiciona el reactivo a cada una de las 4 casillas.

***Salen los resultados en segundos en la pantalla, de cada casilla de determinación.***

Para introducir los resultados en segundo de las diluciones de la Curva Patrón y las concentraciones correspondientes a cada dilución.

Después que se le realizaron las determinaciones a cada dilución de la curva patrón, se debe desde el menú principal

- Presionar #2 Calibration, **Enter**
- Teclear el #4.
- Seleccionar dependiendo del factor que se va a dosificar el número correspondiente a cada factor y confirmar con **Enter**.
- Introducir la numeración del Lote que corresponda, **Enter** 3 veces.
- Teclear el valor de las concentraciones y los segundos de cada dilución, según se lo pide la pantalla. Para mover el cursor presionar **Enter**.
- Para determinar el Porcentaje de Actividad de cada factor de una muestra, se diluye la muestra con una dilución 1:10 y se realiza la determinación a la dilución, como se describió arriba, sale impreso el Porcentaje de Actividad de la o las muestras que se ensayaron.

***Dosificación de factores VIII, IX, XI***



### ***Programar el equipo para realizar dosificación de factores VIII, IX, XI***

- El procedimiento para dosificar los factores VIII, IX, XI es el mismo, lo único que varía es el reactivo factor deficiente, este reactivo contiene todos los factores, menos el que se va a dosificar, por lo que si dosificamos el factor VIII, contiene todos los factores excepto el factor VIII, si dosificamos el factor IX contiene todos los factores, excepto el factor IX y así sucesivamente.
- Primeramente se debe realizar la técnica de dosificación de factores a cada uno de las diluciones de la curva para obtener los tiempos que se demoran en coagular cada dilución, introducir esos tiempos y las concentraciones correspondientes, en un programa que se explicará más adelante y posteriormente realizar el control y los pacientes para obtener el % de factores que presenta.
- Es importante diluir el plasma de los pacientes 1:10 con buffer
- Es necesario programar algunos datos para realizar las determinaciones de Factores.

#### **Desde el menú principal**

- Presionar el # 3, aparece en pantalla Test Parameters; confirmar con **Enter**.
- Presionar el # 4, aparece dosificación de Factores.
- Presionar el botón donde está dibujado un triángulo, que dice otros.
- Seleccionar el factor VIII, presionando el número 1, dependiendo el factor que se va a realizar; hay que teclear el número que corresponda a cada factor y así para el factor IX el número 2 y para el factor XI el número 3.

Se ve	Max time-----	Poner 200 seg
	Incubation times-----	Poner T2: 180 sec. T1:0 sec.
	Single/Duplicate-----	Poner <b>Enter</b> cuando salga la palabra simple si lo desea hacer simple o duplicado, si lo desea hacer duplicado. Para cambiar de simple a duplicado o viceversa, presionar el botón con un triángulo pintado; las dosificaciones de factores se recomiendan realizarla por duplicado.
	Precisión -----	Poner 5 %

En las unidades van a salir la numeración del 1 hasta el 8, donde cada número corresponde a la o las diferentes unidades, presionar el número y enter, en el número de la unidad o unidades que se desee.

Los resultados pueden ser expresados y salir impresos en diferentes formas:

✧ Segundos.

- ✧ Proporción (Ratio), tiempo del paciente comparado con tiempo normal.
- ✧ Porcentaje de actividad.
- ✧ Razón Internacional Normalizada ( INR)

*Se debe seleccionar la unidad Porcentaje de Actividad*

### **Procedimiento para realizar la dosificación de factores a muestras, controles y cada dilución de la curva estándar**

En el menú principal (Main menu)

- Seleccionar Test Mode, presionando el # 1 y confirmar con **Enter**.
- Aparece en la pantalla todas las determinaciones, presionar 4, que es Dosificación de Factores y el botón que tiene pintado un triángulo, que significa otros.
- Hay que teclear el número que corresponda a cada factor, dependiendo el factor que se va a realizar, por ejemplo, si se quiere realizar la dosificación del factor VIII se presiona el número 1 y a continuación **Enter**, y así para el factor IX el número 2 y el factor XI el número 3, a continuación empezar a introducir las identificaciones de las muestras que se van a procesar.
- Las identificaciones de las muestras, se pueden introducir de forma Individual o de forma Automática. (ver en TP como se programa, para seleccionar si se quiere individual o automática)
- Si se programó de forma Individual, teclear las numeraciones de las muestras seguidas de **Enter**, para terminar se presiona 2 veces **Enter**.
- De forma automática, teclear el primer número a partir del cual saldrán los próximos números, presionando **Enter**, consecutivamente, al presionar 2 veces **Enter** termina el proceso, no se admiten letras.
- Se colocan las cubetas en el área de incubación de 37°C por al menos 3 minutos e introducir 1 balín en cada pocillo de la cubeta (4 pocillos por cada cubeta).
- Colocar la punta de 1.25 mL en la pipeta y seleccionar el # 2 en el dispositivo que se encuentra en la posición superior de la pipeta para dispensar 50 microlitros; llenar la pipeta del reactivo factor deficiente VIII, IX, XI en dependencia del factor que se este dosificando.
- Dispensar 50 microlitros de la dilución del plasma del paciente, estándar o controles.
- Colocar la punta de 1.25 mL en la pipeta y poner la rueda en posición 2 para dispensar 50 microlitros de la mezcla tromboplastina parcial (cefalina o componente fosfolípido), activado con kaolín o ácido elágico, celite, en dependencia del reactivo que se este utilizando, llenar la pipeta del reactivo y colocadas las cubetas en el área de incubación, dispensar el reactivo.

- Presionar el cronómetro del equipo, situado delante de cada fila del área de incubación, esperar 180 segundos, cuando el instrumento comienza a emitir un sonido agudo intermitente, transferir las cubetas al área de prueba.
- Colocar la cubeta en el área de prueba.
- Colocar la punta de 1.25 mL en la pipeta y poner la rueda en posición 2 para dispensar 50 microlitros, llenar la pipeta del reactivo cloruro de calcio y activar la pipeta presionando el botón que está delante de la fila del área de prueba.
- Si la pipeta se puso conectada (ver acápite conexión de la pipeta) adicionar el reactivo de cloruro de calcio a las 4 casillas de la cubeta, accionando la pestaña de la pipeta hacia abajo.
- Si la pipeta se puso desconectada, hay que activar o sea presionar el botón que está delante de la fila del área de prueba, cada vez que se adiciona el reactivo a cada una de las 4 casillas.

***Salen los resultados en segundos en la pantalla, de cada casilla de determinación.***

Para introducir los resultados en segundo de las diluciones de la Curva Patrón y las concentraciones correspondientes a cada dilución:

Después que se le realizaron las determinaciones a cada dilución de la curva patrón, se debe desde el menú principal

- Presionar #2 Calibration, **Enter**
- Teclear el #4, presionar el botón que tiene el dibujo de un triángulo.
- Seleccionar dependiendo del factor que se va a dosificar el número correspondiente a cada factor.
- Introducir la numeración de los Lotes de los reactivos que corresponda, **Enter** 2 veces.
- Teclear el valor de las concentraciones y los segundos de cada dilución, según se lo pide la pantalla. Para mover el cursor presionar **Enter**.
- Para determinar el Porcentaje de Actividad de cada factor de una muestra, se diluye la muestra con una dilución 1:10 y se realiza la determinación a la dilución, como se describió arriba, sale impreso el Porcentaje de Actividad de la o las muestras que se ensayaron.