

RECOMENDACIONES PARA LA ETAPA PRE-ANALÍTICA, ANALÍTICA Y POST-ANALÍTICA EN LAS PRUEBAS DE COAGULACIÓN.

OCTUBRE 2021

AUTORES

T.M. MSp. Eduardo Retamales Castelletto.

Jefe Sección Hematología e Inmunohematología.
Subdepartamento Enfermedades No Transmisibles.
Departamento Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de
Salud Pública de Chile.

BQ. Hugo Moscoso Espinoza.

Jefe de Subdepartamento de Enfermedades No Transmisibles.
Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE

Dra. Verónica Ramírez Muñoz.

Jefe Subdepto Coordinación Externa. Departamento Laboratorio
Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública
de Chile.

REVISORES EXTERNOS

Comité de Expertos PEEC Coagulación.

T.M. Mg Cs José Díaz Garrote.

Profesor de Hematología, Pontificia Universidad Católica de
Valparaíso.

Dr. T.M. Neftalí Guzmán Oyarzo.

Laboratorio de Investigación en Salud de Precisión,
Departamento de Procesos Diagnósticos y Evaluación, Facultad
de Ciencias de la Salud Universidad Católica de Temuco.

Dr. TM. Iván Palomo González.

Director del Programa de Investigación en Factores de Riesgo
de Enfermedades Cardiovasculares y docente de la Universidad
de Talca.

Dra. Elena Nieto Soto.

Encargada del Programa de Tratamiento Anticoagulante TAC -
CDT SS Metropolitano Occidente.

Dra. María Mónica Juliá Garau.

Jefa de Laboratorio Clínico. Hospital San Borja Arriarán.

RECOMENDACIONES PARA LA ETAPA PRE-ANALÍTICA, ANALÍTICA Y POST-ANALÍTICA EN LAS PRUEBAS DE COAGULACIÓN.

RESUMEN

Este documento presenta los lineamientos técnicos para la obtención, transporte, procesamiento e informe de pruebas de coagulación, con énfasis en el tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, fibrinógeno, tratamiento anticoagulante oral y mezclas de plasma. Expone además información actualizada, para la prevención de los errores más habituales o puntos críticos de la práctica diaria en el laboratorio de coagulación y control de tratamiento con anticoagulante/inhibidor.

ALCANCE

Está dirigida a los laboratorios clínicos que realizan estudios de coagulación, y dentro de éstos, particularmente al tiempo de protrombina (TP) y su informe en segundos (s), actividad (%), tratamiento anticoagulante oral (TAC) y su informe en INR, tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) y su informe en segundos (s), fibrinógeno (FB) y su informe en segundos (s) y concentración (mg% o gr/L) y estudio de mezcla de plasma para TP y TTPa cuando corresponda.

Estas recomendaciones deben ser difundidas a profesionales de los laboratorios clínicos que desarrollan la especialidad de Hematología, dentro de esta área la de coagulación, sean éstos de instituciones públicas o privadas de la Red Nacional de Laboratorios Clínicos.

INTRODUCCIÓN

El Laboratorio Nacional de Referencia de Hematología del Instituto de Salud Pública de Chile, en un trabajo consensado del Primer Taller de Coagulación, iniciado el 22 de junio de 2007, propone los puntos críticos para la obtención, procesamiento e informe de las pruebas de coagulación de uso más frecuente en los laboratorios de coagulación y control de tratamiento anticoagulante/inhibidor.

La actividad-taller se desarrolló mediante la formación de grupos de trabajo que analizaron diversas variables en el proceso de prestaciones de coagulación y expusieron la necesidad de materializar en un documento, la estandarización y normalización de procesos en esta materia. La actividad-taller en referencia, interpretó adecuadamente la realidad nacional, dada la representatividad de la audiencia y permitió establecer un ordenamiento simple y general de cómo abordar las variables pre-analíticas, analíticas y post-analíticas relacionadas con las prestaciones de coagulación.

El Subprograma de Coagulación del Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) del Instituto de Salud Pública fue creado en el año 1981, se realizó un envío de plasma control a los hospitales bases de los 27 Servicios de Salud de la época. Actualmente la participación del PEEC de coagulación reúne aproximadamente a 438 laboratorios tanto públicos como privados (dato que se ha mantenido entre 2013 a 2020) y reciben un total de cuatro envíos anuales. Los resultados de cada laboratorio son ingresados a

la plataforma “Portal PEEC” para luego ser analizados, interpretados e informados a los usuarios mediante estimadores, como media robusta, desviación estándar robusta, diferencia porcentual (%D), incertidumbre y Z-score para el desempeño de los participantes.

La información generada y consensuada a través de resultados de los talleres de coagulación, participación de expertos en el área de coagulación, validación de la información con el comité de consultores externos de coagulación y aprobación del Laboratorio Nacional y de Referencia de Hematología, permite entregar los lineamientos procedimentales para los procesos pre analíticos, analíticos y post de analíticos de las pruebas de coagulación, proponiendo a modo de recomendación acciones correctivas y preventivas para los puntos críticos de análisis, con la finalidad de lograr mejorar la exactitud y precisión de las medidas.

DEFINICIONES Y ABREVIACIONES

CV: Coeficiente de variación – es el cociente entre la desviación estándar y la media multiplicado por 100 y que corresponde a una medida de dispersión o error aleatorio denominada imprecisión.

%D: Diferencia Porcentual – variación que presenta la estimación de la media obtenida respecto del valor asignado por consenso que corresponde al error sistemático y es representativo de la inexactitud (1).

HEMOSTASIA SECUNDARIA: Comúnmente llamada coagulación. Proceso enzimático complejo en que ocurre activación secuencial de proteínas de la coagulación cuyo resultado final es la formación de una malla de fibrina insoluble o estable. El fibrinógeno tiene la capacidad de polimerizar con otras moléculas iguales para formar un agregado macromolecular que forma una red tridimensional, incluye la participación de las plaquetas.

INR: El acrónimo significa International Normalized Ratio (INR), es la manera de estandarizar los valores obtenidos a través del tiempo de protrombina, para la monitorización de pacientes con tratamiento anti-coagulante/inhibidor oral con antagonistas de la vitamina K. Los fabricantes del reactivo tromboplastina asignan un valor de ISI (Índice Internacional de Sensibilidad) para su reactivo, el cual se compara con una tromboplastina de referencia o normalizada a nivel internacional. El INR es entonces la proporción del tiempo de protrombina del paciente con respecto a un control normal, elevado a la potencia del valor ISI específico para el método y equipo empleado (2).

TP: El Tiempo de Protrombina es el método de elección para controlar el tratamiento anticoagulante/inhibidor (TAC) oral con antagonistas de la vitamina K. El TP es sensible a la disminución de 3 de los 4 factores dependientes de vitamina K (II, VII y X). El TP se realiza agregando calcio y tromboplastina al plasma citratado. El término “tromboplastina” se refiere al reactivo cuyos componentes corresponden a un extracto factor tisular y fosfolípidos obtenidos de diversas fuentes. Las distintas tromboplastinas disponibles varían marcadamente en su respuesta a la reducción de factores provocada por los anticoagulantes/inhibidores orales u otras patologías que afectan a estos factores (3).

TTPa: Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado es una prueba sensible al efecto inhibitorio de la Heparina no Fraccionada sobre la trombina, (el mecanismo de acción de heparina es potenciar ATIII para inhibir a Trombina y en menor proporción FXa). El efecto anticoagulante/inhibidor de la heparina no fraccionada es comúnmente y rutinariamente controlado mediante el TTPa (3).

SENSIBILIDAD: Proporción de muestras positivas o reactivas correctamente identificadas por la prueba. La sensibilidad, expresada en tanto por ciento, representa el porcentaje de resultados positivos respecto al total de enfermos, esto es, el porcentaje de verdaderos positivos que se obtendría al aplicar la prueba diagnóstica a los enfermos (4).

ESPECIFICIDAD: Proporción de muestras negativas (no reactivas) que son correctamente identificadas. La especificidad, expresada en tanto por ciento, representa el porcentaje de resultados negativos respecto del total de personas sanas, esto es, el porcentaje de verdaderos negativos obtenido al aplicar la prueba a personas sanas (4).

INTERVALO DE ALERTA; INTERVALO CRÍTICO: intervalo de los resultados de exámenes críticos que indica un riesgo inmediato de daño o muerte para el paciente.

NOTA 1 El intervalo puede ser abierto, donde sólo se define un punto de corte.

NOTA 2 El laboratorio determina la lista apropiada de pruebas de alerta para sus pacientes y usuarios.

RECOMENDACIONES

I.- ETAPA PREANALÍTICA

A. Solicitud de examen

La solicitud de examen tiene ser legible para obtener datos demográficos completos del paciente, deberá contener la información de acuerdo al Reglamento de Laboratorios Clínicos (Decreto N°20/2012) (5), entre ellos contiene los siguientes datos:

- Fecha y hora de la recepción de la muestra.
 - Nombre y apellidos, RUN, fecha de nacimiento, edad y sexo del paciente.
 - Nombre, firma y número de RUN del profesional que solicitó el análisis y/o persona que lo requirió y domicilio del establecimiento.
 - Tipo de muestra y examen(es) solicitado(s).
 - Membrete o timbre del establecimiento solicitante o del profesional.
 - Fecha de la solicitud de examen.
- Los laboratorios que mantienen registros manuales de solicitud de exámenes, deben establecer procedimientos que aseguren la trazabilidad con los informes de resultados que emiten.
 - Las solicitudes de exámenes y los resultados deben mantenerse disponibles, de acuerdo al Decreto N° 20/2012 Reglamento de Laboratorios Clínicos” por al menos 5 años (5) o por el Decreto N° 161/1982 “Reglamento de Hospitales y Clínicas” por al menos 10 años, según corresponda (6).

B. Obtención de muestra de sangre

- La manipulación y disposición de material biológico, debe realizarse de acuerdo a las recomendaciones de la normativa vigente. En este contexto se deben aplicar las precauciones estándares, manipulación o tratamiento debe ser considerado como potencialmente infeccioso (7).
- La punción venosa o arterial, debe ser realizada por un profesional de salud entrenado en flebotomía y manejo de reacciones adversas.
- Para punción venosa utilizar torniquete por un tiempo máximo de 1 minuto a 40 mm Hg (si es posible, no utilizarlo), a modo de referencia los 40 mm Hg corresponden a 5 mm de profundidad del nivel de la piel y tiene el objetivo de normalizar la vasoconstricción venosa (8).
- La punción con el sistema de vacío es la recomendada, se realiza con una técnica que asegure la misma trayectoria de la aguja con la vena, en ángulo de aproximadamente 30°. Esto evita la obstrucción del flujo de sangre. En el caso de utilizar jeringa, la aspiración debe ser suave sin forzar su llenado y evitando un flujo acelerado (hemólisis). En su defecto, el aspirado muy lento induce a la activación de la coagulación y la formación de microcoágulos.
- Obtenida la muestra por jeringa, sacar la aguja con pinza eliminando en recipiente de desecho cortopunzante y traspasar la muestra a tubo celeste correspondiente (citrato de sodio al 3.2 %).

- Los resultados del TP y TTPA no se ven afectados si para el llenado de tubos se utiliza en primer lugar el tubo para pruebas de coagulación con citrato de sodio. Sin embargo, aún es desconocido, el efecto en el orden de llenado de tubos, para otras pruebas de coagulación, en cuyo caso se recomienda el siguiente orden (8):
 - 1° frascos hemocultivos.
 - 2° tubos de coagulación.
 - 3° tubos para suero con o sin activador de coágulo, con o sin gel.
 - 4° tubos de heparina o con gel-plasma separador.
 - 5° tubos con EDTA.
 - 6° tubos inhibidores de glicolisis.
- Si las muestras han sido obtenidas con mariposas, descartar para pruebas de coagulación el volumen de sangre contenido en la tubuladura.
- En ningún caso, utilizar muestras de sangre para pruebas de coagulación extraídas desde sistemas para la administración de medicamentos o fluidos como bránulas, fístulas arteriovenosas de pacientes en diálisis, catéter, etc.
- La proporción anticoagulante/sangre se ve afectada cuando el llenado es menor al 90% del volumen ideal (3). El tubo recomendado además es aquel en que una vez lleno, queda un espacio (espacio muerto) para producir la suficiente turbulencia para la homogenización correcta entre la sangre y el anticoagulante, dicha homogenización según CLSI corresponde a 10 mezclas entre palma y palma con la tapa hacia arriba, 10 mezclas con la tapa hacia abajo y 10 inversiones completas (sin agitar). No es suficiente el efecto de la velocidad del flujo sanguíneo en el llenado del tubo para lograr la homogeneidad con el anticoagulante. Es recomendable y en la medida de lo posible utilizar un agitador mecánico de muestras. La omisión de este paso genera una anticoagulación parcial de la muestra y por el contrario si la agitación es vigorosa, producirá hemólisis.

C. Colección de muestra, almacenamiento y transporte.

- El tubo (polipropileno) indicado para colectar pruebas de coagulación, es aquel que contiene citrato de sodio, a una concentración de 3,2 % (0,109 mol/L) ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y utilizada en una relación al décimo entre anticoagulante/sangre [1+9] (3). Se recomienda que los laboratorios de coagulación, adquieran tubos comerciales de citrato de sodio al 3,2 % ya que éstos permiten controlar los errores en la preparación de los tubos con anticoagulantes, además deben indicar niveles de volumen de llenado y fecha de expiración en su etiqueta.
- Idealmente, el transporte de la muestra al laboratorio debe estar dentro del tiempo de 1 hora desde la toma de muestra. En el caso de TP puede almacenarse hasta 24 hrs. a temperatura ambiente, a diferencia para TTPa (sin tratamiento con heparina) el tiempo de almacenamiento no debe superar 4 horas, en su defecto 1 hora (pacientes tratados con heparina) (3).
- En el caso que las muestras vayan a ser procesadas durante la misma jornada de trabajo deben mantenerse a temperatura ambiente.

- El material del tubo de colección puede ser plástico (polipropileno) o tubos de vidrio recubiertos en silicona (3). Las diferentes marcas poseen presentaciones con diferentes volúmenes (recién nacidos, pediátricos, adultos), esta heterogeneidad del sistema de tubos y su adquisición, implica mantener adecuadamente informados sobre cualquier cambio a los encargados de toma de muestras. Se debe insistir y condicionar a los encargados de toma de muestras, sobre el nivel aceptable (3) de llenado de tubos para pruebas de coagulación (90%).
- El tubo recomendado para obtención de muestras para pruebas de coagulación en recién nacidos es sin vacío, manteniendo todas las otras características de su homólogo pediátrico y/o adulto (8).

D. Criterios de aceptación y rechazo de muestras

Los laboratorios de coagulación deben contar con procedimientos, instructivos y registros para la aceptación y rechazo de muestras. Los instructivos serán aplicados por los encargados de toma de muestra, la unidad de recepción de muestras del laboratorio y el profesional encargado del área. Se sugieren los siguientes criterios de rechazo de muestras:

- Muestra coagulada.
- Muestra derramada sobre el tubo o contenedor de transporte.
- Llenado del tubo, criterio +/- 10% del volumen ideal.
- Muestras en tubos donde la etiqueta comercial, no coincide con el color de la tapa.
- Rotulación del tubo, nombres y apellidos no legibles.
- No correspondencia entre los datos de la solicitud de examen y la rotulación del tubo.
- Muestra hemolizada, lipémica o icterica (visualización post centrifugado, el rechazo o aceptación dependerá del método de medición).
- Tubos con muestras espumosas (exceso de agitación).
- Tubos inadecuadamente cerrados.
- Muestras sin espacio muerto.
- Tubos con anticoagulante distinto a citrato de sodio.
- Fecha y hora de toma de muestras fuera de los tiempos de conservación de la muestra.

E. Procesamiento primario o fraccionamiento de las muestras (centrifugación)

- Asegurarse que las muestras no presentan coágulos visibles, en el caso de sospecha verificar con una varilla de plástico su presencia.
- Las muestras de sangre para realizar Tiempo de Protrombina, Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada y Fibrinogenemia serán centrifugadas para obtener un plasma pobre en plaquetas ($< 10 \times 10^9$ /L), la velocidad recomendada es 1500 g durante 15 minutos y a la temperatura ambiente establecida por el laboratorio (ej: 17-25°C). En el caso de solicitar sólo TTPa se recomienda centrifugar a 4-8°C. El planteamiento matemático para resolver la equivalencia entre fuerza centrífuga relativa (fcr) y revoluciones por minuto (rpm) es:

$$fcr = 1,118 \times 10^{-5} \times r \text{ (cm)} \times \text{rpm}^2$$

r= radio del rotor

- La muestra de plasma para el TP es estable en el tubo hasta por 24 horas desde obtenida la muestra (3), si se mantiene a temperatura ambiente sin centrifugar o centrifugada sin destapar. El mismo periodo de estabilidad a temperatura ambiente presenta la muestra de plasma que ha sido centrifugada y separada del contenido celular en el mínimo tiempo.
- En el caso del TTPa el plasma es estable en el tubo hasta por 4 horas (desde obtenida la muestra) a temperatura ambiente, sin centrifugar o centrifugado sin destapar. El plasma para TTPa centrifugado y separado del contenido celular es estable por 4 horas a 4-8°C o a temperatura ambiente. Para el monitoreo a través del TTPa de pacientes tratados con heparina no fraccionada las muestras deben ser centrifugadas antes de una 1 hora de recolectadas (3).
- Las muestras para la determinación de pruebas de hemostasia, por ejemplo, pruebas de tamizaje, medición de proteínas anticoagulantes naturales y factores de coagulación presentan estabilidad variable, por lo que se recomiendan los requisitos indicados para la prueba del TTPa (3).
- Si las pruebas de Tiempo de Protrombina, Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada y Fibrinogenemia no se pueden realizar en los rangos de tiempo señalados, el plasma pobre en plaquetas debe ser removido de la fracción celular y almacenar a -20 ° C o -70 ° C, lo que permitirá obtener resultados representativos para estas pruebas hasta por 2 semanas si se conserva a -20°C y 12 meses en caso de conservar a -70°C (3).

II.- ETAPA ANALÍTICA

Control de instrumentos y equipos

- Para garantizar la calidad analítica se debe verificar, controlar y registrar los volúmenes de dispensación de los equipos.
- Las micropipetas deben estar verificadas en balanzas que se encuentran debidamente calibradas y que se controle dicha calibración rutinariamente. El laboratorio puede verificar localmente sus micropipetas, para ello requiere de una balanza analítica de sensibilidad de 1×10^{-4} gr y la tabla de conversión de la densidad del H₂O a diferentes temperaturas, siendo 1.0 g/mL a 15°C (la precisión y exactitud de las micropipetas debe ser inferior a un CV de 1 %). Las micropipetas nuevas deben estar acompañadas de un certificado de calibración vigente. Las puntas para micropipetas han de considerarse como un insumo único, dedicado y desechable.
- En el caso de equipos de coagulación, sean propios o en cualquier condición de convenio cliente-proveedor, la mantención preventiva y reparativa debe ser llevada a cabo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante con registros documentados y trazables de cada una de las intervenciones realizadas. Se mantiene un registro histórico de las mantenciones, así como en su defecto, la descripción del problema que generó su mal funcionamiento.

B. Sistema de gestión de calidad

- Los procedimientos de examen validados utilizados sin modificaciones para TP, TTPa y FB se deben someter a una verificación independiente por parte del laboratorio, idealmente antes de ser introducidos en el uso de rutina. El laboratorio debe obtener información del fabricante o de quien haya desarrollado el método para confirmar las características de funcionamiento del procedimiento. La verificación independiente por parte del laboratorio debe confirmar, a través de la obtención de evidencia objetiva, que las características de desempeño para el procedimiento de examen se han cumplido y las cuales deben ser pertinentes al uso previsto de los resultados de los exámenes. El laboratorio debe documentar el procedimiento utilizado para la verificación y registrar los resultados obtenidos.
- Se debe llevar registro de los controles del equipo, temperaturas de incubadores de muestras-reactivos, volúmenes de dispensación y tiempos de incubación.
- Se debe mantener registro para la gestión de los reactivos, plasma control, plasma calibrador en torno a cambios o variaciones:
 - a. Marcas y proveedores.
 - b. Lotes.
 - c. Fecha de solicitud.
 - d. Fecha y conformidad de la recepción en el laboratorio.
 - e. Fecha de elaboración.
 - f. Fecha de expiración.
 - g. Periodo de uso (inicio y término).
 - h. Registro de almacenamiento y control de temperaturas.
 - i. Otros antecedentes.

C. Aseguramiento de la calidad

Control de calidad interno

- Establecer y documentar políticas y procedimientos referidos al control de calidad interno.
- Es recomendable proyectar las adquisiciones con los proveedores de material control y reactivos con lotes que abarquen un periodo de por lo menos 1 año.
- Se recomienda el uso de material control comercial liofilizado en dos niveles e integrados en cada corrida analítica.
- El material de control liofilizado debe reconstituirse de acuerdo a las especificaciones del fabricante, en términos generales indican: reconstituir con agua destilada grado reactivo, dejar el material de control en reposo entre 15 y 30 minutos o como lo declare el proveedor en el inserto.
- El volumen de agua para la reconstitución debe ser medido con micropipetas controladas. En el caso de no contar con micropipetas se puede usar alternativamente pipeta verificada de doble aforo de 1 mL.
- El material de control reconstituido y sin alicuotar es estable a 4°C por 72 hrs. confirmar lo que señala el fabricante en el inserto para el reactivo dedicado. En el caso de alicuotar utilice tubos eppendorf o criotubos con el volumen suficiente para uso diario, en este último caso almacenar a -20°C con estabilidad por 2 semanas. Para descongelar utilizar baño maría a 37° C por el tiempo mínimo (3 a 5 minutos).
- Para el cálculo de los límites de control se sugiere utilizar el modelo "N20" u otros similares, acto seguido aplicar un método para exclusión de aberrantes (Dixon o Grubbs). Definidos los límites de control estos deben ser presentados a través de un método gráfico por ejemplo: gráficos de Levey–Jennings (1).
- Graficar los resultados de cada control y corrida analítica, manteniendo registro de la evaluación diaria e histórica del CCI.
- La evaluación del resultado obtenido en una corrida analítica en el CCI permitirá optar por una decisión precautoria o de rechazo de acuerdo a las reglas de Westgard definidas e implementadas en cada laboratorio y para cada prueba en particular. El análisis de los resultados permite la aceptación de la corrida analítica y el seguimiento de la confiabilidad metrológica a través de la imprecisión analítica.
- El seguimiento de la variabilidad en las mediciones de las muestras a través del CCI se realiza a través del cálculo del coeficiente de variación (CV). Corresponde a uno de los estimadores de variabilidad y expresa la imprecisión de los resultados frente al uso de reactivos e instrumentos (volúmenes de dispensación, sistema de lectura, temperaturas de incubación, etc.). Es aceptable que el CV intra-laboratorio para el TP y TTPa sea menor de 5 % para un mismo lote de control normal o anormal.

Control de calidad externo

- El laboratorio debe participar de un Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) que proporcionaría, en lo posible, muestras semejantes a las de pacientes. El Jefe de laboratorio debe hacer seguimiento de los resultados y participar en la implementación de acciones correctivas, cuando no se cumpla el criterio de desempeño del proveedor de pruebas de aptitud (13).
- Se recomienda considerar las siguientes actividades y buenas prácticas en el establecimiento de un sistema de control de calidad externo para los métodos cuantitativos:
 - a. Establecer y documentar políticas y procedimientos referidos al control de calidad externo.

- b. Asignar las responsabilidades en el análisis y revisión de los resultados de control.
- c. Seleccionar los programas externos en base a criterios estandarizados.
- d. Establecer requisitos de calidad en base a la información disponible.
- e. Mantener los registros de los resultados de control, correcciones realizadas y acciones correctivas implementadas.
- f. Analizar los resultados de las evaluaciones oportunamente para la aplicación de acciones de mejora y registro de las mismas.
- g. Mantener registros de cambio de lote de reactivos de plasma valorado, plasma calibrador, controles de equipos, temperaturas de reactivos, volúmenes de dispensación, tiempos de incubación, tiempo de adquisición y registro del cumplimiento de las reglas de Westgard a modo de establecer la trazabilidad de éstos con los resultados del PEEC.
- h. Se recomienda analizar en conjunto los datos del control de calidad interno y externo utilizando los cálculos de error total, error sistemático crítico, sigma métrico y OPSpecs Charts (1).

D. Análisis de muestra y variabilidad de las mediciones

- Las determinaciones con resultados no esperados respecto a las mediciones históricas o resultados anormalmente patológicos, deberán repetirse verificando antes la calidad de la muestra y los resultados del control de la corrida analítica que corresponda al resultado en cuestión. En el caso de repetir la determinación la diferencia entre los duplicados no debe superar el 5% del primer valor obtenido.
- Si observa un resultado anormalmente alto (valor crítico) aplicar los procedimientos definidos internamente por cada laboratorio para verificación de valores críticos y su comunicación. Se presenta como ejemplo la siguiente tabla.

Tabla 1.

Valores Críticos para pruebas globales de Hemostasia secundaria.

Examen	Valores		Unidades
	Menor o igual a	Mayor o igual a	
Tiempo de Protrombina con tratamiento anticoagulante	1	5*	INR
Tiempo de Protrombina sin tratamiento anticoagulante	25	—	% Actividad
Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada	—	180	s
Fibrinógeno	50	600	mg/dL

Nota 1. (*) El valor crítico implica comunicación inmediata con el clínico. Debería establecerse un criterio con el policlínico de control TACO.

Nota 2. (*) Si el paciente está en control con tratamiento anticoagulante no debiera evaluarse como crítico, si el rango de INR se encuentra dentro de lo requerido para la indicación clínica de la anticoagulación.

- En la actualidad no se recomienda el uso de métodos manuales (tubo inclinado) para las pruebas de coagulación, basado en la dificultad en la estandarización y menor rendimiento en cuanto a la obtención de resultados con una exactitud y precisión aceptable, comparado con los métodos ampliamente disponibles a nivel nacional.
- El sistema INR está basado en una relación matemática entre el cociente del TP obtenido con la prueba de la tromboplastina y la preparación de referencia internacional (PRI) usando un método manual para la detección del coágulo. Sin embargo, el uso de equipos automatizados, han incorporado nuevas variables a la medición (volumen, estabilidad eléctrica, temperatura) lo cual exige mayor control sobre el equipo.
- En cuanto a la corrección del anticoagulante respecto del hematocrito, los resultados de pruebas de coagulación pueden ser afectados, por la variación de la proporción anticoagulante / hematocrito. Cuando el hematocrito sea superior a 55% se sugiere corregir el volumen de anticoagulante mediante un nomograma. En este caso se debe obtener una muestra en el tubo preparado con el volumen del anticoagulante citrato de sodio 3,2% de acuerdo a la siguiente fórmula (3):

$$\text{Vol. de anticoagulante (mL)} = \frac{100 - \text{hto paciente (\%)}}{595 - \text{hto paciente (\%)}} \times \text{Vol. de sangre muestra}$$

- Actualmente no existe evidencia suficiente para corregir el volumen del anticoagulante para pruebas de coagulación en los casos de anemias severas (hematocrito <20%).
- La curva de calibración de TP (semilogarítmica) permite extrapolar los resultados en segundos del TP en porcentaje de actividad de protrombina, además define el valor 100% de actividad (media geométrica del tiempo en segundos) para calcular el INR.
- En el caso de los pacientes monitorizados con Tratamiento Anticoagulante/inhibidor con antagonistas de la vitamina K (TAC) se debe usar el International Sensitivity Index (ISI) de la tromboplastina cálcica comercial, idealmente corresponderá al método y modelo de equipo (2).

$$\text{INR} = \left(\frac{\text{TP paciente (s)}}{\text{TP media geométrica (s)}} \right)^{\text{ISI}}$$

- Se ha corroborado que el ISI proporcionado por las marcas de tromboplastinas, aún siendo éstas específicas para el método y modelo del equipo, no siempre satisfacen la realidad instrumental del laboratorio. Para ello se recomienda realizar el cálculo del ISI local (2).
- Es recomendable la utilización de tromboplastinas cuyos ISI no sean superior a 1,4. Considerando que el valor de INR es calculado por la elevación del cociente de los tiempos de tromboplastinas al ISI, deduce que el CV del INR está relacionado con el CV del cociente del TP y al valor del ISI. Se puede concluir entonces que si el valor del ISI es constante se obtiene la siguiente fórmula: CV de INR = ISI x CV del TP. Esto indica que la precisión puede ser mejorada usando reactivos con ISI bajo.

E. Estudios de mezclas

Los estudios de mezclas son pruebas de coagulación que se utilizan para distinguir entre una deficiencia de factor de coagulación, como es la deficiencia de factor VIII o presencia de un inhibidor de factor, como un inhibidor específico del factor VIII o anticoagulante lúpico. La prueba se realiza cuando un paciente tiene una prolongación inexplicable de un examen de evaluación de la coagulación, como el tiempo de tromboplastina parcial activada, aunque también se puede realizar para el estudio del tiempo de

protrombina (16). Al mezclar un plasma de paciente con niveles muy bajos de factores de coagulación será compensado con el plasma normal que trae un 100% de actividad de cada uno de ellos (9). Por otro lado, también es importante conocer la frecuencia de los inhibidores en pacientes con hemofilia, cuya presencia corresponde al 30% de las Hemofilias severas y a un 2 – 8% de las moderadas (9).

Los estudios de mezclas son pruebas simples de primera línea que se pueden ejecutar en todo laboratorio de coagulación, como procedimiento preliminar para investigar la prolongación del TP o TTPa, en casos de déficit de factores de la coagulación, inhibidores o anticoagulantes. El estudio de mezclas consiste en combinar el plasma del paciente con plasma normal, para luego evaluar si el tiempo de coagulación se normaliza (corrige) o permanece prolongado (no corrige) (10) (16).

Estos estudios tienen dos etapas: la inmediata y la incubada. La primera se realiza inmediatamente después de mezclar el plasma del paciente y el plasma normal. En el caso de la segunda, se realiza luego de incubar la mezcla de plasma durante una a dos horas a 37 °C (11). Es necesario tener presente que las tromboplastinas que se utilicen como reactivos puedan ser menos sensibles a la presencia de un anticoagulante circulante, en este caso el estudio de mezcla podría aportar escasa información.

En este documento se describen dos metodologías, Porcentaje de Corrección e Índice de Rosner. Al respecto, la corrección o la no corrección de las pruebas de coagulación se determina mediante el cálculo del Porcentaje de Corrección 1:1 (una parte de plasma del paciente con una parte del plasma normal) y 4:1 (cuatro partes de plasma del paciente con una parte del plasma normal) para TP y TTPa y el Índice de Rosner 1:1 (una parte de plasma del paciente con una parte del plasma normal) sólo para TTPa. En bibliografía presentada se pueden encontrar algoritmos que orientan al laboratorio los pasos a seguir (10 y 11).

La interpretación de los estudios de mezclas, requieren la normalización matemática cuando se utiliza el Porcentaje de Corrección 1:1 ó 4:1. Se debe considerar que en el caso de la dilución 4:1 el plasma normal sólo provee un 20% de factores para corregir una deficiencia (16). Destacar que existen publicaciones en donde se compara el desempeño entre el Porcentaje de Corrección y el Índice de Rosner para anticoagulante lúpico, se recomienda complementar ambas técnicas respetando la mejor sensibilidad y mejor especificidad (9).

Es importante destacar que la presencia de inhibidores de factor de reacción rápida no corregirán los estudios de mezclas o por otro lado, si son dependiente del tiempo de incubación corregirán la mezcla inmediata pero no la incubada (11).

a) Porcentaje de corrección 1:1 o 4:1

Frente a un TP o TTPa prolongado se prepara una mezcla 1:1 o 4:1, entre el plasma del paciente y plasma normal (generalmente control normal), la mezcla se analiza inmediatamente a temperatura ambiente. Si la normalización matemática indica que corrige, significa la presencia de un déficit de uno o varios factores de la coagulación. Si la prueba no corrige significa la presencia de inhibidores, anticoagulantes circulantes o fármacos anticoagulantes.

- **Cálculo y normalización para el porcentaje de corrección 1:1 o 4:1 (11).**

$$\begin{array}{l}
 \text{TIPOS DE MEZCLAS} \\
 \begin{array}{l}
 1:1 \\
 4:1
 \end{array}
 \end{array}
 \left[\begin{array}{l}
 \% \text{ corrección} \\
 \text{(TP)} \\
 \\
 \% \text{ corrección} \\
 \text{(TTPa)}
 \end{array} = \begin{array}{l}
 \frac{TP_P - TP_M}{TP_P - TP_C} \times 100 \\
 \\
 \frac{TTPA_P - TTPA_M}{TTPA_P - TTPA_C} \times 100
 \end{array} \right]$$

p=paciente, M=mezcla, C=control

- **Porcentaje de corrección 1:1 y 4:1 interpretación y desempeño clínico).**

TP INTERPRETACIÓN Y DESEMPEÑO ANALÍTICO			
1:1 TP corrige	> 75 %	S: 95 %	E: 50 %
1:1 TP no corrige	< 70 %	S: 50 %	E: 95 %
4:1 TP corrige	> 40 %	S: 96 %	E: 100 %
4:1 TP no corrige	< 40 %	S: 100 %	E: 96 %
TTPa INTERPRETACIÓN Y DESEMPEÑO ANALÍTICO			
1:1 TTPa corrige	> 70 %	S: 100 %	E: 33 %
1:1 TTPa no corrige	< 58 %	S: 33 %	E: 100 %
4:1 TTPa corrige	> 50 %	S: 88 %	E: 100 %
4:1 TTPa no corrige	< 50 %	S: 100 %	E: 88 %

Ambas pruebas de coagulación TP como TTPa denotan corrección o en su defecto no corrección. Este porcentaje crítico se comporta como cut-off para separar el diagnóstico de laboratorio entre una deficiencia de factores y la presencia de un inhibidor, respectivamente. En este contexto, > 75% significa déficit de factores, de la misma manera, < 70% corresponde a la presencia de un inhibidor (8). De acuerdo a los antecedentes la mejor paridad de sensibilidad y especificidad está dada para la dilución 4:1 con incubación de al menos 1 hora a 60°C (8).

b. Índice de Rosner

Estudio hematológico que mide la presencia o ausencia de factores de coagulación, junto con los tiempos de formación de trombos. En estos casos se supone que el paciente sufre un déficit de algún factor de la vía intrínseca y, en concreto, factores VIII, XI o XII. Para llevarla a cabo, se mezcla en partes iguales el PPP (plasma pobre en plaquetas) problema con PPP normal y se repite la determinación de la TTPa, pero no en el PPP problema, sino en la mezcla de los dos plasmas.

La mezcla de los dos plasmas se evalúa a tiempo cero o inmediata y luego se incuba en el baño de agua a 37°C durante 1 o 2 horas. Si el TTPa se corrige, en el plasma problema falta alguno de los factores de la vía intrínseca que, sin embargo, si está presente en el PPP normal o pool de plasmas normal.

Si el TTPa no se corrige, el trastorno coagulación se debe a otros motivos, por ejemplo, a la actuación de sustancias inhibitoras de la coagulación dependientes del tiempo de incubación.

La corrección o la no corrección del TTPa se determina mediante el cálculo del índice de Rosner:

$$IR = \frac{1:1 \text{ TTPa mezcla} - \text{TTPa control}}{\text{TTPa paciente}} \times 100$$

TTPa = Tiempo de tromboplastina parcial activada

Se estima que el TTPa se habrá corregido si el valor del índice de Rosner es inferior al 10 % para el factor deficiente. Por otra parte, no se habrá corregido si el valor del índice de Rosner es superior al 15 % por inhibición de factores (9). Dentro del intervalo mencionado (10 y 15%) corresponden a aquellos resultados que no se pueden categorizar como factor deficiente o presencia de inhibidor.

La presencia de un inhibidor circulante de tipo anticoagulante lúpico no produce en términos generales la exposición a un riesgo mayor de hemorragia, sino trombótico. No obstante, puede darse la ocurrencia de inhibidores específicos contra determinados factores de la coagulación que incrementen el riesgo hemorrágico, al neutralizar parcialmente la función de los mismos, como ocurre en los casos de Hemofilia adquirida A o B u otros factores de la vía intrínseca (10).

Si el laboratorio obtiene corrección de factores tanto en una mezcla inmediata como incubada, lo más probable es una deficiencia de factores; en el defecto que muestre no corrección en ambas metodologías (inmediata e incubada) correspondería a un inhibidor de la coagulación, tipo anticoagulante de lupus. Por otro lado, si los resultados son divergentes, corrección en el inmediato y no corrección en el incubado podría tener un inhibidor de baja potencia como el antifactor VIII. De la misma manera en tiempos muy prolongados por deficiencia de factor, no logran corregir en la mezcla 1:1 (12) (16).

Finalmente, los estudios de mezclas han sido por mucho tiempo usados cuando se tiene un TP y/o TTPa inexplicablemente alargado y aún no existe consenso de criterios definidos para abordar los resultados de corrección o no corrección. La interpretación del Porcentaje de Corrección y el Índice de Rosner hace necesaria su complementariedad y permiten evidenciar muestras anticoagulantes lúpico positivas o negativas (12). Esta asociación entre ambos métodos relaciona un índice de Rosner $\geq 15\%$ y Porcentaje de Corrección TTPa 4:1 $< 50\%$ indicando inhibidor presente, en el caso Índice de Rosner $< 10\%$ y Porcentaje de Corrección TTPa 4:1 $> 50\%$ es factor deficiente. Estos datos corresponden a Valores de referencia recomendados sólo para adultos, en el caso del paciente pediátrico habría que establecer rangos de referencia propio a una actividad (%) menor de factores de coagulación respecto del adulto (17).

De esta manera la recomendación final es que cada laboratorio establezca sus propios cutt off de referencia mediante un estudio que incluya 20 a 30 muestras con factor deficiente y 20 a 30 muestras con anticoagulante (12).

III.- ETAPA POST-ANALÍTICA

- El informe de resultados debe ser revisado antes de emitirlo, verificando si existen valores históricos o condiciones del paciente asociadas a tratamiento o enfermedad que puedan explicar los resultados obtenidos, además verificar la trazabilidad de la información.
- La realización de la validación y firma del informe de resultados de exámenes de coagulación deberá ser realizada por un profesional calificado con formación, experiencia y entrenamiento en pruebas de coagulación.
- El informe de resultados deberá contener la información de acuerdo al reglamento de laboratorios clínicos vigente (5), adicionalmente puede contener los siguientes datos:
 - a. RUT, edad, fecha de nacimiento y género del paciente
 - b. Fecha y hora de la obtención de la muestra,
 - c. Fecha y hora de la recepción de la muestra,
 - d. Método utilizado (coagulométrico y cromogénico).
 - e. Fecha y hora de validación e informe de resultados,
 - f. Nombre y firma profesional que informa y del profesional que lo valida.
- Las solicitudes de exámenes y los resultados deben estar almacenados y disponibles, de acuerdo al Decreto 20/2012 “Reglamento de Laboratorios Clínicos” o por el Decreto N° 161/1982 “Reglamento de Hospitales y Clínicas”, según corresponda.
- Los laboratorios informatizados deben mantener restricción o niveles de acceso segregado para el personal que asegure respaldo, resguardo y confidencialidad de la información.
- El informe de valores críticos debe estar de acuerdo a los procedimientos que establezca cada institución, manteniendo un sistema de registro, notificación manual o automática. La definición de los valores críticos se debe establecer de común acuerdo entre los profesionales del laboratorio y los diferentes servicios clínicos. A modo de recomendación es considerado un valor crítico para TP < de 25% de actividad y TTPa > a 180 segundos.
- Los resultados con actividad de protrombina superior a 100% se recomienda no ajustar o limitar a ese valor, está establecida que la media de 12,0 segundos o 100% de actividad abarca el promedio de la curva de Gauss (hiperprotrombinemias congénitas y adquiridas), reconociendo un intervalo entre 70 a 120 % de actividad.
- La seroteca se presenta como una necesidad en laboratorios que almacenan contramuestras. Los requerimientos del equipamiento frío exigen control periódico de temperatura y mantención preventiva del sistema de refrigeración.
- La disposición transitoria o final de las muestras biológicas requiere de un sistema de eliminación local e institucional. El material biológico deber ser tratado para su descontaminación y entregado a una empresa especialista certificada para su tratamiento final (14).
- El proveedor del coagulómetro debe enviar los antecedentes que respalden la inocuidad de los desechos, en el contexto, que los límites de descarga máxima permitida no sean superada por la neutralización de las soluciones de lavado y factor de dilución del proceso semi o automatizado propiamente tal.

CONSIDERACIONES GENERALES

Se recomienda a los laboratorios que reconozcan las siguientes variables y dependiendo de la importancia que estas tengan a nivel local establezcan registros de control en algunas de ellas. Por ejemplo:

1. Los laboratorios de coagulación deben definir a través de su sistema documental procedimientos de rechazo de muestras, tiempos de respuesta y valores críticos.
2. Los laboratorios centralizados que cuentan con varios puntos de toma de muestra, deberán tener un control estricto de la toma de muestra, establecer controles de tiempo y temperatura en el traslado de las muestras, especialmente si se trata de factores lábiles.
3. Los laboratorios deben contar con indicadores que permitan identificar puntos de mejora y así minimizar los errores de la etapa pre-analítica, para controlar su impacto en las actividades que se desarrollan en dicha etapa y en la seguridad del paciente. Para ello será necesario disponer de registros de eventos, acciones tomadas y verificación de su efectividad.
4. Los laboratorios evaluarán sus resultados del control de calidad interno y externo y mantendrán registro de los análisis realizados y de las acciones correctivas aplicadas en caso de resultados no satisfactorios.
5. Los informes de resultados deben ser firmados por dos profesionales calificados, este acto indica que el informe ha sido validado al contar con una segunda firma (dirección técnica).
6. Los estudios de mezclas son una estrategia simple para identificar directamente un déficit de factores o presencia de un inhibidor.
7. Es relevante que los desechos de los equipos autoanalizadores (15), sean conocidos en cuanto a su cantidad e inocuidad; por lo que es recomendable que el inserto del fabricante declare cuál debe ser su disposición posterior a su uso, de no contar con dicha información, el director técnico lo puede solicitar al representante en Chile.

REFERENCIAS

1. Guía Técnica para el Control de Calidad de mediciones cuantitativas en el Laboratorio Clínico. 2015. Instituto de Salud Pública de Chile.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Procedures for Validation of INR and Local Calibration of PT/INR Systems; Approved Guideline, first Edition. H54-A.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays; Approved Guideline, Fifth Edition. H21A5.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). User Protocol of Evaluation of Qualitative Test Performance, Approved Guideline, Second Edition. EP12-A2.
5. Decreto N°20 de 2012 que Aprueba el Reglamento de Laboratorios Clínicos. Subsecretaría de Salud Pública. Ministerio de Salud.
6. Decreto N° 161/1982. Reglamento de Hospitales y Clínicas. Ministerio de Salud.
7. Circular C13 N° 09 de 2013. Precauciones estándares para el control de infecciones en la atención en salud y algunas consideraciones sobre aislamiento de pacientes. Subsecretaría de Redes Asistenciales. Ministerio de Salud.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Procedures for the collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard-Sixth Edition. H3-A6.
9. Mirza Asif Baig and Anil K. Sirasagi. Comparative evaluation of Rosner's index (ICA) versus Chang's (% correction) as a screening test (mixing study). *Journal of Diagnostic Pathology and Oncology*, 2018; 3 (3): 196-201.
10. Cristina Duboscq, José Manuel Ceresetto, Mirta Arias, Ricardo Forastiero. Detección de inhibidor adquirido específico de factor VIII. *Acta Bioquim Clín Latinoam* 2016; 50 (2): 223-32.
11. Claudia Casas Patarroyo, Claudia Agudelo López, Kenny Galvez, Jimmy Lagos Ibarra, Susan Martínez Rojas, Linda Ibata Bernal. Importancia de la orientación diagnóstica en la hemofilia A adquirida. *Rev Med Chile* 2019; 147: 334-341.
12. Chang SH, Tillema V, and Scherr D: A "percent correction" formula for evaluation of mixing studies. *Am J Clin Pathol* 2002; 117: 62-73.
13. Norma Chilena Oficial NCh-ISO 17043-2011. "Evaluación de la conformidad: Requisitos generales para los ensayos de aptitud".
14. Decreto N°6 de 2009 que Aprueba Reglamento sobre Manejo de Residuos de Establecimientos de Atención de Salud- Ministerios de Salud.
15. Guía de Bioseguridad para Laboratorios Clínicos. Instituto de Salud Pública de Chile. Versión 1 (2ª edición)-2019.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Laboratory testing for the Lupus Anticoagulant; Approved Guideline, first Edition. H60-A.
17. El Laboratorio de Hemostasia en pediatría. Volumen 22. Número Extraordinario – XIII Congreso del Grupo CAHT: 2018: 88-92.