

GENERALIDADES SOBRE LAS PRUEBAS DE HEMOSTASIA

1. PREPARACION DEL PACIENTE.

El paciente ha de estar en ayunas o, al menos, no haber ingerido alimentos grasos en las horas inmediatamente precedentes a la extracción, ya que estos dan lugar a plasmas lipémicos que pueden plantear problemas a la hora de la detección fotométrica del coágulo.

El enfermo no tiene que tomar ninguna medicación durante, al menos, las dos semanas previas al análisis. Hay que investigar y anotar la toma de ácido acetilsalicílico, heparina, anticoagulantes orales y otros fármacos que pueden potenciar o reducir el efecto de éstos.

2. EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA.

La extracción sanguínea tiene que realizarse con el menor estasis circulatorio posible (poco apretado y se mantendrá el menor tiempo posible).

Durante la punción venosa, para no contaminar la sangre con tromboplastina tisular, que puede activar la coagulación, se ha de causar un daño mínimo a los tejidos circundantes. Lo mejor es el uso de un sistema de extracción múltiple que incluye tubos con vacío interno (por ejemplo, el sistema Venoject o el Vacutainer) y no insertar primero, en la aguja extractora, el tubo destinado a la recogida de sangre para pruebas de hemostasia.

3. ANTICOAGULACIÓN DE LA MUESTRA.

Se utiliza el citrato trisódico que conserva mejor los factores de la coagulación (concentración de 0,11 moles/litro - 2,8 g de citrato trisódico puro por 100 ml de disolución acuosa). Inmediatamente después de finalizada la extracción, mezcla la sangre con el anticoagulante y evita la formación de espuma y la rotura de hematíes, que son ricos en tromboplastina tisular. Se mezcla 1 parte de citrato trisódico con 9 partes de sangre venosa.

Las diferencias entre el plasma y suero son:

- El plasma es la parte líquida de la sangre. Fuera del sistema vascular la sangre puede mantenerse líquida eliminando el fibrinógeno o añadiendo anticoagulantes (citrato, oxalato), los cuales evitan la coagulación por su acción quelante sobre los iones calcio. El plasma recién extraído contiene todas las proteínas presentes en la sangre circulante. Sin embargo, a medida que el tiempo de conservación del plasma aumenta, la actividad de los factores V y VIII disminuye gradualmente.

- El suero es el líquido producido cuando la sangre ha coagulado. La coagulación convierte todo el fibrinógeno en fibrina sólida y consume en este proceso los factores II, V y VIII. Las restantes proteínas de la coagulación permanecen en el suero a la misma concentración que tenían en el plasma (VII, IX, X, XI, XII, XIII, PK, HMWK).

4. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

En algunas ocasiones, se procesa la sangre anticoagulada con la aspiración de obtener un plasma carente de algunos factores. Esto, por ejemplo, se lleva a cabo mediante sustancias adsorbentes, como el hidróxido de aluminio o el sulfato de bario, que retiran del plasma los factores dependientes de la vitamina K.

4.1 Obtención de Plasma Rico en Plaquetas (PRP).

Se logra centrifugando a unas 1000 rpm durante 10 minutos, tras lo cual se retira, rápidamente, del resto, el sobrenadante y se transfiere a un tubo adecuado. Se suele emplear para estudios plaquetarios.

4.2 Obtención de Plasma Pobre en Plaquetas (PPP).

Se logra centrifugando a unas 3000 rpm durante 10 minutos, tras lo cual se retira rápidamente, del resto, el sobrenadante y se transfiere a un tubo adecuado. Se emplea para pruebas de coagulación.

4.3 Obtención de plasma adsorbido.

El plasma adsorbido se usa en alguna de las pruebas de mezclas.

- a) Añadir una parte de gel de hidróxido de aluminio a 9 partes de plasma citratado.
- b) Agitar la mezcla.
- c) Incubar a 37°C durante 5 minutos.
- d) Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- e) Decantar el sobrenadante (el plasma adsorbido), con una pipeta Pasteur.

4.4 Obtención de suero.

El suero, en hemostasia, se usa en alguna de las pruebas de mezclas, en la determinación de AT III y en la detección de PDF.

- a) Dejar que la sangre extraída, no anticoagulada, se coagule. Dejar la sangre, a temperatura ambiente, durante un período comprendido entre los 30 y los 120

minutos. También se puede incubar la sangre, en un baño de agua, a 37°C durante 20 a 30 minutos, lo que hace que ésta coagule antes.

- b) Desprender suavemente el coágulo de las paredes del tubo, con un tubo capilar o una pipeta Pasteur.
- c) Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- d) Decantar el sobrenadante con una pipeta Pasteur. Esto se ve facilitado, en los tubos que tienen un gel de silicona, ya que éste forma una interfase entre el suero y la fracción forme de la sangre.

Si se pretende obtener suero a partir de sangre de enfermos heparinizados, ésta se coagula añadiendo 0,2 ml de reptilase por cada 2 ml de sangre total.

5. CLASES DE PRUEBAS.

Varias pruebas se basan en la capacidad antigénica de algunos factores de la coagulación, pero, la mayoría de ellas, aprovechan las capacidades funcionales de la mayor parte de estos factores.

5.1 DETERMINACIONES CRONOMÉTRICAS

5.1.1 Visual.

Consiste en inclinar ligeramente el tubo a un ritmo de una inclinación por segundo hasta que el coágulo de fibrina se observe, permaneciendo en todo momento en el baño de agua para no alterar la temperatura.

5.1.2 Técnica del asa de platino.

Consiste en introducir el asa de platino dentro de la mezcla, a un ritmo de dos pases por segundo, hasta que el coágulo quede adherido al asa. Hay aparatos que reproducen, de manera automática, el movimiento manual del asa y que detectan, electrónicamente, el coágulo formado. Estos aparatos se llaman fibrómetros.

5.1.3 Fotométrica.

La detección fotométrica del coágulo se lleva a cabo por un sistema fotodetector que capta la formación del mismo e indica el tiempo transcurrido desde el inicio del proceso coagulatorio. Se realiza mediante los coagulómetros.

COAGULÓMETRO

En este aparato, la mezcla de plasma y reactivos, adecuadamente mantenida a la temperatura óptima de reacción, se deposita en una cubeta especial que contiene un trocito de acero (una bolita o una barrita).

La cubeta está situada entre un emisor de luz ultravioleta y un fotodetector.

Cuando se añade, a la mezcla, el reactivo desencadenante (cloruro cálcico), se pone en marcha un magnetoagitador y comienza la lectura.

El magnetoagitador provoca una rotación del trocito de acero, que impide la sedimentación de los reactivos, facilita el mezclado homogéneo entre éstos y la muestra, y posibilita un posicionamiento perfecto del coágulo en el paso óptimo del fotodetector.

A medida que aumenta la opacidad de la mezcla, llega menos luz al fotodetector y, por lo tanto, disminuye la tensión de salida de éste. Al formarse el coágulo de fibrina, la opacidad de la mezcla se incrementa bruscamente, y la reducción en las señales que llegan al microprocesador hace que éste finalice la lectura y pare el cronómetro.

El dato de tiempo registrado por el cronómetro es ofrecido al analista en una pantalla y/o es impreso.

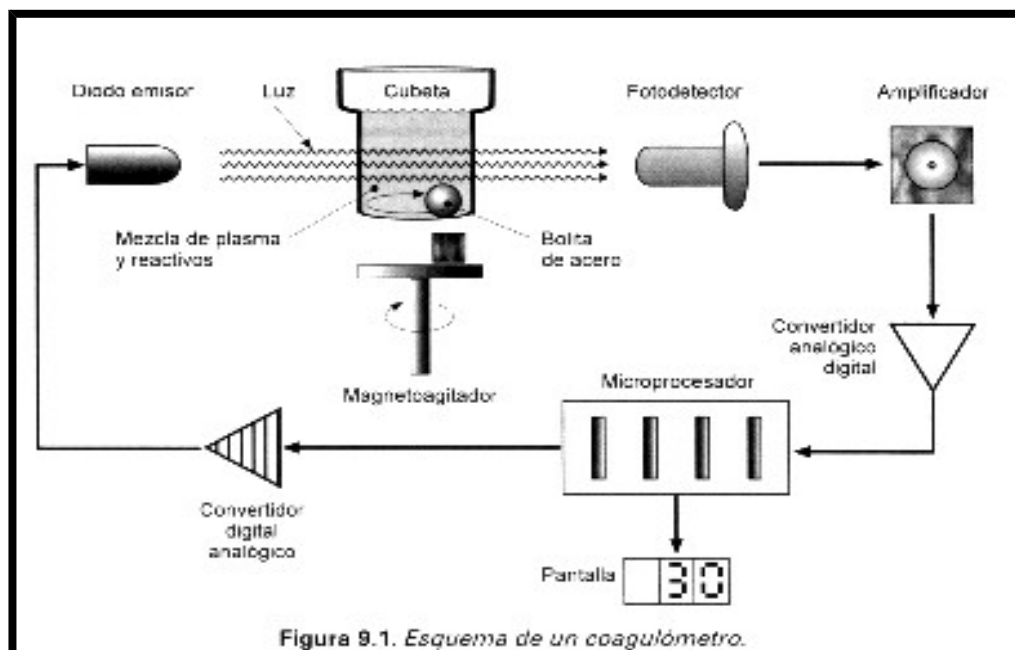


Figura 9.1. Esquema de un coagulómetro.

Los coagulómetros también suelen constar de una placa calefactora que puede ser utilizada para realizar las incubaciones necesarias para la ejecución de estas pruebas.

5.2 DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS

Esta capacidad enzimática de algunos factores puede ser aprovechada para su determinación. Esto se lleva a cabo enfrentando al factor buscado en la muestra con un sustrato sintético incoloro susceptible de ser atacado por aquél. El sustrato sintético es cromogénico y está compuesto por una secuencia de aminoácidos ligada, a nivel de su extremo carboxílico, a una sustancia coloreada (por ejemplo, la para-nitroanilina o pNA). La secuencia de aminoácidos es idéntica a la atacada por el factor investigado, cuando reacciona con el sustrato-factor fisiológico.

Cuando el factor analizado interacciona con el sustrato sintético, libera la sustancia coloreada y desencadena la aparición de un color, cuya intensidad puede ser medida espectrofotométricamente.

La velocidad de aparición del color es directamente proporcional a la actividad enzimática del factor investigado y ésta lo es, a su vez, a la concentración del mismo en la muestra problema.

Estas determinaciones enzimáticas son, por tanto, de tipo cinético.

5.3 DETERMINACIONES INMUNOLÓGICAS.

La mayoría de los factores de la coagulación son de naturaleza proteica y, por tanto, tienen una capacidad antigénica. Debido a ello, estas sustancias pueden ser detectadas y cuantificadas mediante técnicas inmunológicas (inmunodifusión radial, inmunoturbidimetría, ...)

Hay que recordar que sólo se investiga la presencia en la sangre de sustancias con una estructura antigénica análoga a la de los factores que se buscan, y no es posible evaluar la capacidad funcional de éstos.