

BIBLIOTECA DE PRUEBAS



Laboratorios de Hematología

AGC – Laboratorio de Medicina

Edición 09. Mayo 2024

Editado por:

Angel Bernardo Gutiérrez, Paloma Lequerica Fernández, Asunción Alvarez Rueda
(Hematimetría, Hemostasia y Trombosis)

Enrique Colado Varela (Citometría de Flujo)

Marco Antonio Moro García, Sara Alonso Alvarez, Eva Menendez Alonso
(Citogenética Hematológica)

Ariana Fonseca Mourelle y Tamara Arias Fernández (Eritropatología y Morfología)

Aprobado por:

Angel Bernardo Gutierrez Coordinador de Laboratorios de Hematología y
Responsable de Calidad de los mismos

Rev.	Fecha	Descripción modificaciones
1	04-04-2016	Edición inicial
2	21-12-2016	Corrección de erratas en valores de normalidad de TP ratio, TP (%), TTPA ratio, reticulocitos, del D-Dímero. Se añadan valores de normalidad de concentración máxima y mínima de Dabigatrán dosis de 110 mg cada 12 h Se introduce nueva prueba en el Laboratorio de Respuesta de Trombosis y Hemostasia (Tromboelastometría por rotación-ROTEM)
3	03/05/2018	Actualizados parámetros informables en reticulocitos, actualizados valores de referencia niveles Anti-Xa Rivaroxabán Apixabán y niveles anti-IIaDabigatrán. Se incluye la nueva prueba: Test de generación de trombina.
4	16/09/2019	Actualizados niveles de normalidad de RDW en hemograma básico, hemograma en sangre de cordón y monocitos absolutos en Hemograma básico. Se añade la prueba niveles anti-Xa de Edoxabán Se añade la prueba Determinación y cuantificación de Plasmablastos en sangre periférica. Se actualiza contenido de la prueba Hibridación in situ fluorescente (FISH).
5	13/12/2021	Actualizado el método ROTEM Se añaden las pruebas, Test de Antiagregación Verify –Now, Factor IX cromogenico, Factor VIII comogenicohumano, anticuerpos anti-FP4,ADAMTS 13, Screening de Síndrome Hemofagocítico, Inmunofenotipo para micosis fungoides/Síndrome de Sézary Se corrigen erratas Se actualiza Bibliografía
6	17/04/2023	Corrección de valores de referencia para la determinación de precursores en sangre periférica mediante citometría de flujo Actualización de valores de referencia de tromboelastometría por rotación y Agregación plaquetaria Actualización de Rangos de referencia del D-dimero ajustados por edad Se añade la prueba Unión Factor VIII:FVW Se actualizan los valores de referencia por franjas de edad en las pruebas del Laboratorio de Hemostasia y Trombosis Se añade la prueba de SNP arrays del área de CitogenéticaHematológica
7	21/07/2023	Actualización de los tiempos de Respuesta en el area de Trombosis y Hemostasia
8	01/04/2024	Actualización de los valores de referencia de las pruebas : Hemograma , reticulocitos, VSG, TTPA, TP y fibrinógeno derivado.Se añade la prueba Estudio de secuenciación masiva en neoplasias hematológicas (NGS)
9	07/05/2024	Se ajustan los tiempos de respuesta en la prueba de agregación plaquetaria

Presentación de la Biblioteca de Pruebas de los Laboratorios de Hematología del Hospital Universitario Central de Asturias

Los laboratorios de Hematología han sufrido una gran modernización y ampliación de su cartera de Servicios desde la llegada a las instalaciones del actual Hospital Universitario Central de Asturias en 2014. Situados en la planta N-1 e integrados en el Área de Gestión Clínica del Laboratorio de Medicina.

La actual biblioteca está dividida por las áreas de conocimiento y desarrollo que componen actualmente estos laboratorios, incluyendo todas las determinaciones analíticas que se realizan. La mayor parte de estas áreas son referencia para las determinaciones analíticas hematológicas de toda la Comunidad Autónoma.

La biblioteca de pruebas que se presenta a continuación incluye información útil para los profesionales, tanto en el ámbito de la solicitud como de la interpretación de resultados. Cada prueba presentada en esta biblioteca contiene información relativa a los siguientes aspectos: información y utilidad clínica, descripción del método, requerimientos de paciente y muestra, intervalo de referencia, valores críticos, interpretación de resultados, tiempos de respuesta y bibliografía.

Esta biblioteca constituye un paso más en mejorar la calidad de la asistencia a los pacientes y usuarios, enmarcándose dentro del Sistema de Gestión de Calidad implantando en nuestro Laboratorio. Este sistema se fundamenta en los requisitos de la Norma ISO 15189 *Laboratorios clínicos. Requisitos relativos a la calidad y la competencia* estando acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC).

La finalidad principal de este documento es mejorar la accesibilidad a la información, y la transparencia para todos los usuarios de los Laboratorios de Hematología del HUCA y de la Red de Laboratorios del Servicio de Salud del Principado de Asturias (SESPA).

Índice:

ÁREA DE HEMATIMETRIA:	6
Hemograma	6
Reticulocitos	15
Velocidad de Sedimentación Globular –V.S.G.	18
Frotis de Sangre Periférica	21
ÁREA DE MORFOLOGIAHEMATOLÓGICA Y ERITROPATOLOGÍA	24
Mielograma	24
CITOQUÍMICA: Tinciones Específicas para el diagnóstico de Hemopatías.	26
Hemosiderinuria	32
Tinción de Perls	33
ERITROPATOLOGÍA	35
Dosificación de hemoglobinas.	35
ÁREA DE TROMBOSIS Y HEMOSTASIA	38
Tiempo de protrombina	38
Fibrinógeno derivado	41
Fibrinógeno Clauss	43
Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPA)	46
Tiempo de Trombina	48
Productos de Degradación del Fibrinógeno (PDF)	53
D-Dímero	55
Control de Tratamiento anticoagulante oral por AVK (INR)	58
Niveles anti -Xa HPBM	61
Niveles Anti-XaRivaroxabán, Niveles anti-XaApixabán y Niveles Anti-XaEdoxabán	64
Niveles Anti-IIaDabigatrán.	67
TrombopeniaInducidaporheparina –TIH IgG.	70
Detección de anticuerpos anti-FP4 ELISA.	73
Antitrombina III	75
Proteína C	78
Proteína S	81
Anticoagulante lúpico.	84
Estudio de trombofilia	88
Prueba de Mezclas	94

Dosificación Factores vía extrínseca.....	96
Dosificación Factores vía intrínseca	98
Factor VIII cromogénico bovino y Factor VIII cromogénico Humano.....	101
Factor IX Cromogénico	104
Dosificación de Factor XIII antigénico:	105
Complejo del Factor VIII	107
Union Factor VIII- FVW	111
Estudio de inhibidores específicos e inespecíficos en Hemofilia congénita, adquirida y otras coagulopatías menos frecuentes	113
Coagulación Intravascular Diseminada (C.I.D.)	115
Determinación de los niveles de Plasminógeno.....	126
Determinación de los niveles del Inhibidor de la plasmina:	129
Determinación de los niveles de actividad del ADAMS-13 y de su inhibidor.....	132
Función plaquetaria global.....	136
Agregaciónplaquetaria:	139
Monitorización de los antiagregantes (VerifyNow)	144
Tromboelastometría por Rotación (ROTEM)	147
Test de Generación de Trombina	154
AREA DE CITOGENÉTICA HEMATOLÓGICA	160
Cariotipo	160
Hibridación in situ fluorescente (FISH).....	163
Microarrays de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP arrays).....	167
Estudio de secuenciación masiva en neoplasias hematológicas (NGS)	170
AREA DE CITOMETRÍA DE FLUJO HEMATOLÓGICA	173
Determinación de precursores.....	173
Inmunofenotipo diagnóstico	175
Inmunofenotipo para enfermedad residual.....	179
Test HPN	182
Test Esferocitosis.....	185
Detección de Hemorragia Feto-Materna	187
Estudio de proteínas de membrana plaquetarias.....	189
Detección y cuantificación de plasmablastos en sangre periférica	192
Screening de SíndromeHemofagocítico	194
Inmunofenotipo para micosis fungoides/Síndrome de Sézary	197

ÁREA DE HEMATIMETRIA:

Hemograma

INFORMACIÓN CLÍNICA

El hemograma cuenta y clasifica los diferentes elementos formes de la sangre, y mide la concentración de hemoglobina del plasma una vez lisados los hematíes. La molécula de hemoglobina está compuesta por cuatro grupos hemo unidos a dos pares de cadenas polipeptídicas. Su síntesis está estimulada por la hipoxia tisular. Su función es unirse al oxígeno de los pulmones y liberarlo a los tejidos.

Los diferentes tipos de células son:

-Hematíe o eritrocito. El hematíe maduro es un disco bicóncavo de 7 a 8 micras de diámetro y 1.5-2.5 micras de grosor. Su función principal es el aporte de oxígeno a todo el organismo y su vida media es de 120 días.

El volumen corpuscular medio (VCM) es la media estadística del volumen de los hematíes del paciente. Se expresa en femtolitros (fl) y tiene importancia para clasificar las anemias en microcíticas, normocíticas y macrocíticas. A partir de la hemoglobina, el VCM y el número de hematíes, se calculan otros tres parámetros de la serie roja.

Hematocrito. Es el porcentaje de volumen que ocupan los hematíes en relación a la sangre total. Se calcula multiplicando los hematíes por el VCM.

Hemoglobina corpuscular media (HCM). Es la hemoglobina que contiene un hematíe. Se expresa en picogramos, y se calcula dividiendo la hemoglobina por el número de hematíes.

Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM). Es la concentración de hemoglobina dentro del hematíe. Su valor clasifica los hematíes como hipocrómicos, normocrómicos o hiperocrómicos.

Ancho de distribución de los hematíes (ADE o RDW). Es el coeficiente de variación del volumen de los hematíes. Es la expresión numérica del grado de anisocitosis.

-Leucocitos. Hay cinco tipos de leucocitos en sangre periférica: Neutrófilo segmentado (puede haber hasta un 6% de neutrófilos en banda o cayados), linfocito, monocito, eosinófilo y basófilo. La función principal de los leucocitos consiste en combatir la infección y reaccionar frente a sustancias o tejidos extraños.

-Plaquetas. También llamadas trombocitos, son fragmentos citoplasmáticos provenientes de una célula llamada megacariocito. Los megacariocitos son células de gran tamaño (de 80-150 micras de diámetro) que se encuentran fundamentalmente en la médula ósea, y en menor medida en el bazo y en los pulmones. Intervienen en el proceso de la coagulación de la sangre.

UTILIDAD CLÍNICA

Es una petición muy común en cualquier análisis de sangre. Se usa fundamentalmente para estudiar anemias, procesos infecciosos, trombopenias y enfermedades hematológicas.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

La **hemoglobina** se mide con un método espectrofotométrico a punto final. Así, una parte de la sangre aspirada es diluida con el surfactante aril-sulfato que provocará la lisis de eritrocitos y leucocitos, transformación de la hemoglobina en metahemoglobina sódica de lauril sulfato, compuesto que tiene un pico de máxima absorción a 555 nm (en base a la ley de Lambert-Beer, existe una correlación lineal entre la concentración de hemoglobina y la absorbancia del complejo formado).

Determinación de **hematíes, plaquetas y hematocrito** mediante un enfoque hidrodinámico el flujo de muestra es inyectada dentro de otro flujo de líquido que actúa como embudo, obligando a las células a entrar en la unidad de detección de manera individual, después se produce un análisis por impedancia (resistencia de las células al paso de la corriente eléctrica)

Las **células blancas** se cuentan por el método de citometría de flujo con fluorescencia mediante un sistema de flujo que introduce y restringe a las células para su análisis individual, las obliga a pasar alineadas (flujo laminar), por el sistema óptico responsable de la excitación/dispersión de la muestra y que colecta las señales de luz provenientes de la misma, y que mediante sistema electrónico convierten las señales ópticas en una señal electrónica y la digitaliza dándonos información sobre el tamaño/volumen de la célula y sobre la complejidad celular (nº de gránulos, organelas...).

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de plástico tapón malva

VALORES DE REFERENCIA

Hemograma Básico	
Prueba	Valores de Normalidad
FA Basofilos (Valor absoluto x 103/ μ L)	De 0 a 150 Años (0,02 - 0,10)
FA Eosinofilos (Valor absoluto x 103 / μ L)	De 0 Días a 2 Días (0,10 - 1,00) De 2 Días a 6 Días (0,10 - 2,00) De 6 Días a 13 Días (0,10 - 0,80) De 13 Días a 30 Días (0,10 - 0,90) De 30 Días a 60 Días (0,10 - 1,00) De 3 meses a 11 Años (0,10 - 1,00) De 12 a 150 Años (0,02 - 0,50)
SR Hematocrito (%)	De 0 días a 2 Días (45,0 - 75,0) De 2 días a 6 Días (45,0 - 67,0) De 6 días a 13 Días (42,0 - 66,0) De 13 días a 30 Días (49,0 - 53,0) De 30 días a 60 Días (33,0 - 53,0) De 60 días a 90 Días (28,0 - 42,0) De 3 meses a 6 Meses (30,0 - 40,0) De 6 meses a 24 Meses (30,0 - 38,0) De 2 a 6 Años (34,0 - 40,0) De 7 a 11 Años (35,0 - 45,0) Hombre : De 12 a 17,9 años (37,0 - 49,0) Mujer : De 12 a 150 Años (36,0 - 48,0) Hombre : De 18 a 150 Años (40,0 - 52,0)
SR Hematíes (Valor absoluto x 106 / μ L)	De 0 días a 2 Días (5,00 - 7,00) De 2 días a 6 Días (4,00 - 6,60) De 6 días a 13 Días (3,90 - 6,30) De 13 días a 30 Días (3,60 - 6,20) De 30 días a 60 Días (3,00 - 5,40) De 60 días a 90 Días (3,10 - 4,30) De 3 meses a 6 Meses (4,10 - 5,30) De 6 meses a 24 Meses (3,90 - 5,10) De 2 años a 11 Años (4,00 - 5,20) Mujer: De 12 a 150 Años (3,70-5,50) Hombre: De 18 a 150 Años (4,50 - 6,00) Hombre: De 12 años a 17,9 años(4,30 - 5,50)

SR Hemoglobina (g/Dl)	De 0 días a 2 Días (14,0 - 22,0) De 3 días a 6 Días (15,0 - 21,0) De 6 días a 13 Días (17,1 - 17,9) De 14 días a 30 Días (16,1 - 16,9) De 30 días a 60 Días (11,5 - 16,5) De 60 días a 90 Días (9,4 - 13,0) De 3 meses a 6 Años (11,1 - 14,1) De 7 años a 11 Años (11,5 - 15,5) De 12 años a 215 meses (13,0 - 16,5) Mujer: De 12 a 150 Años (12,0 - 16,0) Hombre: De 18 a 150 Años (13,0 - 18,0)
SB Leucocitos (Valor absoluto x 103 / μ L)	De 0 días a 2 Días (10,00 - 26,00) De 3 días a 6 Días (7,00 - 23,00) De 6 días a 30 Días (6,00 - 22,00) De 31 días a 60 Días (5,00 - 19,00) De 61 días a 90 Días (5,00 - 15,00) De 91 días a 6 Meses (6,00 - 18,00) De 182 días a 2 Años (6,00 - 16,00) De 3 años a 6 Años (5,00 - 10,00) De 7 a 12 Años (5,00 - 13,00) De 13 a 150 Años (4,00 - 10,00)
FA Linfocitos (Valor absoluto x 103/ μ L)	De 0 días a 2 Días (3,00 - 8,00) De 2 días a 6 Días (2,00 - 8,00) De 6 días a 30 Días (3,00 - 9,00) De 30 días a 60 Días (3,00 - 16,00) De 60 días a 90 Días (4,00 - 10,00) De 3 meses a 6 Meses (4,00 - 12,00) De 6 meses a 24 Meses (3,50 - 11,00) De 2 años a 6 Años (1,80 - 8,40) De 7 a 11 Años (1,00 - 5,00) De 12 a 150 Años (1,00 - 5,00)
SR Hemoglobina Corpuscular Media (pg)	De 0 días a 30 Días (31 - 37) De 30 días a 60 Días (30 - 36) De 60 días a 90 Días (27 - 33) De 3 meses a 6 Meses (24 - 30) De 6 meses a 24 Meses (25 - 29) De 24 meses a 6 Años (24 - 30) De 7 a 11 Años (25 - 33) De 12 a 120 Años (26 - 34)

Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media(g/dL)	De 0 días a 2 Días (30,0 - 36,0) De 2 días a 6 Días (29,0 - 37,0) De 6 días a 30 Días (28,0 - 38,0) De 30 días a 60 Días (29,0 - 37,0) De 60 días a 90 Días (28,5 - 35,5) De 3 meses a 6 Meses (30,0 - 36,0) De 6 meses a 24 Meses (32,0 - 36,0) De 25 meses a 11 Meses (31,0 - 37,0) De 12 a 150 Años (31,5 - 34,5)
FA Monocitos (Valor absoluto x 103 / μ L)	De 0 días a 2 Días (0,50 - 2,00) De 2 días a 6 Días (0,50 - 1,00) De 6 días a 30 Días (0,10 - 1,70) De 30 días a 60 Días (0,30 - 1,00) De 60 días a 90 Días (0,40 - 1,20) De 3 meses a 12 Meses (0,20 - 1,20) De 1 a 150 Años (0,20 - 1,00)
FA Neutrofilos (Valor absoluto x 103 / μ L)	De 0 días a 2 Días (4,00 - 14,00) De 2 días a 6 Días (3,00 - 5,00) De 6 días a 13 Días (3,00 - 6,00) De 13 días a 30 Días (3,00 - 9,00) De 30 días a 90 Días (1,00 - 5,00) De 3 meses a 6 Meses (1,00 - 6,00) De 6 meses a 24 Meses (1,00 - 7,00) De 2 a 6 Años (1,50 - 8,00) De 7 a 11 Años (2,00 - 8,00) De 12 a 150 Años (2,00 - 7,00)
SP Plaquetas((Valor absoluto x 103 / μ L)	De 0 a 150 Años (130 - 400)
SR Volumen Corpuscular Medio(fL)	De 0 días a 2 Días (100 - 120) De 2 días a 6 Días (93 - 118) De 6 días a 13 Días (88 - 126) De 13 días a 30 Días (86 - 124) De 30 días a 60 Días (92 - 116) De 60 días a 90 Días (87 - 103) De 3 meses a 6 Meses (68 - 84) De 6 meses a 24 Meses (72 - 84) De 2 a 6 Años (75 - 87) De 7 a 11 Años (77 - 95) De 12 a 215 Meses (78 - 98) De 18 a 150 Años (80 - 100)
SP Volumen Plaquetar Medio (fL)	De 0 a 150 Años (7,6 - 16)

SR R.D.W. Coeficiente de Variación(%)	De 0 a 150 Años (11,6 - 15)
Granulocitos Inmaduros (Valor absoluto x 103 / μ L)	De 0 a 150 Años (0 - 0,40)
Granulocitos Inmaduros %	De 0 a 150 Años (0 - 5)
FA Neutrofilos %	De 0 a 150 Años (40 - 85%)
FA Linfocitos %	De 0 a 150 Años (18 - 45%)
FA Monocitos %	De 0 a 150 Años (2 - 12%)
FA Eosinofilos %	De 0 a 150 Años (0,3- 6%)
FA Basofilos %	De 0 a 150 Años (0,1 - 3%)
FA Eritroblastos (Valor absoluto x 103 / μ L)	De 0 a 150 Años (0,0 - 0,5%)
Esquistocitos	<2/1000 hematies
Fraccion inmadura de Plaquetas (%)	0-7

VALORES CRÍTICOS

Hematocrito < 19% o > 65%

Hemoglobina < 6,0 g/dL o > 21,0 g/dL

Plaquetas < 30 x 103 / μ L o $\geq$ 1000 x 103 / μ L

Recuento de eritroblastos $\geq$ 5 x 103 / μ L

Recuento de leucocitos < 1 x 103 o $\geq$ 60 x 103 / μ L

Recuento de neutrófilos < 0.5 x 103 / μ L o $\geq$ 50 x103 / μ L

Recuento de linfocitos < 0.2 x 103 μ L o $\geq$ 15 x 10 3/ μ L

Recuento de monocitos $\geq$ 8 x 103 / μ L

Alarma de presencia de Blastos

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Hematimetría Laboratorio de Respuesta Rápida: 45 min

Área de Hematimetría Laboratorio Core: Un día laborable.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

ANEMIA

Se define por la concentración de hemoglobina, que debe ser menor a la establecida como normal para la edad y sexo del paciente. El hematocrito es un parámetro calculado por los equipos automatizados por lo que no se utiliza en la definición de anemia. El recuento eritrocitario no se correlaciona con la cantidad de hemoglobina, pues depende del tamaño eritrocitario.

Anemia Microcítica

Hallazgo de anemia con presencia de eritrocitos de tamaño inferior a lo normal (VCM disminuido), generalmente asociada a hipocromía (HCM, CHCM disminuidas). La causa más frecuente en nuestro medio de anemia microcítica hipocrómica es la ferropenia, cuya confirmación la entregará la historia clínica del paciente y el estudio de Fe (cinética de Fe y ferritina).

La presencia de un rasgo talasémico (Talasemia menor) también se presenta habitualmente en el hemograma como anemia microcítica hipocrómica, en este caso el VCM es habitualmente cercano a 60fl y los hallazgos morfológicos en la observación del frotis sanguíneo al microscopio orientan al diagnóstico: se pueden apreciar diferentes formas de eritrocitos con células en diana o targets cells y presencia de punteado basófilo grueso. Los reticulocitos están elevados por hemólisis, visualizándose al frotis como policromatofilia. El diagnóstico de certeza de esta condición se realiza por electroforesis de hemoglobina.

La razón %microcitosis %hipocromía, donde un ratio $> 0.9\%$ sugiere Talasemia.

La presencia de anemia microcítica (con frecuencia hipocroma), puede verse también en las etapas más avanzadas de las denominadas enfermedades inflamatorias crónicas, en las cuales el hierro se distribuye en forma anómala por citocinas propias de estos procesos (TNF alfa, interleucinas), siendo desplazado al sistema mononuclear fagocítico en lugar de ser utilizado en la hematopoyesis.

Anemia Macrocítica

Hallazgo de hemoglobina bajo el rango normal con presencia de eritrocitos de tamaño mayor a lo normal (VCM elevado). Con mayor frecuencia es provocada por déficits en vitamina B12 o ácido fólico que son esenciales para la síntesis de DNA y reproducción celular, afectando a los eritrocitos, pero también a las otras poblaciones celulares. Los síndromes mielodisplásicos suelen presentarse con anemia macrocítica porque generan eritropoyesis ineficaz, anemia que está acompañada generalmente de citopenias y alteraciones morfológicas en las otras series.

Otras causas de anemia macrocítica son las anemias secundarias a hepatopatías crónicas, pacientes gastrectomizados, tratamientos con fármacos que afectan el metabolismo del ácido fólico y anemias regenerativas como es el caso de anemias hemolíticas que presentan aumento de glóbulos rojos jóvenes (reticulocitos) que tienen un volumen más alto que los eritrocitos maduros.

Anemia Normocítica Normocrómica

Se observa disminución de la hemoglobina y hematocrito, sin alteración de los índices eritrocitarios. Puede originarse por diversas causas, algunas hematológicas como hipoplasia y aplasia medular, o etapas iniciales de anemia por sangrado (previo a la producción de ferropenia) y también causas no hematológicas como la anemia de insuficiencia renal crónica por déficit de eritropoyetina. La anemia secundaria a cuadros inflamatorios crónicos en sus etapas iniciales también puede presentarse con normocitosis y normocromía.

Neutrofilia

Aumento en el recuento absoluto de neutrófilos (neutrófilos $>8.000/\text{ml}$), se observa con mayor frecuencia en procesos infecciosos bacterianos, puede acompañarse de aumento en la sangre periférica de formas menos maduras de leucocitos, como baciliformes y mielocitos, hallazgo más conocido como desviación a izquierda, si la cifra de leucocitos es más elevada y se observan células inmaduras en el frotis se denomina reacción leucemoide.

Se puede observar neutrofilia en cuadros inflamatorios no infecciosos como collagenopatías, en condiciones de estrés, ejercicio intenso, hipoxia y asociada al uso de algunos medicamentos como corticoides, adrenalina, entre otros.

La neutrofilia propia de patologías hematológicas como Síndromes Mieloproliferativos crónicos se acompaña de alteración en los recuentos de las otras series celulares y características morfológicas especiales.

Neutropenia: Disminución en el recuento absoluto de neutrófilos (RAN $<1.500/\text{ml}$), la causa más frecuente es la inducida por fármacos, de una lista muy extensa cabe destacar quimioterápicos, antiinflamatorios no esteroideos, antiepilépticos, psicofármacos. En algunas infecciones virales como hepatitis, influenza, HIV y también en sepsis graves se pueden observar neutropenias severas. El parámetro RAN (recuento absoluto de neutrófilos), ha sido incorporado de rutina en el hemograma, permitiendo visualizar de inmediato la condición de neutropenia. Se considera neutropenia severa un RAN $< 500 \times \text{mm}^3$.

Otras alteraciones en la fórmula diferencial de los leucocitos

Eosinofilia: Aumento en el recuento absoluto de eosinófilos, (eosinófilos $>800/\text{ml}$). Alergias, parasitosis y algunos fármacos son sus causas más frecuentes.

Linfocitosis: Aumento en el recuento absoluto de linfocitos, (linfocitos $>4000/\text{ml}$). Con mayor frecuencia es producida por infecciones virales.

Monocitosis: Aumento en el recuento absoluto de monocitos, (monocitos $>1200/\text{ml}$). Es característica en el período de recuperación de neutropenias y en convalecencia de cuadros infecciosos.

También está indicado el estudio por CMF en el manejo de las monocitosis y linfocitosis persistentes según procedimiento de trabajo normalizado en nuestros Laboratorios

Plaquetas

Trombocitopenia: Es la disminución del recuento plaquetario bajo el rango de referencia establecido por el laboratorio (recuento plaquetario $<100 \times 10^9/\text{l}$).

Puede ser originada por diversos mecanismos:

Immunológico: por presencia de anticuerpos, como es el caso del Púrpura Trombocitopénico Inmune, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Evans, síndrome antifosfolípido y trombopenia isoimmune neonatal, entre otras patologías.

Trombopoyesis ineficaz: se observa en la anemia perniciosa, mieloptisis, mielodisplasias, hemoglobinuria paroxística nocturna, radiación, drogas antineoplásicas, entre otros.

Destrucción no inmune, sobreconsumo: se observa en sepsis, CID, hemangioma cavernoso, infección por HIV.

Distribución anormal o secuestro: en hiperesplenismos de cualquier origen.

Pseudotrombocitopenia

El hallazgo de un recuento bajo de plaquetas, no sospechado e inesperado para el cuadro clínico del paciente, puede corresponder a una pseudotrombocitopenia. Algunos ejemplos de esta condición son: las punciones venosas difíciles (en niños pequeños, ancianos) que pueden originar activación plaquetaria con formación de microcoágulos, la agitación insuficiente del tubo para mezclar la muestra de sangre con el anticoagulante es otra causa de micro coágulos. También produce un recuento falsamente disminuido el efecto de agregación plaquetaria «*in vitro*» provocado por el anticoagulante EDTA, mediante activación de anticuerpos antifosfolípidos. Este efecto se reconoce fácilmente por la observación de las plaquetas agregadas al frotis y el laboratorio sugiere en estos casos análisis de una nueva muestra obtenida con otro anticoagulante como citrato.

Trombocitosis

Corresponde a recuento de plaquetas mayor al rango de referencia establecido por el laboratorio (recuento plaquetario $>400 \times 10^9/l$), se puede observar en diferentes patologías como: cuadros inflamatorios crónicos, recuperación de procesos infecciosos, hemorragia aguda, déficit de fierro, post esplenectomía, entre otros.

Trombocitosis con aumento de cifras de forma progresiva y sostenida en el recuento plaquetario se asocia a síndromes mieloproliferativos crónicos: leucemia mieloide crónica, policitemia vera, mielofibrosis y especialmente a trombocitosis esencial.

BIBLIOGRAFÍA

Clinical and Laboratory Standards Institute and International Council for Standardization in Haematology. Methods for the reticulocyte counting (automated blood cell counters, flow cytometry and supravital dyes): Approved Guideline. 2.ª ed. Document H44-A2. Vol. 24(8). Wayne PA: CLSI; 2004.

International Council for Standardization in Haematology. Proposed reference method for reticulocyte counting based on the determination of the reticulocyte to red cell ratio. Clin Lab Haematol 1998; 20:77-9

ICSH Expert Panel on Cytometry. Reference method for the enumeration of erythrocytes and leukocytes. Clin Lab Haemat 1994; 16:131-8.

International Committee for Standardization in Haematology. The assignment of values to fresh blood used for calibrating automated blood cell counters. Prepared by the ICSH Expert panel on Cytometry. Clin Lab Haematol 1988; 10:203.

International Council for Standardization in Haematology Expert Panel on Cytometry and International Society of Laboratory Hematology Task Force on Platelet Counting-American Journal of Clinical Pathology 2001; 115:460-4.

Reticulocitos

INFORMACION CLINICA

Los reticulocitos son eritrocitos no nucleados inmaduros que contienen ácido ribonucleico (RNA) y que continúan sintetizando hemoglobina después de la pérdida del núcleo. Se forman a partir del eritroblasto ortocromático cuando éste pierde el núcleo. El reticulocito va perdiendo retículo gránulo-filamentoso hasta convertirse en hematíe maduro desprovisto del mismo. El reticulocito permanece uno o dos días en la médula ósea y pasa posteriormente a sangre periférica donde persiste unas 24 horas hasta que finaliza su maduración.

UTILIDAD CLÍNICA

El recuento del número de reticulocitos en sangre periférica es un dato muy útil para establecer la efectividad global de la eritropoyesis y para determinar el origen central o periférico de una anemia, así como para valorar el carácter regenerativo o arregenerativo de una anemia.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Una porción de la sangre del paciente se mezcla con un reactivo que tiñe el RNA y se valora la dispersión de un rayo de luz láser previa eliminación de la hemoglobina para que no interfiera en los resultados.

Diferenciación de diferentes fracciones de reticulocitos (IRF, LFR, MFR, HFR) que reflejan distintos estados de madurez.

Información sobre calidad de eritrocitos recién formados (grado de hemoglobinización, RET-He).

Estado ferrocinética de los reticulocitos respecto a los hematíes maduros Delta He(pg).

Información sobre el tamaño de los reticulocitos en formación; Hematíes Microcíticos (%) y Macrocíticos (%)

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No precisa

REQUISITOS DE LA MUESTRA.

Sangre con anticoagulante (EDTA). (Contenedor): tubo de plástico tapón malva.

VALORES DE REFERENCIA

Prueba	Valores de Normalidad
RE Reticulocitos #(C)	De 0 a 150 Años (30 - 80)
RE Reticulocitos %	De 0 a 150 Años (0,5 - 2)
RE Reticulocitos equivalentes en Hemoglobina (pg)	De 0 a 150 Años (28 - 35)
Delta He(pg)	De o a 150 años (1,7-4,4)
RE Fracción inmadura de Reticulocitos (%)	De 0 a 150 años: Hombres: 2,10 - 13,80 Mujeres : 2,40 - 17,50
HematiesHipocromos (%)	De 0 a 150 años: Hombres: 0,1 - 0,5 Mujeres : 0,1 - 1,1
Hematíes Hiperocrómicos(%)	Hombre de 0-40 años (0,41 - 0,80) Hombre de 40 a 60 Años (0,50 - 0,80) Hombre de 61 a 150 Años (0,43 - 0,87) Mujer de 0-40 años (0,07 - 0,70) Mujer de 40 a 60 Años (0,20 - 0,70) Mujer de 61 a 150 Años (0,40 - 0,70)
Hematíes Microcíticos(%)	De 0-40 años (0,14 – 5.79) De 41 a 60 Años (0,10 – 6.81) De 61 a 150 Años (0.20 - 1,87)
Hematíes Macrociticos (%)	Hombre de 0-40 años (3,30 - 5,56) Hombre de 41 a 60 Años (3,63 - 7,83) Hombre de 61 a 150 Años (0,43 - 0,87) Mujer de 0-40 años (1,31 - 8,48) Mujer de 41 a 60 Años (3,20 - 8,02) Mujer de 61 a 150 Años (3,20 - 6,67)

VALORES CRÍTICOS

No aplica.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Niveles aumentados: anemias hemolíticas, buena respuesta al tratamiento de una anemia carencial.

Niveles disminuidos: déficit de hierro, déficit de vitamina B12 o folato, anemia aplásica

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Hematimetría Laboratorio de Respuesta Rápida: 45 minutos.

Área de Hematimetría Core: Un día laborable.

BIBLIOGRAFÍA

Clinical and Laboratory Standards Institute and International Council for Standardization in Haematology. Methods for the reticulocyte counting (automated blood cell counters, flow cytometry and supravital dyes): Approved Guideline. 2.^a ed. Document H44-A2. Vol. 24(8). Wayne PA: CLSI; 2004.

International Council for Standardization in Haematology. Proposed reference method for reticulocyte counting based on the determination of the reticulocyte to red cell ratio. Clin Lab Haematol 1998; 20:77-9

ICSH Expert Panel on Cytometry. Reference method for the enumeration of erythrocytes and leukocytes. Clin Lab Haemat 1994; 16:131-8.

International Committee for Standardization in Haematology. The assignment of values to fresh blood used for calibrating automated blood cell counters. Prepared by the ICSH Expert panel on Cytometry. Clin Lab Haematol 1988; 10:203.

International Council for Standardization in Haematology Expert Panel on Cytometry and International Society of Laboratory Hematology Task Force on Platelet Counting-American Journal of Clinical Pathology 2001; 115:460-4.

National Institute of Health. Centre for Disease Control. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories; 1984.

Park SH, Park C-J, Lee B-R, et al. Establishment of Age- and Gender-Specific Reference Ranges for 36 Routine and 57 Cell Population Data Items in a New Automated Blood Cell Analyzer, Sysmex XN-2000. *Annals of Laboratory Medicine*. 2016;36(3):244-249. doi:10.3343/alm.2016.36.3.244.

Velocidad de Sedimentación Globular –V.S.G.

INFORMACIÓN CLÍNICA

Al dejar reposar verticalmente la sangre con anticoagulante en un tubo o en una pipeta especial, se observa cómo los eritrocitos sedimentan espontáneamente, de manera que por encima de ellos se forma una columna de plasma. Este proceso se denomina eritrosedimentación (ES) y la rapidez con que se realiza, velocidad de sedimentación globular (VSG). La ES es un fenómeno empírico que se altera en muchas situaciones sin que pueda ser atribuido a una causa concreta, por lo que es considerada una alteración inespecífica, pero que alerta sobre la posible existencia de un trastorno orgánico o enfermedad subyacente. De hecho, el fenómeno de la eritrosedimentación constituye un indicador de la presencia de reactantes de fase aguda y, por ello, su aumento se correlaciona con el de ciertas citocinas (p. ej., las interleucinas 1 y 6 [IL-1 e IL-6]) y la proteína C reactiva.

El fenómeno de la ES obedece a varios factores, entre los que destacan las interacciones electrostáticas que existen entre los eritrocitos debido a su carga de superficie. En estas últimas intervienen de forma determinante las proteínas del plasma, de manera que mientras algunas las favorecen (fibrinógeno y globulinas), otras las disminuyen (albúmina). El mecanismo que rige este fenómeno depende, a su vez, de cuatro factores relacionados entre sí mediante la ley de Stokes.

- Tamaño y rigidez de los eritrocitos (VCM).
- Diferencia de densidad entre los eritrocitos y el plasma.
- Viscosidad del plasma.
- Temperatura.

UTILIDAD CLÍNICA

El aumento de VSG en la práctica clínica puede obedecer a alteraciones del VCM con o sin aumento de la rigidez eritrocitaria, disminuciones de la concentración de hemoglobina (anemia) o a alteraciones de las proteínas del plasma (fibrinógeno, albúmina y globulinas).

Los procesos inflamatorios crónicos (artritis reumatoide, polimialgia reumática y tuberculosis) y ciertas neoplasias (linfomas y gammopatías monoclonales), al alterar la relación albúmina/globulinas, constituyen la causa más frecuente de aumento de VSG.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Es un método de Fotometría Cinética. Se mide la cadencia en la formación de las pilas de monedas de hematíes y su tamaño en la fase de agregación. Durante 20 segundos se realizan 1.000 mediciones (50 medidas por segundo) de la densidad óptica de la muestra en un sistema capilar.

REQUISITOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de plástico tapón malva)

VALORES DE REFERENCIA

De 0 a 15 mm/h en varones adultos.

De 0 a 20 mm/h en mujeres adultas

De 0 a 10 mm/h en niños desde los 2 días hasta los 14 años

De 0 a 2 mm/h en niños desde el nacimiento hasta los 2 días (no incluidos)

VALORES CRÍTICOS

No aplica

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Hematimetría Core: 1 día Laborable.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Causan aumento

Fisiológicas: Embarazo (a partir del tercer mes), Envejecimiento (ocasional), Crecimiento (ocasional)

Patológicas: Anemia intensa, fiebre reumática, Artritis reumatoide, Lupus eritematoso diseminado, enfermedad renal, enfermedad tiroidea, Infarto de miocardio, neoplasias, tuberculosis, sífilis, arteritis de la temporal (células gigantes), poli mialgia reumática

(enfermedad de Hartón), vasculitis necrosante hiperfibrinogenemia,Macroglobulinemia de Waldenström, Mieloma múltiple y enfermedad de las crioaglutininas.

Causan disminución

Policitemia vera, insuficiencia cardíaca congestiva, síndrome de hiperviscosidad hipofibrinogenemia, hipoproteinemia y anemia de células Falciforme.

BIBLIOGRAFÍA:

Berga LI, Vives Corrons JL, Feliu E, Woessner S, Rozman C. Hemorreología. Bases teóricas y aplicacionesclínicas. Barcelona: Salvat; 1983.

International Committee for Standardization in Haematology. Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. Clin HemorheolMicrocirc 1986; 6:439-53.

International Committee for Standardization in Haematology. Guidelines on selection of laboratory tests for monitoring the acute phase response. J Clin Pathol 1988; 41:1203-12.

International Committee for Standardization in Haematology. Recommendation for a selected method for the measurement of plasma viscosity. J Clin Pathol 1984; 37:1147-52.

International Committee for Standardization in Haematology. Recommended method for Radioisotope Red-Cell Survival Studies. Br J Haematol 1980; 45:659-66.

International Committee for Standardization in Haematology. Recommended methods for measurement of red-cell and plasma volume. J Nucl Med 1980; 21:793-800.

International Committee for Standardization in Haematology. Recommended Methods for Surface Counting to Determine Sites of Red-Cell Destruction. Br J Haematol 1975; 30:249-54.

International Council for Standardization in Haematology. ICSH Expert Panel on Blood Rheology. ICSH recommendations for measurement of erythrocyte sedimentation rate. J Clin Pathol 1993; 46:198-203.

Jou JM, Lewis SM, Briggs C, Lee SH, De la Salle B, McFadden S. Review of the measurement of the erythrocyte sedimentation rate. Int J Haemat Lab 2011; 33:125-32.

NCCLS. Reference and selected procedure for the erythrocyte sedimentation rate (ESR) test; approved standard-Fourth Edition. Vol. 20. N.º 27; 2001.

Frotis de Sangre Periférica

INFORMACIÓN CLÍNICA

La práctica de una extensión sanguínea es fundamental en Hematología, ya que muchas patologías de la sangre y sistémicas se pueden diagnosticar y controlar su evolución con solo la observación de la morfología de los elementos formes de la sangre. Así mismo puede ser de utilidad en la observación de procesos infecciosos por parásitos sobre todos aquellos intraeritrocitarios como en el caso de la Malaria, leishmaniasis y la Filariasis.

UTILIDAD CLÍNICA

Estudio de mielopatías proliferativas tanto linfoides como mieloides, incluyendo, pero no limitado a:

Leucemias agudas

Neoplasias mielodisplásicas

Linfoma No Hodgkin/Hodgkin y síndromes linfoproliferativos

Mieloma múltiple y discrasias de células plasmáticas.

Aplasia medular y HPN

Estudio de patología de serie eritroide:

Anemias por déficit carenciales (Ferropenia, megaloblástica...)

Hemoglobinopatías y talasemias.

Membranopatías eritrocitarias y eritroenzimopatías.

Poliglobulias primarias (Mieloproliferativas)

Poliglobulias secundarias (EPOC, altura, Tabaquismo...)

Estudio de patología de la serie plaquetar:

Trombopenias y trombopatías

Trombocitosis

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

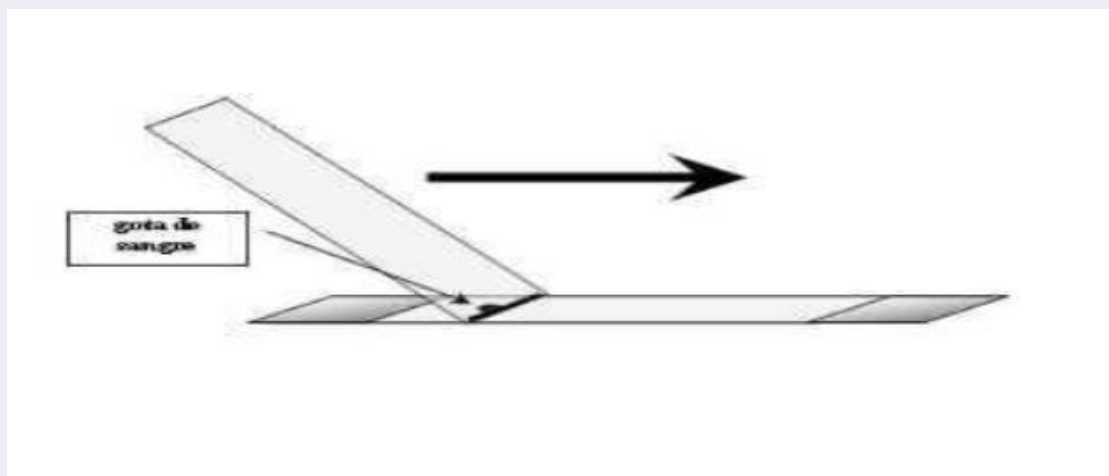
Tras la realización de la extracción sanguínea en un tubo con EDTA, se puede realizar por método manual o automatizado, los pasos de realización de un frotis son los que se describen a continuación:

1. Con la lanceta estéril realizar una punción en un pulgar o utilizar una gota de sangre del tubo de hemograma. (Idealmente sin mezcla de anticoagulante)

2. Depositar una gota de sangre en la parte central de un portaobjetos muy limpio (libre de pelusas y grasa).

3. Con un cubreobjetos (tomarlo lateralmente entre las yemas de los dedos) deslizarlo sobre toda la superficie del porta de manera que se pueda obtener una fina película de sangre. El inicio del frotis se denomina cabeza y la parte final del frotis se denomina cola

4. Esperar a que se seque la lámina, dejarla sobre una rejilla o toalla de papel, con la zona donde está la muestra mirando hacia arriba.



REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No precisa

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Extensiones de sangre periférica sobre portaobjetos esmerilado.

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

Informe de resultados interpretativo.

VALORES CRÍTICOS

No aplica

BIBLIOGRAFÍA

International Committee for Standardization in Haematology. Guidelines for blood cell analyzers evaluation including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. ICSH Expert Panel on Cytometry. Clin Lab Haematol 1994; 16:157-74.

International Council for Standardization in Haematology (ICSH). ICSH reference method for staining of blood and bone marrow by azure B and eosin Y (Romanowsky stain). Br J Haematol 1984; 57:707-10.

International Council for Standardization in Hematology (ICSH). Recommendations of the ICSH for EDTA anticoagulation of blood for blood cell counting and sizing. Amer J Clin Pathol 1993; 100:371.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference leucocyte differential count (proportional) and evaluation of instrument method; Approved Standard. NCCLS Document H20-A, 1992.

NCCLS. Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods. Villanova PA: NCCLS; 1992. Approved standard document H20-A.

Roussel M, et al. Toward a reference method for leukocyte differential counts in blood: Comparison of three flow cytometric candidate methods on behalf of the International Council for Standardization in Hematology (ICSH). Cytometry 2012; DOI 10.1002/Cyt.a.22092.

Vives Corrons JL, Albarede S, Flandrin G, Héller S, Horvath K, Houwen B, et al. Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: Control material. Clin ChemLabMed 2004; 42:922-6

ÁREA DE MORFOLOGIAHEMATOLÓGICA Y ERITROPATOLOGÍA

Mielograma

INFORMACIÓN CLÍNICA

El estudio citológico medular es una técnica sencilla y eficaz que permite una gran información en el diagnóstico y seguimiento de diversas enfermedades hematológicas.

UTILIDAD CLÍNICA

Estudio de mielopatías proliferativas tanto linfoides como mieloides, incluyendo, pero no limitado a:

Leucemias agudas

Neoplasias mielodisplásicas

Linfoma No Hodgkin y síndromes linfoproliferativos

Mieloma múltiple y discrasias de células plasmáticas

Estudio de la repercusión de enfermedades extrahemopoyéticas sobre la hematopoyesis

Estudio de la toxicidad hemopoyética de diversos medicamentos, tóxicos industriales o radiaciones

Estudio del patrón de hierro medular

Búsqueda de parásitos, gérmenes, células neoplásicas o tesarismóticas

Estudio de la fiebre de origen desconocido.

Estudio de presencia de metástasis óseas en médula ósea de tumores extrahematológicos.

La punción medular tiene escasas contraindicaciones, siendo una coagulopatía grave y no controlada la única contraindicación absoluta.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Se realiza una punción en el esternón a la altura de la línea media en el segundo espacio intercostal o en la cresta ilíaca anterior o posterior. En lactantes se aconseja la cresta tibial anterior o la cresta ilíaca posterior. En función de los hallazgos citológicos o la sospecha diagnóstica se debe de acompañar el estudio de técnicas citoquímicas como la tinción de hierro, mieloperoxidasa, esterasas u otras.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No precisa

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Extensiones de médula ósea

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

Informe de resultados interpretativo, describiendo los hallazgos morfológicos encontrados.

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación del resultado corre a cargo de los médicos del laboratorio de Morfología del Servicio de Hematología. Se realizará un informe de las células observadas en un recuento, expresándolo como porcentaje y se realizará un informe interpretativo de la exploración.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Morfología Hematológica: tres días laborable desde la recepción de la muestra en el laboratorio. Puede ser necesario aumentar este periodo en casos especialmente complicados o que requieran técnicas adicionales.

BIBLIOGRAFÍA

International Committee for Standardization in Haematology. Guidelines for blood cell analyzers evaluation including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications. ICSH Expert Panel on Cytometry. Clin Lab Haematol1994; 16:157-74.

International Council for Standardization in Haematology (ICSH). ICSH reference method for staining of blood and bone marrow by azure B and eosin Y (Romanowsky stain). Br J Haematol1984; 57:707-10.

International Council for Standardization in Hematology (ICSH). Recommendations of the ICSH for EDTA anticoagulation of blood for blood cell counting and sizing. Amer J Clin Pathol1993; 100:371.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference leucocyte differential count (proportional) and evaluation of instrument method; Approved Standard. NCCLS Document H20-A, 1992.

NCCLS. Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods. Villanova PA: NCCLS; 1992. Approved standard document H20-A.

Roussel M, et al. Toward a reference method for leukocyte differential counts in blood: Comparison of three flow cytometric candidate methods on behalf of the International Council for Standardization in Hematology (ICSH). Cytometry 2012; DOI 10.1002/Cyt.a.22092.

Vives Corrons JL, Albareda S, Flandrin G, Héller S, Horvath K, Houwen B, et al. Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: Control material. Clin ChemLabMed2004; 42:922

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, FoncubertaJ, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4 ª Edición.2015

CITOQUÍMICA: Tinciones Específicas para el diagnóstico de Hemopatías

INFORMACIÓN CLÍNICA:

La citoquímica estudia la composición química de la célula y permite detectar la localización topográfica de algunos principios inmediatos, enzimas, metales pesados y otras sustancias. Se considera como un nexo de unión entre la morfología y la bioquímica.

Las técnicas citoquímicas son un complemento de las tinciones hematológicas, y por medio de ellas se localizan enzimas y sustancias inorgánicas., mejorando así la diferenciación celular y en algunos casos también sirven para el diagnóstico de ciertas leucemias.

Los componentes celulares que son posibles revelar con el estudio citoquímico son:

Enzimas (oxidantes e hidrolíticas)

Glucógeno

Lípidos

Entre las enzimas oxidantes se encuentra la peroxidasa leucocitaria. Entre la enzimas hidrolíticas (hidrolasas) se encuentran entre otras las fosfatasas ácidas, fosfatasas alcalinas, esterases específicas y no específicas

TIPOS DE TINCIÓN Y UTILIDAD DE LAS MISMAS:

PAS

La reacción de PAS o del ácido peryódico de Schiff se basa en la rotura de los enlaces -C-C- presentes en los carbohidratos por la acción del ácido peryódico, potente agente oxidante, liberándose grupos aldehído que al combinarse con el reactivo de Schiff dan un compuesto de color rojo púrpura intenso. Identifica al glucógeno en el citoplasma celular.

La reacción del PAS ha perdido utilidad en el diagnóstico hematológico después de la aparición de mejores marcadores. Sigue teniendo interés en la diferenciación de diferentes tipos de leucemias linfoblásticas, en la eritroleucemia y en diversas mielodisplasias.

PEROXIDASA

La demostración citoquímica de esta enzima se basa en la acción oxidante de la peroxidasa sobre el sustrato, bencidina, en presencia de peróxido de hidrógeno, apareciendo un precipitado amarillo ocre en el lugar del citoplasma en donde se ha producido la reacción.

La mieloperoxidasa se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso, de donde pasa a las cisternas del aparato de Golgi quedando localizada fundamentalmente en la granulación 1ª o azurófila. Se localiza, sobre todo, en los gránulos primarios de los neutrófilos y precursores, así como en los gránulos de los eosinófilos y monocitos.

Dicha enzima se combina in vivo con peróxido de hidrógeno transformándose en un potente agente bactericida, viricida y fungicida.

La aplicación fundamental de la mieloperoxidasa se refiere a la capacidad discriminadora entre celularidad blástica mieloide y linfoide, ya que los mieloblastos muy precoces sin estigmas de diferenciación mieloide ya pueden ser mieloperoxidasa positivos.

Un déficit de mieloperoxidasa en los PMN maduros, excepto en el caso de que se trate de una deficiencia congénita, debe interpretarse como un signo disgranulopoyético.

FOSFATASA ALCALINA

La fosfatasa alcalina es una hidrolasa perteneciente al grupo de las fosfomonoesterasas; hidroliza monoésteres del ácido fosfórico, actuando a un pH de 9,1 a 9,6; ligeros cambios de pH determinan una rápida inactivación de la enzima. La demostración citoquímica se basa en la hidrólisis de ciertos sustratos, de los cuales se liberan unos productos intermedios que combinados con una sal diazoica dan un precipitado coloreado.

La actividad de la FA granulocítica se manifiesta en forma de un precipitado pardo negro localizado en el citoplasma. Se encuentra actividad FA en algunas células maduras y semimaduras de la granulopoyesis neutrófila (bandas y segmentados).

No todos los granulocitos presentan el mismo grado de positividad; en función de este dato se establece un índice de actividad de FA. Se pueden distinguir tres tipos de reacción:

- grado 0: sin actividad enzimática.
- grado I: con cierta actividad enzimática en forma granular única o actividad débil difusa en una parte del citoplasma, especialmente en la zona perinuclear.
- grado II: intensa actividad granular o actividad difusa distribuida por todo el citoplasma granulocítico.

Se realiza un recuento sobre 100 granulocitos asignando a cada uno un grado; y a cada grado se la asocia un valor: grado 0=0, grado I=1, grado II=2. Se suman los valores y el número obtenido es el índice de FAG, que tiene un valor mínimo de 0 y máximo de 200. El índice normal oscila entre 20 y 40.

Su máximo interés se centra en el estudio de los síndromes mieloproliferativos, sobre todo para corroborar el diagnóstico de LMC para la que se designan valores muy bajos o nulos. Su determinación es muy útil para establecer el diagnóstico diferencial entre LMC y reacciones neutrofílicas secundarias que cursan con valores elevadísimos.

ESTERASAS

Son un grupo de enzimas lisosomales presentes en cantidades variables en muchas células sanguíneas. Ellas hidrolizan ésteres orgánicos y liberan el alcohol (naftol), el cual se acopla a una sal diazoica para formar un azocolorante que se deposita sobre el sitio de actividad enzimática. Existen diferentes variedades según el sustrato empleado.

Se utilizan 4 sustratos: naftol-AS-C-cloroacetato, naftol-AS-D-acetato, alfa-naftil-acetato, alfa-naftil-butirato, los cuales al ser hidrolizados en presencia de una sal diazoica dan un precipitado insoluble en el lugar de la reacción.

Las esterasas específicas (cloroacetatoesterasa o CAE) usan el sustrato naftol-AS-D cloroacetato y su actividad se atribuye a las isoenzimas 1, 2, 7 y 8. Las esterasas inespecíficas representan las isoenzimas 3, 4, 5 y 6 y pueden usar varios sustratos: naftol AS-D acetato, alfa naftil acetato y alfa naftil butirato. El fluoruro de sodio es un potente inhibidor de las esterasas monocíticas.

Utilizando como sustrato el naftol-AS-C-cloroacetato (CAE) se detecta una esterasa que es específica de la granulopoyesisneutrófila en la que es + a partir del mieloblasto y se expresa en forma de un precipitado rojo anaranjado muy brillante. Su utilidad diagnóstica se centra básicamente en el reconocimiento de células blásticas mieloides, si bien su aparición es más tardía que la de la mieloperoxidasa, aunque iguala a ésta en especificidad.

Utilizando como sustrato el naftol-AS-D-acetato, se obtiene una intensa positividad en la serie monocítica que, a diferencia de las restantes células hematopoyéticas, es fluoruro sensible. Dada su + más restrictiva es preferente usar el sustrato a -naftil-acetato o a -naftil-butirato para marcar la serie monocítica y sus precursores, cuya positividad es intensa y se manifiesta en forma de un precipitado difuso por todo el citoplasma.

AZUL DE TOLUIDINA (METACROMASIA)

La característica principal de los gránulos de los polimorfonucleares basófilos es su metacromasia con los colorantes azules, la cual consiste en que estos gránulos adquieran un color rojizo en presencia de estos colorantes. La metacromasia se debe a la gran riqueza en mucopolisacáridos ácidos sulfatados que poseen gránulos basófilos.

Con esta tinción se pueden detectar los componentes basófilos de los elementos hematopoyéticos y de células cebadas o mastocitos.

UTILIDAD CLÍNICA

Las reacciones de esterasas sirven para diferenciar la leucemia monocítica aguda de la mielomonocítica.

La reacción de PAS resulta útil para diferenciar las enfermedades linfoproliferativas benignas y malignas; para identificar las células eritroides anormales de la eritroleucemia; para identificar la célula de Sézary (Leucemia prolinfocítica T, células con núcleo cerebriforme).

El índice de fosfatasa alcalina sirve para discernir las reacciones leucemoides granulocíticas de la leucemia mieloide crónica.

Diferencian los bastones de Auer de otras inclusiones cristalinas (son esterasa positivos, LMA).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1. Fijación de la extensión: Evita el deterioro celular al preservar las estructuras y reactividad funcional celulares evitando fenómenos nocivos para las mismas e impidiendo también la difusión de componentes bioquímicos entre los diferentes compartimentos celulares, así como al medio extracelular.

Se puede realizar con un gran número de sustancias fijadoras como: metanol, etanol, acetona, que actúan coagulando las proteínas celulares, así como el formaldehído y glutaraldehído, que actúan formando puentes intra e inter-proteicos, de manera que se altera menos la estructura celular. Es importante eliminar bien todos los restos de fijador para evitar interacciones con el compuesto que se desea analizar.

2. Incubación en el medio de reacción: Al poner en contacto las células con el medio de reacción se liberan unos productos que, bien por sí mismos o bien combinados con otros, dan lugar a un precipitado apreciable al microscopio óptico. En el caso de identificación de enzimas se debe controlar bien el pH y la temperatura para optimizar la reacción.

3. Tinción de contraste: Se realiza para facilitar la identificación morfológica de la célula en la que ha producido la reacción ya que permite resaltar en lo posible el producto de reacción y permite una óptima visualización del núcleo y del citoplasma.

Las reacciones deben tener 3 características: sensibilidad, especificidad y reproducibilidad.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No precisa

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Extensiones de médula ósea. Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

Citoquímica	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇
Peroxidasa	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Débil positivo	Positivo	Negativo
Negro Sudán	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Débil positivo	Positivo	Negativo
Ácido peryódico de Schiff (PAS)	Débil positivo	Débil positivo	Positivo	Positivo	Débil positivo	Positivo	Débil positivo
Cloroacetato esterasa específica (CAE)	Débil positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Naftol-AS-D-acetato esterasa (NASDA)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Alfa naftil acetato esterasa (ANAE)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Alfa naftil butirato esterasa (ANBE)	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
Muramidasa	Variable	Variable	Variable	Elevada	Elevada	Variable	Negativo
Fosfatasa ácida	Débil positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

Tabla 3.24 Citoquímica de las leucemias linfoides agudas

Citoquímica	B	T
Peroxidasa	Negativo	Negativo
Negro Sudán	Negativo	Negativo
Ácido peryódico de Schiff (PAS)	Positivo	Débil positivo
Fosfatasa ácida	Negativo	Positivo (focal)
Naftol-AS-D-acetato esterasa (NASDA)	Débil positivo o débil negativo	Positivo
NASDA + fluoruro	No se inhibe	No se inhibe
Alfa naftil butirato esterasa (ANBE)	Negativo	Positivo
Alfa naftil acetato esterasa (ANAE)	Negativo	Positivo

Informe de resultados interpretativo

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación del resultado corre a cargo de los médicos del laboratorio de Morfología del Servicio de Hematología. Se realizará un informe de las células observadas en un recuento, expresándolo como porcentaje y se realizará un informe interpretativo de la exploración. Es un resultado de positividad o negatividad para la técnica citoquímica que sea de aplicación.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área Morfología Hematológica: tres días laborable desde la recepción de la muestra en el laboratorio. Puede ser necesario aumentar este periodo en casos especialmente complicados o que requieran técnicas adicionales.

BIBLIOGRAFÍA

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, Foncuberta J, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4^a Edición. 2015

Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation. Scan J Clin Lab Inves 1968; 97:77-89.

Glasser L, Fiederlein RL. Neutrophil migration under the agarose. Am J Clin Pathol 1979; 72:956-62? International Committee for Standardization in Haematology. Recommended methods for cytological procedures in hematology. Clin Lab Haematol 1985; 7:55-74.

Parry RM, Chandon RC, Shahani RM. A rapid and sensitive assay of muramidase. Proc Soc Exp Biol 1965; 119:384.

Park B, Firkis SM, Smithwich EM. Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils. Lancet 1968; 2:532.

Scott CS, Den Ottolander GJ, Swirsky D, Pangalis GA, Vives Corrons JL, De Pasquale A, et al. Recommended procedures for the classification of acute leukemia's. Leuk Lymphoma 1993; 2:37-49.

Scott CD, Ottolander GJ, Swirsky D, Pangalis GA, Vives Corrons JL, De Pascuale A, et al. International Council for Standardization in Haematology. Recommended Procedures for the Classification of Acute Leukaemias. Leuk Lymphoma 1993; 11:37-50.

Woesner S, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico. 5.ª ed. Madrid: Acción Médica-FEHH; 2006.

Hayhoe FGJ, Quaglini D. Haematological Cytochemistry. 2.ª ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1990.

Hotchkiss RD. A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. Arch Biochem Biophys 1948; 16:131

Hemosiderinuria

INFORMACIÓN CLÍNICA:

Determina la presencia de hemosiderina en la orina. La hemosiderinuria es un dato importante en el diagnóstico de anemia con causa desconocida. La hemosiderinuria es un signo de hemólisis intravascular reciente. El sedimento urinario teñido para hemosiderina es un screen para el aumento en la excreción de hierro, el cual puede ser cuantificado y está aumentado en la hemocromatosis, anemia hemolítica y síndrome nefrótico.

UTILIDAD CLÍNICA:

Estudio de Presencia de Hierro en orina, puede estar aumentado en casos de Hemocromatosis, anemia hemolítica o en el síndrome nefrótico.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO:

En orina se elimina el sobrenadante y se tiñe con una mezcla de ferrocianuro potásico y ClH. Se añade un volumen similar de esta mezcla al sedimento que queda en el tubo, luego se seca, se cubre con un portaobjetos y se ve al microscopio.

REQUISITOS DEL PACIENTE

No precisa

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Micción aislada (Contenedor): Contenedor de 100 mL con toma de muestra al vacío para orina de micción aislada

VALORES DE REFERENCIA

Informe de resultados interpretativo cualitativo. Presencia o ausencia

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación del resultado corre a cargo de los hematólogos del laboratorio de Eritropatología del Servicio de Hematología. Se realizará un informe interpretativo basado en la presencia de excreción de hierro por la orina.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Morfología Hematológica: Tiempo de respuesta: tres días laborable desde la recepción de la muestra en el laboratorio.

Tinción de Perls

INFORMACIÓN CLÍNICA

Es utilizada para la semicuantificación de los depósitos de hierro de la medula; es una prueba sensible en la evaluación de la reserva de hierro nos sirve para el diagnóstico de la deficiencia de hierro, así mismo es fundamental en el despistaje hemosiderosis/hemocromatosis. Nos ayuda en el diagnóstico de anemia sideroblástica y de los Síndromes Mielodisplásicos.

UTILIDAD CLÍNICA

Con esta técnica se pueden encontrar tres patrones típicos que nos orientarán hacia una patología u otra: Ferropenia, hemocromatosis o distribuciones anormales del hierro (Síndromes Mielodisplásicos entre otros)

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

La coloración de Perls pone de manifiesto la presencia de hemosiderina en el citoplasma tipo de célula pudiendo ser aplicada a las células presentes en un frotis o extensión de sangre o médula ósea. La hemosiderina es un derivado insoluble de la ferritina, que se considera el resultado de la precipitación de varias moléculas desnaturalizadas de apoferritina. Normalmente, constituye el hierro no hemínico de los eritroblastos y puede hallarse abundantemente en las células del sistema mononuclear fagocítico.

REQUISITOS DEL PACIENTE:

No se precisan

REQUISITOS DE LA MUESTRA:

Extensiones de médula ósea

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

Informe de resultados interpretativo cualitativo. Presencia o ausencia y distribución de los depósitos de hierro.

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación del resultado corre a cargo de los hematólogos del Área de Eritropatología. Se realizará un informe interpretativo de la exploración.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Morfología Hematológica: Tiempo de respuesta: tres días laborable desde la recepción de la muestra en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

Bonneau D, Winter-Fuseau I, Loiseau MN, Amati P, Berthier M, Oriot D, et al. Bilateral cataract and high serum ferritin: a new dominant genetic disorder? J Med Genet 1995; 32(10):778-9.

EASL Clinical Practice Guidelines. HFE hemochromatosis. J Hepatol; 2010.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. Nature Genet 1996; 13:399-408.

International Committee for Standardization in Hematology. Revised recommendations for the measurement of serum iron in human blood. British Journal of Haematology 1990; 75:613-6.

International Committee for Standardization in Haematology. The measurement of total and unsaturated iron-binding capacity in serum. British Journal of Haematology 1978; 38:281-6.

Luscieti S, Tolle G, Aranda J, Campos CB, Risse F, Moran E, et al. Novel mutations in the Ferritin-L iron-responsive element that only mildly impair IRP binding causes hereditary hyperferritinaemia cataract syndrome. Orphanet J Rare Dis 2013; 19(8):30.

Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1977; 74(2):560-4.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 1977; 74(12):5463-7.

ERITROPATOLOGÍA

Dosificación de hemoglobinas

INFORMACIÓN CLÍNICA

La hemoglobina es el pigmento rojo de la sangre y constituye el 95% del peso eritrocitario. Su molécula es una proteína de estructura relativamente compleja cuya misión es el transporte de todo el oxígeno y la mayor parte del dióxido de carbono. Debido a esto y a través de la hemoglobina el eritrocito realiza su función respiratoria en el organismo. Cada molécula de hemoglobina puede fijar un máximo de 4 moléculas de oxígeno, esta unión es de tipo coordinado y por lo tanto fácilmente dissociable. En condiciones patológicas la hemoglobina puede fijar otros gases tóxicos como el ácido sulfhídrico o el monóxido de carbono.

Estructuralmente la molécula de hemoglobina está formada por cuatro cadenas de globina (Cadenas alfa, cadenas beta, Cadenas delta y cadenas épsilon) iguales dos a dos y cuatro grupos HEMO unidos a dichas cadenas globínicas.

El grupo HEMO es el componente no proteico de la hemoglobina y a él se debe el color rojo de la sangre. Se compone de una protoporfirina IX formada por cuatro pirroles en posición espacial bidimensional o plana y un átomo de hierro en estado reducido situado en el centro, a este se unen los cuatro grupos pirroles mediante valencias de coordinación. La estructura espacial que adopta el átomo de hierro en su unión con la protoporfirina IX hace que posea un total de seis valencias de coordinación, por lo que quedan dos libres una para unirse a la cadena de globina (quinta valencia) y otra para unirse reversiblemente al oxígeno (sexta valencia). Este sólo se une al Hierro en estado reducido, cuando se encuentra en estado oxidado el hierro rechaza la unión al oxígeno lo que se denomina Metahemoglobina (<1% en el sujeto adulto sano). La diaforasa (NADH-metahemoglobina reductasa o citocromo B5 reductasa) mantienen siempre el hierro en estado reducido.

En el transcurso del desarrollo humano las distintas cadenas de globina se combinan entre sí de distinta manera dando lugar a distintas formas moleculares de hemoglobina. Durante la vida adulta la hemoglobina predominante es la HbA₁ (97%) existiendo una pequeña porción de hemoglobina A₂ (3%). En la vida fetal predomina la denominada HbF que en el adulto es prácticamente inexistente.

La estructura terciaria de cada cadena de hemoglobina habilita una cavidad en superficie donde se inserta el grupo HEMO, así cada molécula de hemoglobina posee cuatro grupos HEMO.

El metabolismo de excreción de la hemoglobina se realiza a través del Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF), degradándose la hemoglobina a metahemoglobina y de ahí a Bilirrubina.

UTILIDAD CLÍNICA:

Método diagnóstico de elección para el estudio de las Hemoglobinopatías y talasemias

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO:

La Electroforesis Capilar (EC) utiliza el principio de electroforesis en solución libre, una técnica de separación electrocinética realizada en un tubo de diámetro interno inferior a 100 µm lleno de un

tampón compuesto por electrolitos. Se considera una tecnología intermedia entre la electroforesis de zona en soporte y la cromatografía líquida. En este sistema, la inyección de las muestras diluidas con solución hemolizante en los capilares se realiza en el ánodo por aspiración. La separación se realiza a continuación aplicando una diferencia de potencial de varios miles de voltios en los extremos de cada capilar. Las hemoglobinas son detectadas directamente en una burbuja existente en el capilar mediante espectrofotometría de absorbancia a 415 nm, que es la longitud de onda de absorción específica de las hemoglobinas. La detección directa proporciona automáticamente una cuantificación relativa precisa de cada fracción individual de las hemoglobinas que presenta un interés particular, como la hemoglobina A2 en el diagnóstico de las β talasemias.

El resultado, o electroferograma, se compone de 300 lecturas (puntos) consecutivas y se divide en 15 zonas. Para facilitar la interpretación, los resultados son automáticamente posicionados con respecto a la HbA. Hemoglobinas normales (y variantes) se muestran como picos y el sistema identifica automáticamente la zona (Z 1 a Z 15) a la que pertenece una variante. En el caso de muestras sin presencia de Hb A o Hb A2, la caracterización a partir de las zonas de identificación se realiza utilizando una dilución de la muestra con control normal. La cuantificación en estos casos se obtiene analizando la muestra inicial (no mezclada con el control).

REQUISITOS DEL PACIENTE:

El paciente no debe haber recibido transfusiones de hemoderivados en los 120 días previos a realizar esta prueba.

REQUISITOS DE LA MUESTRA:

Sangre con anticoagulante (EDTA). (Contenedor): Tubo de tapón malva.

VALORES CRÍTICOS

No aplica

VALORES DE REFERENCIA:

Hemoglobina A 96-98%

Hemoglobina A 2 2.2-3.5%

Hemoglobina F 0.0-1.0%

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación del resultado corre a cargo de los médicos del laboratorio de Morfología de Hematología en forma de informe cualitativo y cuantitativo. Mediante este método se pueden detectar hemoglobinopatías y β talasemias, pudiendo orientarse estudios ulteriores para descartar otras alteraciones eritrocitarias.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Morfología Hematológica: 10 días laborables desde la recepción de la muestra en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

Bain B, Bates I, Laffan M, Lewis M editors. Dacie and Lewis Practical Haematology. 11.^a ed. Philadelphia: Churchill Livingstone/Elsevier; 2012.

Betke K, Marti HR, Scilicet I. Estimation of small percentages of fetal hemoglobin. Nature 1959; 184:1877-8.

Carrell RW, Kay R. A simple method for the detection of unstable haemoglobins. Br J Haematol 1972; 23:615.

Clegg JB. Haemoglobin Synthesis. En: Wheatherall DJ editor. Methods in Haematology. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1983. p. 54-73.

Efremov GD, Huisman THJ. The laboratory diagnosis of the haemoglobinopathies. Clin Haematol 1974; 3:542.

Huitsman RG, Barclay GPT, Canning DM, Yawson GL. A rapid whole blood solubility test to differentiate the sickle-cell trait from sickle-cell anemia. J Clin Pathol 1970; 23:781.

International Committee for Standardization in Haematology. ICSH recommendations for Fetal Hemoglobin Reference Preparations and Fetal Hemoglobin determination by the Alkali Penetration Method. Br J Haematol 1979; 42:133-6.

International Committee for Standardization in Haematology. ICSH Recommendations for selected methods for quantitative estimation of HbA2 and for HbA2 reference preparation. Br J Haematol 1978; 38:573-8.

Itano HA, Pauling L. A rapid diagnostic test for sickle cell anemia. Blood 1949; 4:66-7.

Kleihauer E, Braun H, Betke K. Demonstration von fetalem Hamoglobin in der Erythrocyteneines Blutausrichs. Klin Wuchenschr 1957; 35:635.

Mañú M, Martínez A, Sitjà E, Cararach V, Sabrià J, Boixadera J, et al. Cribado neonatal de hemoglobinopatías y déficit de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) en Cataluña. Estudio molecular de la anemia falciforme asociada a α -talasemia y déficit de G6PD. Medicina Clínica 2007; 129(5):161-4.

Manú Pereira M, Cabot A, Vives Corrons JL. Molecular heterogeneity of β -thalassemia alleles in Spain and its importance in the diagnosis and prevention of β -thalassemia major and sickle cell disorders. Hemoglobin 2009; 33(3-4):226-34.

Marengo-Rowe A.Q. Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobines on cellulose acetate. J Clin Pathol 1969; 18:790.

Vives Corrons JL, PujadesBeneit MA, Miguel-García A, Miguel-Sosa A, Cambiazzo S. Rapid detection of Spanish (db)0-thalassemia deletion by polymerase chain reaction. Blood 1992; 80:1582-5.

ÁREA DE TROMBOSIS Y HEMOSTASIA

Tiempo de protrombina

INFORMACIÓN CLÍNICA

El tiempo de protrombina (TP) o test de Quick es el tiempo que tarda en coagular el plasma de una paciente al añadirle un reactivo que contiene tromboplastina y fosfolípidos. Este reactivo se une al factor VII del plasma y activa a la llamada clásicamente vía extrínseca de la coagulación, que comprende los factores VII, X, V y II. El factor II es la protrombina que, una vez activado se convierte en trombina que actúa sobre el fibrinógeno para formar la fibrina.

Cualquier disminución de los factores antes citados, aumenta el TP. También el TP puede aumentar por acción terapéutica de inhibidores anticoagulantes o por anticoagulantes circulantes.

Aunque el TP se mide en segundos, su resultado se puede expresar de cuatro maneras diferentes que vamos a explicar a continuación:

1 – Resultado expresado en SEGUNDOS: Tiene el inconveniente de que depende del reactivo utilizado; incluso un cambio en el lote de reactivo puede alterar el tiempo de coagulación.

2 – Resultado expresado como RATIO: Es el cociente entre el TP del paciente y el TP de un individuo normal. Es el más útil para usar en condiciones normales.

3 – Resultado expresado como TASA: No tiene utilidad, pero se sigue usando como vestigio histórico. Si se dice que un paciente tiene una tasa de protrombina de un 50% equivale a decir que el tiempo que tarda en coagular su plasma es igual al de un paciente normal con el plasma diluido a la mitad.

4 – Resultado expresado como ratio internacional normalizado (INR): Se usa en el tratamiento con anticoagulantes orales (ver prueba específica: Control de TAO-INR), y se hizo necesario debido a la distinta sensibilidad de las tromboplastinas comerciales usadas como reactivo. Cada tromboplastina comercial tiene un índice de sensibilidad internacional (ISI) que se obtiene al compararla con una tromboplastina patrón de la OMS. El ISI interviene en el cálculo del INR del modo siguiente: $INR = \text{Ratio}^{\text{ISI}}$.

UTILIDAD CLÍNICA

El TP está alargado en el déficit de los factores de coagulación II, V, VII y X. Como la mayoría de estos factores son vitamina K dependientes y de síntesis hepática, su estudio es útil para valorar función hepática y para controlar el tratamiento con anticoagulantes orales de tipo cumarínico; sin embargo, el TP no es sensible para déficit de factores VIII, IX, XI y XII.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Coagulométrico o cronométrico: La adición de tromboplastina cálcica al plasma del paciente, en presencia de iones calcio inicia la activación de la vía extrínseca de la coagulación. Mide el tiempo que tarda en formarse el coágulo.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul.

VALORES DE REFERENCIA

TP(segundos)

Edad	Límite inferior segundos	Límite superior Segundos
0 días – 1 mes	9.5	12.6
1-5 meses	9.7	12.8
6-11 meses	9.8	13
1-5 años	9.9	13.4
6-10 años	10	14.6
11-17 años	10	14.1
18-150 años	9.0	15.0

TP(%)

Edad	Límite inferior (%)	Límite superior (%)
0-150 años	65	125

TP (ratio)

Edad	Límite inferior (ratio)	Límite superior (ratio)
0-150 años	0.80	1.40

VALORES CRÍTICOS

Tiempo de protrombina (INR) > 5 y/o Tasa de protrombina (%) <25 %.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El tiempo de protrombina está alargado en:

Déficit de factor VII.

Déficit de factor X.

Déficit de factor V.

Déficit de factor II.

Déficits combinados de factores por hepatopatía.

Coagulación intravascular diseminada (CID).

Déficit de vitamina K, incluido el tratamiento anticoagulante oral.

Tratamiento trombolítico reciente.

El tiempo de protrombina puede estar acortado en:

Tratamiento con estrógenos.

Gestación.

Mutación de protrombina.

Alteraciones preanalíticas (Hemolisis, ictericia, hiperbilirrubinemia, muestra coagulada...)

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Core: 1 día laborable.

Área de Trombosis y Hemostasia Urgente: 45 minutos

BIBLIOGRAFÍA

Tripodi A, Arbin A, Chantarangkul V, Mannucci PM. Recombinant tissue factor as substitute for conventional thromboplastin in the prothrombin time test. *Thromb. Haemost.* 1992; 67(1): 42-45.

Rizza CR, Walker W. One-stage prothrombin time techniques. In: Bang NU, Beller FK, Deutsch E, Mammen EF, eds. *Thrombosis and bleeding disorders*. New York: Academic Press, 1971

Clinical and Laboratory Standards Institute. One Stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test; Approved Guideline – Second Edition, CLSI Document H47-A2; Vol. 28 No.

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, Foncuberta J, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. *Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición*. 2015

Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline, Document C28-A3; Vol. 28 No. 3

Fibrinógeno derivado

INFORMACIÓN CLÍNICA

El fibrinógeno es una glucoproteína sintetizada en el hígado. Es el factor I de la coagulación y el sustrato final a partir del cual se produce el coágulo. Al actuar la trombina activada sobre la molécula del fibrinógeno, se liberan dos pequeños péptidos (fibrinopéptidos A y B) dando lugar a la formación de monómeros de fibrina. Los monómeros de fibrina se polimerizan y se estabilizan por acción del factor XIIIa para formar el coágulo. El fibrinógeno está ausente en la afibrinogenemia congénita que causa trastornos hemorrágicos. Hay numerosas variantes hereditarias del fibrinógeno (disfibrinogenemias) algunas de las cuales dan lugar a trastornos de la coagulación y diátesis hemorrágica y otras tendencias a la trombosis.

El fibrinógeno también es un reactante de fase aguda y se eleva en estados de stress o inflamatorios producidos por infecciones, heridas, cirugía, traumatismos, así como en el embarazo.

UTILIDAD CLÍNICA

El fibrinógeno se usa para el diagnóstico de trastornos hemorrágicos o trombóticos, estudios de TP y TTPA alargados, sospecha de CID y como marcador de riesgo de enfermedad cardiovascular.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Espectofotométrico. Mide el aumento de absorbancia producido al formarse el coágulo cuando se hace del test de protrombina.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul.

VALORES DE REFERENCIA

Edad	Límite inferior (mg/dL)	Límite superior (mg/dL)
0 días – 1 mes	143	402
1-5 meses	150	376
6-11 meses	157	360
1-5 años	188	413
6-10 años	189	475
11-17 años	177	420
0-150 años	150	600

VALORES CRÍTICOS

<100 mg/dl

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se encuentran valores bajos de fibrinógeno en: afibrinogenemia, hipofibrinogenemia, disfibrinogenemias, coagulopatía por consumo, insuficiencia hepática.

Se encuentran valores altos de fibrinógeno en: infecciones agudas, embarazo, anticoncepción oral, cáncer, enfermedad coronaria aguda, trastornos inflamatorios, traumatismos.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Core: 1 día laborable.

Área de Trombosis y Hemostasia Urgente: 45 minutos

BIBLIOGRAFÍA

Davis EW, Hougie C. and Lundblad RL. Mechanisms of blood coagulation, in: Recent Advances in Blood Coagulation, J & A Churchill Ltd, London 1969.

Grannis GF. Plasma fibrinogen: Determinations, normal values, physiopathologic shifts and fluctuations, Clin Chem. 1970; 6: 486-494.

Krobot K, et al. Determinants of plasma fibrinogen: Relation to body weight, waist-to-hip ratio, smoking, alcohol, age and sex, Arteriosclerosis and Thrombosis. 1992; 12(7): 780-788.

Stone MC, and Thorp JM. Plasma fibrinogen: A major coronary risk factor, J R Coll Gen Pract. 1985; 35: 565-569. 5. Kannel WB, et al. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease: The Framingham Study, JAMA. 1987; 258(9): 1183-1186.

Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens, Acta Haemat. 1957;17: 237.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. Fourth, Edition, CLSI Document C3-A4; Vol. 26 No.22.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation and Molecular Haemostasis Assays; Approved Guideline – Fifth Edition, CLSI Document H21-A5; Vol. 28 No. 5.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedure for the determination of fibrinogen in plasma; Approved Guideline, CLSI Document H-30A; Vol. 14 No. 2

Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation, Am. J. Clin. Pathol. 1970; 53: 924-927.

Westgard JO, and Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACCC Press 1986. Bovill EG, and Tracy RP. Methods for the Determination of the Plasma concentration of Fibrinogen, Williams Hematology, Fifth Edition; L36: L87-L88.

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, Foncuberta J, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición.2015.

Fibrinógeno Clauss

INFORMACIÓN CLÍNICA

El fibrinógeno es una glucoproteína sintetizada en el hígado. Es el factor I de la coagulación y el sustrato final a partir del cual se produce el coágulo. Al actuar la trombina activada sobre la molécula del fibrinógeno, se liberan dos pequeños péptidos (fibrinopéptidos A y B) dando lugar a la formación de monómeros de fibrina. Los monómeros de fibrina se polimerizan y se estabilizan por acción del factor

XIIIa para formar el coágulo. El fibrinógeno está ausente en la afibrinogenemia congénita que causa trastornos hemorrágicos. Hay numerosas variantes hereditarias del fibrinógeno (disfibrinogenemias) algunas de las cuales dan lugar a trastornos de la coagulación y diátesis hemorrágica y otras tendencias a la trombosis.

El fibrinógeno también es un reactante de fase aguda y se eleva en estados de stress o inflamatorios producidos por infecciones, heridas, cirugía, traumatismos, así como en el embarazo.

La determinación del Fibrinógeno clausss está indicada cuando los resultados del Fibrinógeno Derivado están fuera de los límites de normalidad, especialmente cuando son inferiores a 100-120 mg/dL.

UTILIDAD CLÍNICA

El fibrinógeno se usa para el diagnóstico de trastornos hemorrágicos o trombóticos, estudios de TP y TTPA alargados, sospecha de CID y como marcador de riesgo de enfermedad cardiovascular.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El método más informativo es el coagulativo de Clauss, que valora el fibrinógeno funcional.

Con una concentración elevada de trombina (70-100 U/ml) el tiempo de coagulación de un plasma es inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul.

VALORES DE REFERENCIA

De 0 días a 30 días (143,00 - 402,00)
De 1 meses a 5 meses (150,00 - 376,00)
De 6 meses a 11 meses (157,00 - 360,00)
De 1 años a 5 años (188,00 - 413,00)
De 6 años a 10 años (189,00 - 475,00)
De 11 años a 17 años (177,00 - 420,00)
De 18 años a 150 años (150,00 - 600,00)

VALORES CRÍTICOS

<100 mg/dL

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se encuentran valores bajos de fibrinógeno. Es en estos casos donde la determinación del Fibrinógeno Clauss tiene sentido para despistaje y orientación terapéutica en hepatopatías, hemorragias severas, coagulopatías de consumo, tratamientos fibrinolíticos e hipo- o disfibrinogenemias.

Se encuentran valores altos de fibrinógeno en: infecciones agudas, embarazo, anticoncepción oral, cáncer, enfermedad coronaria aguda, trastornos inflamatorios, traumatismos.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Core: Un día laborable.

Área de Trombosis y Hemostasia de Laboratorio de Respuesta Rápida: 45 Minutos.

BIBLIOGRAFÍA

Davis EW, Hougie C. and Lundblad RL. Mechanisms of blood coagulation, in: Recent Advances in Blood Coagulation, J & A Churchill Ltd, London 1969.

Grannis GF. Plasma fibrinogen: Determinations, normal values, physiopathologic shifts and fluctuations, Clin Chem. 1970; 6: 486-494.

Krobot K, et al. Determinants of plasma fibrinogen: Relation to body weight, waist-tohip ratio, smoking, alcohol, age and sex, Arteriosclerosis and Thrombosis. 1992; 12(7): 780-788.

Stone MC, and Thorp JM. Plasma fibrinogen: A major coronary risk factor, J R Coll Gen Pract. 1985; 35: 565-569. 5. Kannel WB, et al. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease: The Framingham Study, JAMA. 1987; 258(9): 1183-1186.

Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens, Acta Haemat. 1957;17: 237.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. Fourth, Edition, CLSI Document C3-A4; Vol. 26 No.22.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation and Molecular Haemostasis Assays; Approved Guideline – Fifth Edition, CLSI Document H21-A5; Vol. 28 No. 5.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedure for the determination of fibrinogen in plasma; Approved Guideline, CLSI Document H-30A; Vol. 14 No. 2

Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation, Am. J. Clin. Pathol. 1970; 53: 924-927.

Westgard JO and Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC Press 1986.

Bovill EG, and Tracy RP. Methods for the Determination of the Plasma concentration of Fibrinogen, Williams Hematology, Fifth Edition; L36: L87-L88.

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, Foncuberta J, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición.2015

Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPA)

INFORMACIÓN CLÍNICA

El TTPA o tiempo de cefalina activada, mide el tiempo que tarda en coagular una muestra de plasma del paciente con un reactivo que contiene fosfolípidos y un activador de sílice que proporciona una superficie que participa en un cambio conformacional del factor XII plasmático, lo que produce su activación. El factor XIIa forma un complejo con otros dos componentes plasmáticos, el cininógeno de alto peso molecular (factor Fitzgerald) y la precalicreína (factor Fletcher). Estas tres glucoproteínas plasmáticas denominadas factores de activación por contacto, inician la formación del coágulo in vitro, pero no participan en la coagulación in vivo.

Las deficiencias de factores que causan resultados prolongados del TTPA son, por orden de reacción, el XI, IX, VIII, X, V, protrombina y fibrinógeno, cuando éste es inferior a 100 mg/dl. El TTPA también está prolongado en presencia de anticoagulante lúpico, anticuerpo antifactor VIII y heparina no fraccionada. Las deficiencias de los factores VII y XIII no tienen efecto sobre el TTPA.

UTILIDAD CLÍNICA

El TTPA se utiliza para el estudio de los factores de la vía intrínseca de la coagulación, monitorización del tratamiento con heparina no fraccionada o presencia de anticoagulante lúpico u otros inhibidores.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Coagulométrico o cronométrico. El plasma del paciente es incubado con una cantidad óptima de fosfolípidos, tromboplastina activada, una superficie de contacto cargada negativamente y tampón, lo que inicia la activación de la vía intrínseca de la coagulación. Después de una incubación a 37°C durante un determinado periodo de tiempo, la adición de Cl_2Ca desencadena el proceso de la coagulación y se mide el tiempo requerido para la formación del coágulo.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul.

VALORES DE REFERENCIA

TTPA (segundos)

Edad	Límite inferior segundos	Límite superior Segundos
0 días – 1 mes	27.6	45.6
1-5 meses	24.8	40.7
6-11 meses	25.1	40.7
1-5 años	24.0	39.2
6-10 años	26.9	38.7
11-17 años	24.6	38.4
18-150 años	20	40

TTPA(ratio)

T.Tromboplastina parcial (R.)	De 0 a 1 meses (0,70 - 1,45)
	De 1 mes a 150 años (0,70 - 1,45)

VALORES CRÍTICOS

TTPA > 85 s

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El TTPA está alargado en:

- Déficit de calicreína.
- Déficit de kininógeno de alto peso molecular.
- Déficit de factor XII.
- Déficit de factor XI.
- Déficit de factores VIII y IX: Hemofilias A y B.
- Déficit de factor X.
- Déficit de factor V.
- Anticoagulantes específicos.
- Anticoagulante lúpico.
- Tratamiento con heparina no fraccionada.

-Tratamiento con hirudina.

-Alteraciones preanalíticas: Muestra con volumen insuficiente, hipertrigliceridemia por encima de 1.000.

El TTPA está normal en:

-Déficit de factor VII.

-Tratamiento con heparinas de bajo peso molecular.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Core: 1 día laborable.

Área de Trombosis y Hemostasia Urgente: 45 minutos

BIBLIOGRAFÍA

Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, Isonishi A, Hiura H, Fugimura Y. Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS-13 activity. Transfusion 2006; 46:1444-52.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988;16(3).

Tirado I, Fontcuberta J, Soria JM. Rapid detection of the 46 C → T polymorphism in the Factor XII gene, a novel genetic risk factor for thrombosis, by melting peak analysis using fluorescence hybridization probes. GeneticTesting 2003; 7(4):295-301.

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, FoncubertaJ, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición.2015

Tiempo de Trombina

INFORMACIÓN CLÍNICA

La adición de bajas concentraciones de trombina al plasma da lugar a la coagulación del fibrinógeno en un tiempo que dependerá no solo de la concentración de este, sino también de la funcionalidad de la molécula y de la presencia de inhibidores de la formación de fibrina.

UTILIDAD CLÍNICA

Es útil como pasa siguiente en el estudio del TTPA alargado ayudando a identificar la causa de prolongación del mismo. El tiempo de trombina se encuentra alargado en Hipo/dis-fibrinogenemia: congénitas o adquiridas (hepatopatía, CID, hiperfibrinólisis, fármacos), presencia de Heparina en la muestra, cuando existen anticuerpos anti-trombina y cuando se encuentran elevación de productos de degradación del fibrinógeno, paraproteínas, amiloidosis.

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Esta prueba mide el tiempo de coagulación del plasma citratado en presencia de una cantidad fija de trombina. Permite la valoración de transformación del fibrinógeno en fibrina. El reactivo para esta prueba debe ser estable y sensible a la presencia de heparina terapéutica.

REQUISITOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA:

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul.

VALORES DE REFERENCIA:

Tiempo de Trombina: 10-18 s

Tiempo de Trombina (Ratio): 0.8-1.3

VALORES CRÍTICOS:

No aplica

INTERPRETACIÓN RESULTADOS

La prueba se prolonga por reducción en la concentración de fibrinógeno, pero también por marcada elevación del mismo (más de 6 g/l) y por alteraciones funcionales de su molécula (disfibrinogenemia), frecuentes en las hepatopatías. Es muy sensible a la presencia de heparina y se prolonga también por

interferencias en la polimerización de la fibrina, como la concertación elevada de productos de degradación de la fibrina (dímero D) o del fibrinógeno (PDF).

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Core: 1 día laborable.

Área de Trombosis y Hemostasia Urgente: 45 minutos

BIBLIOGRAFÍA

Biggs R, Rizza C. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis. III ed. Oxford, England: Blackwell Scientific Publications, 1984.

Colman R, et al. Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice. Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1987.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. Fourth, Edition, CLSI Document C3-A4; Vol. 26 No.22

Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth Edition, CLSI Document H21-A5; Vol. 28 No. 5

Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation, Am. J. Clin. Pathol. 1970; 53: 924-927.

Westgard JO, and Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC Press 1986. 7. IFCC Committee Report, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1983; 21: 749-760.

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, Foncuberta J, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición.2015

Tiempo de reptilase

INFORMACIÓN CLÍNICA

Es una variante del Tiempo de trombina. El veneno de las víboras del género Bothrops contiene una enzima la batroxobina que es tipo trombina y que sólo libera FibrinopéptidoA, no se inhibe por Heparina o Antitrombina III.

UTILIDAD CLÍNICA

Este tiempo se alarga en los mismos supuestos que se han descrito para el tiempo de trombina, pero no se altera cuando existe Heparina o fármacos anti-IIa como el Dabigatrán.

Nos sirve por lo tanto para descartar alteraciones del TTPA por presencia de estos fármacos.

DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO:

Esta prueba mide el tiempo de coagulación del plasma citratado en presencia de una cantidad fija de trombina y añadiendo veneno de la víbora Bothrops Atrox. Permite la valoración de transformación del fibrinógeno en fibrina de manera independiente a los fármacos tipo Heparina o anti-IIa (Dabigatrán)

REQUISITOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul.

Valores de Referencia:

Tiempo de Reptilase: 10-18 s

Tiempo de Reptilase (Ratio): 0.8-1.3

VALORES CRÍTICOS

No aplica

REQUISITOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Core: 1 día laborable.

Área de Trombosis y Hemostasia Urgente: 45 minutos.

INTERPRETACIÓN RESULTADOS

Se trata de una prueba complementaria del tiempo de trombina, ya que se prolonga por las mismas causas que este excepto por la presencia de heparina o de inhibidores directos de la trombina. Su normalidad en presencia de un tiempo de trombina prolongado señala la presencia de heparina (por administración terapéutica o por contaminación durante su extracción) o de inhibidores de la trombina (dabigatrán, etc.). Por otra parte, permite detectar otras causas de prolongación del tiempo de polimerización de la fibrina en pacientes tratados con heparina.

BIBLIOGRAFÍA

Biggs R, Rizza C. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis. III ed. Oxford, England: Blackwell Scientific Publications, 1984.

Colman R, et al. Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice. Philadelphia: J.B. Lippincott Co., 1987. 3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. Fourth, Edition, CLSI Document C3-A4; Vol. 26 No.22

Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth Edition, CLSI Document H21-A5; Vol. 28 No. 5

Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation, Am. J. Clin. Pathol. 1970; 53: 924-927.

Westgard JO, and Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC Press 1986. 7. IFCC Committee Report, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1983; 21: 749-760

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, Foncuberta J, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición.2015.

Productos de Degradación del Fibrinógeno (PDF)

INFORMACIÓN CLÍNICA

La plasmina circulante actúa sobre la fibrina y el fibrinógeno generando una serie de productos de degradación conocidos como FDP, siendo éstos uno de los marcadores más importantes para el seguimiento de los desórdenes fibrinolíticos que ocurren en el organismo, especialmente para el diagnóstico y observación del progreso de la coagulación intravascular diseminada (CID). Su determinación es también útil para diagnosticar trombosis y monitorizar la eficiencia de los tratamientos trombolíticos.

UTILIDAD CLÍNICA

Diagnóstico y seguimiento de la coagulación Intravascular diseminada (CID).

Diagnóstico de fenómenos trombóticos y monitorización de los tratamientos Trombolíticos.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El Reactivo Látex es una suspensión de partículas de látex de poliestireno de tamaño uniforme, a las que se les ha unido un anticuerpo monoclonal altamente específico contra el fragmento D incluido en los productos solubles derivados de la fibrina/fibrinógeno. Cuando un plasma que contiene PDF se mezcla con el Reactivo Látex y el Tampón de Reacción, las partículas de látex aglutinan. El grado de aglutinación es directamente proporcional a la concentración de FDP en la muestra y se determina midiendo el descenso de la luz transmitida causado por los agregados (inmunoensayo turbidimétrico).

VALORES DE REFERENCIA

Concentraciones superiores a 2.01 ug/mL indican presencia elevada de PDF, concentraciones inferiores a 2.01 ug/mL indican negatividad.

VALORES CRÍTICOS

No aplica

REQUISITOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul.

TIEMPOS DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Rutina: 1 Día Laborable.

Área de Trombosis y Hemostasia Laboratorio de Respuesta Rápida: 45 minutos

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La detección de concentraciones elevadas de PDF ayuda para establecer diagnóstico de coagulación intravascular diseminada. La presencia de PDF altos indica que el proceso fibrinolítico tiene una alta probabilidad de ser asociado con CID.

Los PDF también están elevados en la fibrinólisis primaria. Este método puede ser utilizado en la monitorización de la terapia fibrinolítica que se usa en el tratamiento del embolismo pulmonar, infarto de miocardio o accidente cerebrovascular trombótico.

Los PDF también se elevan en los estados inflamatorios y algunas enfermedades hepáticas

BIBLIOGRAFÍA:

Palareti G. Fibrinogen/fibrin Degradation Products: Pathophysiology and Clinical Application, Fibrinolysis. 1993; 7:60-61.

Gaffney PJ. The Occurrence and Clinical Relevance of Fibrin Fragments in Blood, Annals New York Academy of Sciences. 1983; 408: 407-423.

Newman DJ, et al. Particle enhanced light scattering immunoassay, Ann Clin Biochem. 1992; 29: 22-42.

Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation and Molecular Haemostasis Assays; Approved Guideline – Fifth Edition, CLSI Document H21-A5; Vol. 28 No. 5.

Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation, Am J Clin Pathol. 1970; 53:924-927.

Westgard JO, Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC Press 1986. 7. Endo T, Amemiya N, Kume S. RinshoKensa Guide 2003-2004. 1st ed. Tokyo: Bunkodo, 2003; 698-70.

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, FoncubertaJ, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4 ª Edición.2015

D-Dímero

INFORMACIÓN CLÍNICA

El D-dímero se origina por acción de la plasmina sobre la fibrina estabilizada por el factor XIII liberando un fragmento de la fibrina que contiene una unión intermolecular entre las cadenas gamma de dos monómeros de fibrina. Su presencia confirma que ha ocurrido la formación de trombina y plasmina.

UTILIDAD CLÍNICA

Diagnóstico de Exclusión de ETEV

Riesgo de retrombosis en ETEV

Diagnóstico y seguimiento de CID

Monitorización de tratamientos fibrinolíticos

Marcador de estados protrombóticos

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El reactivo para la determinación de D-Dímero es una suspensión de partículas de látex de poliestireno de tamaño uniforme, a las que se les ha unido el fragmento F(ab')₂ de un anticuerpo monoclonal altamente específico contra el dominio Dímero-D contenido en los derivados solubles de la fibrina. El uso del fragmento F (ab')₂ permite una detección más específica del Dímero-D evitando la interferencia de algunos factores endógenos como el Factor Reumatoide. Cuando se mezcla un plasma que contiene Dímero-D con el Reactivo Látex y el Tampón de Reacción, las partículas aglutinan. El grado de aglutinación es directamente proporcional a la concentración de Dímero-D contenida en el plasma. Los agregados causan un descenso de la luz transmitida (inmunoensayo turbidimétrico)

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul.

VALORES DE REFERENCIA

De 215-500 ng/mL FEU en adultos a partir de 18 años, para resto de resultados por rango de edad véase la siguiente tabla:

Ddimero	Unidades	Edad inferior	Edad superior
445,00 - 1200,00	ng/mL FEU	0 días	30 días
215,00 - 878,00	ng/mL FEU	1 mes	5 meses
215,00 - 844,00	ng/mL FEU	6 meses	11 meses
215,00 - 780,00	ng/mL FEU	1 año	5 años
215,00 - 567,00	ng/mL FEU	6 años	10 años
215,00 - 580,00	ng/mL FEU	11 años	17 años

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se encuentran **valores elevados** en procesos fibrinolíticos secundarios:

Coagulación intravascular diseminada (CID)

Embolismo pulmonar / Trombosis venosa profunda

Neoplasias, incluso en ausencia de una CID "abierta"

Cirrosis hepática

Insuficiencia respiratoria crónica

Infarto de miocardio

Enfermedades obstétricas como la preeclampsia

Traumatismos

Glomerulonefritis membranoproliferativa

Están **ausentes** en las hiperfibrinólisis primarias

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia del Laboratorio de Respuesta Rápida: 45 min.

Área de Trombosis y Hemostasia Core: Un día laborable.

BIBLIOGRAFÍA

Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J ThrombHaemost*, 2005; 3:1894-1904.

Doolittle RF, Pandi L. Probing the beta-chain hole of fibrinogen with synthetic peptides that differ at their amino termini. *Biochemistry*, 2007; 46:10033-10038.

Soheir SA, Nigel SK, Greenberg ChS. D-dimer antigen: Current concepts and future prospects. *Blood*. 2009; 113(13):2878-87.

Lozano F. Reflexiones sobre el dímero-D y la enfermedad tromboembólica venosa. *Angiología*, 2005; 57(3):215-218. 5. Dempfle CE, Zips S, Ergul H, et al. The Fibrin Assay Comparison Trial (FACT): evaluation of 23 quantitative D-dimer assays as basis for the development of D-dimer calibrators. FACT study group. *ThrombHaemost*, 2001; 85:671-678.

Dempfle CE. Validation, calibration, and specificity of quantitative D-dimer assays. *Semin Vasc Med*, 2005; 5:315-320.

Greenberg CS, Devine DV, McCrae KM. Measurement of plasma fibrin D-dimer levels with the use of a monoclonal antibody coupled to latex beads. *Am J Clin Pathol*, 1987; 87:94-100.

Westgard JO, and Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC Press 1986.

Tumanova I, Serra J. New quantitative assay for D-Dimer. Method comparison study: standardization difficulties, Communication presented at the XIII International Congress on Fibrinolysis and Thrombolysis, Barcelona, June 24-28, 1996.

Nieuwenhuizen W. A Reference Material for Harmonisation of D-Dimer Assays, Thrombosis and Haemostasis. 1997; 77 (5): 1031-1033.

Jennings I, Woods TAL, Kitchen DP, Kitchen S, Walker ID. Laboratory D-Dimer measurement: Improved agreement between methods through calibration. *ThrombHaemost*. 2007;98: 1127-1135

Meijer P, Haverkate F, Kluft C, de Moerloose P, Verbruggen B, Spannagl M. A model for the harmonisation of test results of different quantitative D-Dimer methods. *ThrombHaemost*, 2006; 95: 567-572.

Villa P, Fernando F, Serra J, Faus H, Mira Y, Vaya A, Aznar J. Quantification of D-dimer using a new fully automated assay: its application for the diagnosis of deep vein thrombosis. *Haematologica*, 2000 May; 85(5): 520-4.

Bounameaux, H. Should the D-Dimer Cut-off Value Be increased in Elderly Patients Suspected of Pulmonary Embolism? *Thrombosis and Haemostasis*. 2001; 85:744

Control de Tratamiento anticoagulante oral por AVK (INR)

INFORMACIÓN CLÍNICA:

El objetivo del tratamiento anticoagulante oral con cumarinas es producir una anticoagulación controlada con el fin de mantener un máximo de protección antitrombótica. Estos fármacos anticoagulantes antagonizan el efecto de la vitamina K lo que conduce a la formación de precursores de factores vitamina K dependientes, proteína C y S que son biológicamente inactivos en hígado y plasma.

Un principio básico en el manejo de estos fármacos anticoagulantes es encontrar la dosis necesaria para obtener su efecto dentro de unos intervalos seguros y que varía en función de cada individuo, así como de la patología por la que se indica este tratamiento antitrombótico.

UTILIDAD CLÍNICA:

Monitorización del efecto anticoagulante de los fármacos AVK. La seguridad de este tratamiento (disminución de complicaciones hemorrágicas) y la eficacia del mismo (disminución de complicaciones trombóticas), dependen en buena medida de una determinación analítica correcta.

En cualquiera de las situaciones en que esté indicado el tratamiento, entre ellas:

Prevención primaria
➤ Fibrilación Auricular
➤ Prótesis valvulares mecánicas
➤ Prótesis valvulares biológicas
➤ Valvulopatía mitral
➤ IAM
Prevención secundaria
➤ IAM (prevención secundaria)
➤ Trombosis venosa con o sin Trombofilia asociada.
➤ ACV en ACxFA

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El efecto de las antivitaminas K es variable entre pacientes, por lo que las dosis eficaces deben indicarse tras la realización de un control analítico. Tradicionalmente, la prueba utilizada para el control del TAO es el tiempo de protrombina. El test se realiza añadiendo tromboplastina (extracto de tejidos con factor

tisular y fosfolípidos) a una muestra de plasma citratado recalcificado (método en un paso, one-stage), registrándose el tiempo de coagulación.

La sensibilidad de la tromboplastina a la reducción de los factores vitamina K dependientes inducida por AVK es una variable crítica en el test y depende de la naturaleza del reactivo. Algunas tromboplastinas son muy sensibles (detectan pequeñas reducciones de factores) mientras que otras son insensibles. Como consecuencia, los pacientes pueden recibir diferentes dosis de anticoagulante oral dependiendo de la tromboplastina utilizada.

Con el fin de evitar este efecto, actualmente la expresión del resultado del TP se realiza en forma de Ratio Internacional Normalizado (INR), que permite la corrección de ratio del tiempo de protrombina por un factor (ISI, Índice de Sensibilidad Internacional) que refleja la sensibilidad de la tromboplastina usada en el test.

$$INR = \left(\frac{TP_{paciente}}{TP_{normal\ medio}} \right)^{ISI}$$

Ventajas del sistema INR	Limitaciones del sistema INR
Independencia del reactivo.	Únicamente utilizable para el control del TAO.
Establecimiento de rangos terapéuticos uniformes, independientes del laboratorio o país.	Posible utilidad como factor pronóstico en hepatopatías (sistema MELD).
Comparación efectiva de los resultados de ensayos clínicos.	Precisión dependiente del ISI y efecto del coagulómetro sobre el reactivo.
Sencillo de monitorizar.	Parámetro calculado, con posibilidad de cálculo incorrecto (ISI y TP normal medio).
Teóricamente, mejor control con menos complicaciones y fracasos del tratamiento.	Interferencias en la determinación (A. Antifosfolípido).

VALORES DE REFERENCIA:

INR: 0.8-1.40

VALORES CRÍTICOS:

INR superior o igual a 5.0

TIEMPO DE RESPUESTA:

Área de Trombosis y Hemostasia Core: 1 día laborable.

Área de Trombosis y Hemostasia Urgente: 45 minutos

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Los valores del INR en pacientes con terapia anticoagulante tienen distintos rangos de efectividad y seguridad según la indicación clínica de la terapia antitrombótica; entre 2-3 (En Fibrilación Auricular, en prótesis metálicas en posición aórtica...), 2.5 a 3.5 (en prótesis metálicas en posición mitral, en síndrome antifosfolípido de alto riesgo...) e incluso rangos de 3.0-4.0 (prótesis metálicas tricuspideas...). Estos rangos se han establecido en función de la correcta prevención de la enfermedad tromboembólica con un riesgo hemorrágico espontáneo aceptable.

Valores superiores a un INR de 4.0 aumentan considerablemente el riesgo de hemorragia intracraneal, así como cifras inferiores a 2.0 aumentan exponencialmente el riesgo de cuan cuadro trombótico en pacientes con indicación de tratamiento anticoagulante oral.

Por otro lado, el INR puede utilizarse como uno de los criterios para graduar la gravedad de la cirrosis o disfunción hepática y como marcador de riesgo hemorrágico en pacientes con hemorragias masivas.

BIBLIOGRAFÍA:

Tripodi A, Arbin A, Chantarangkul V, Mannucci PM. Recombinant tissue factor as substitute for conventional thromboplastin in the prothrombin time test. *Thromb. Haemost.* 1992; 67(1): 42-45.

Rizza CR, Walker W. One-stage prothrombin time techniques. In: Bang NU, Beller FK, Deutsch E, Mammen EF, eds. *Thrombosis and bleeding disorders*. New York: Academic Press, 1971

Clinical and Laboratory Standards Institute. One Stage Prothrombin Time (PT) Test and Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Test; Approved Guideline – Second Edition, CLSI Document H47-A2; Vol. 28 No.

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, Foncuberta J, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. *Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología* 4ª Edición.2015

Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline, Document C28-A3; Vol. 28 No. 3

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, FoncubertaJ, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. *Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología* 4ª Edición.2015

Niveles anti -Xa HPBM

INFORMACIÓN CLÍNICA:

La Heparina es el fármaco antitrombótico utilizado con más frecuencia. La actividad biológica de este glicosaminoglicano sulfatado está en su capacidad de acelerar (hasta 2000 veces) el efecto inhibidor de la antitrombina sobre las proteasas de la coagulación. En los últimos años se ha demostrado que la LMWH, además de ser tan eficaz terapéuticamente como la UFH, tiene una vida media más larga

UTILIDAD CLÍNICA:

Las HBPM no prolongan el TTPA de forma habitual, por lo que su monitorización debe realizarse mediante la determinación de la actividad anti-factor X activado (anti-factorXa). La extracción puede realizarse a las 4 horas tras la administración de la última dosis (a partir de la primera administración de HBPM). Mediante este examen se determina el anti-factorXa en la sangre. La cantidad de factor Xa en la sangre disminuye en función de la cantidad de heparina plasmática.

En concreto, se recomienda la estrecha monitorización de los niveles de anti-factorXa en los siguientes grupos de pacientes:

Pacientes obesos

Embarazo

Ancianos de >80 años

Edad pediátrica

Insuficiencia Renal (recomendable monitorizar la actividad anti-Xa cuando se administra HBPM a dosis terapéuticas en pacientes con un aclaramiento de creatinina < 30 ml/min).

En pacientes bajo tratamiento con HPBM a dosis aparentemente adecuadas y con nuevo episodio de trombosis o episodios de sangrado moderado-grave.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

La heparina de bajo peso molecular (HBPM) se analiza como un complejo con la antitrombina presente en la muestra de plasma. Se mezcla el plasma que aporta HBPM con una cantidad fija de factor Xa y de un sustrato sensible al factor Xa. Se producen dos reacciones en competencia. Una es la inhibición del FXa por el complejo heparina-antitrombina y la otra es la rotura del sustrato por el FXa que genera color. La DO final o el incremento de DO/min son inversamente proporcionales a la concentración de heparina presente en el plasma.

REQUISITOS DEL PACIENTE

Estar bajo tratamiento o profilaxis antitrombótica con heparinas de bajo peso molecular, administrándose la última dosis 4 horas antes de la extracción analítica.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul con arandela negra.

VALORES DE REFERENCIA

Niveles profilácticos y terapéuticos a las 4 horas de la administración de HPBM:

Con dosis profilacticas: 0.2-0.5 UI/ml

Con dosis terapeuticas:

- Bemiparina 0,8-1,2 UI/mL
- Dalteparina 0,5-1,5 UI/mL
- Enoxaparina:
 - Pauta 1 mg/Kg/12h 0,6-1,0 UI/mL
 - Pauta 1,5 mg/Kg/24h 1,0-2,0 UI/mL
- Tinzaparina 0,5-1,5 UI/mL

>2.0 UI/mL elevado riesgo de sangrado .Valorar ajuste posológico.

Valores Críticos:

No aplica

TIEMPO DE RESPUESTA

Área Trombosis y Hemostasia Especial: Un día laborable.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La determinación de anti-factorXa, es el método de elección para determinar el rango terapéutico apropiado de HBPM o profiláctico en las situaciones espaciales antes mencionadas, donde las dosis prefijadas de HPBM no deben usarse sin esta monitorización.

BIBLIOGRAFÍA

Teien AN, et al. Assay of Heparin in Plasma using a Chromogenic Substrate, *Thromb. Res.* 1976; 8: 413-416.

Clinical and Laboratory Standards Institute/CLSI. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation and Molecular Haemostasis Assays; Approved Guideline – Fifth Edition, CLSI Document H21-A5; Vol. 28 No. 5.

Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation, *Am J. Clin. Pathol.* 1970; 53: 924-927.

Westgard JO, and Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC Press 1986.

Holm HA, Abildgaard U, Kalvenes S. Heparin Assays and Bleeding Complications in Deep Venous Thrombosis with Particular Reference to Retroperitoneal Bleeding, *Thromb. Haemost.* 1985; 53: 278-281

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, FoncubertaJ, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición.2015

Niveles Anti-XaRivaroxabán, Niveles anti-XaApixabán y Niveles Anti-XaEdoxabán

INFORMACIÓN CLÍNICA:

Los inhibidores directos del FXa son anticoagulantes que se unen al FXa sin la mediación de la antitrombina. Tras la unión, el FXa ya no puede contribuir al proceso de coagulación, por lo que se produce un efecto anticoagulante.

Existen varias indicaciones para las que estos anticoagulantes orales de acción directa están aprobados en la actualidad, como son la Fibrilación auricular no valvular, el tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa y su profilaxis tanto primaria como secundaria.

UTILIDAD CLÍNICA:

Existen circunstancias especiales en las cuales la medición de los efectos farmacodinámicos después de la administración terapéutica del anticoagulante, pueden ser necesarias en las siguientes situaciones:

Conocer si el paciente toma el anticoagulante.

Si se precisa una rápida reversión del efecto por complicaciones hemorrágicas, cirugías urgentes tratamientos que puedan incrementar el riesgo trombótico (por ejemplo, agentes fibrinolíticos).

En complicaciones tromboembólicas para conocer si se relaciona con incumplimientos del tratamientos o fallo terapéutico.

Determinar el momento óptimo del paso de un anticoagulante a otro. e) Reversión para cirugías programadas.

Valorar el riesgo de anticoagulación excesiva en casos de deterioro de la función renal o Hepática.

Valorar la dosificación en pacientes con pesos extremos.

Valorar el efecto anticoagulante en intentos de suicidios o intoxicaciones involuntarias.

Identificar posibles interacciones medicamentosas

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO:

El FXa en el plasma escinde a la protrombina para generar trombina, enzima responsable de la formación del coagulo de fibrina. En presencia de Rivaroxabán o Apixabán, se produce una competencia entre el mecanismo fisiológico y la inhibición directa del FXa por Rivaroxabán, Apixabán o Edoxabán. El ensayo cromogénico se basa en un principio similar: a partir de la adición de FXa en exceso a la mezcla formada por el plasma del paciente y el sustrato cromogénico específico para FXa, se producen simultáneamente dos reacciones:

a) hidrólisis del sustrato por parte del FXa

b) inhibición del FXa por Rivaroxaban o Apixaban presente en el plasma. Transcurrido el tiempo necesario para que se establezca el equilibrio de la reacción de competición, se mide a 405 nm la paranitroanilina liberada del sustrato cromogénico, que es inversamente proporcional a la concentración de la droga en el plasma. El ensayo puede realizarse en equipos automáticos (coagulómetros) o semiautomáticos (lectores de ELISA).

REQUISITOS DEL PACIENTE:

Estar bajo tratamiento o profilaxis antitrombótica con fármacos anticoagulantes anti-Xa(rivaroxabán o apixabán), y haber tomado el fármaco 3 horas antes (niveles pico) o 12 horas antes (niveles valle) en el caso de apixabán o 24 horas antes (niveles valle) en el caso de rivaroxabán.

REQUISITOS DE LA MUESTRA:

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul con arandela negra.

VALORES DE REFERENCIA:

Para Apixabán:

Apixaban 2.5 mg cada 12 horas:

Concentración máxima (2 h tras la toma):69 -221 ng/mL.

Concentración valle (12 h tras la toma):34-162 ng/mL.

Apixabán de 5 mg cada 12 h:

Concentración máxima (2 h tras la toma):91-321 ng/mL.

Concentración valle (12 h tras la toma):41-230 ng/mL.

Apixabán de 10 mg cada 12 h:

Concentración máxima (2 h tras la toma): 111-572 ng/mL.

Concentración valle (12 h tras la toma):41-335 ng/mL.

Para Rivaroxabán

Rivaroxabán 2.5 mg cada 12 h:

Concentración máxima (2-4h tras la toma):13-123 ng/mL.

Concentración valle (12h tras la toma):4.4-18 ng/mL.

Rivaroxabán 10 mg cada 24 h:

Concentración máxima (2-4h tras la toma):100-250 ng/mL.

Concentración valle (24h tras la toma):20-75 ng/mL.

Rivaroxabán 15mg cada 24 h:

Concentración máxima (2-4h tras la toma):157-321 ng/mL.

Rivaroxabán 20 mg cada 24 h:

Concentración máxima (2-4h tras la toma):110-440ng/mL.

Concentración valle (24h tras la toma):25-100 ng/mL.

Edoxabán 10 mg cada 24 horas:

Concentración máxima (2-4h tras la toma):222-284ng/mL.

Concentración valle (24h tras la toma):9-58 ng/mL.

Edoxabán 30 mg cada 24 horas:

Concentración máxima (2-4h tras la toma):60-120ng/mL.

Concentración valle (24h tras la toma):5-20 ng/mL.

Edoxabán 60 mg cada 24 horas:

Concentración máxima (2-4h tras la toma):120-250 ng/mL.

Concentración valle (24h tras la toma):10-40 ng/mL.

VALORES CRÍTICOS:

No aplica

TIEMPO DE RESPUESTA:

Área de Trombosis y Hemostasia Especial:15días

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

La medida puntual del efecto anticoagulante del fármaco en situaciones especiales puede: mejorar la seguridad y eficacia del producto, mejorar el cumplimiento del tratamiento, prevenir sobredosificaciones, orientarnos sobre la necesidad de tomar o no medidas urgentes en casos de hemorragias graves, intervenciones prioritarias u otras complicaciones.

BIBLIOGRAFÍA:

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, FoncubertaJ, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición.2015

Gorges IG, Patel MR, Peters GR, Moore KT, Mahaffey KW, Nestle CC, Halperin JL, Califf RM, Fox KA, Becker RC. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of rivaroxaban in patients with non-valvular atrial fibrillation: results from ROCKET AF. J Clin Pharmacol. 2014 Aug;54(8):917-27. doi: 10.1002/jcph.288. Epub 2014 Mar 26.

Brian J. Dale, Noel C. Chan and John W. Eikelboom Laboratory measurement of the direct oral anticoagulants; British Journal of Haematology Volume 172, Issue 3, pages 315–336, February 2016

Hillarp A and cols. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor apixaban on routine coagulation assays and anti-Xa assays. . Journal of Thrombosis and Haemostasis 2014

Tripodi A. Laboratory tests and the new oral anticoagulants. Thromb Res 2012; 130 (Suppl 1): S95-S97.

Miyares MA, Davis K. New oral anticoagulants: A review of laboratory monitoring options and reversal agents in the hemorrhagic patient. Am J Health-SystPharm 2012; 69: 1473-84.

Niveles Anti-IIaDabigatrán

INFORMACIÓNCLÍNICA

Los inhibidores directos de la trombina (DTI) son anticoagulantes que se unen a la trombina sin la mediación de la antitrombina. El etexilato de dabigatran es un profármaco que, una vez absorbido en el tracto gastrointestinal, se convierte en su forma activa, dabigatran. El dabigatran es un DTI oral cuyo uso se ha aprobado como alternativa a la warfarina para varias indicaciones terapéuticas, como son la Fibrilación auricular no valvular, el tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa y su profilaxis tanto primaria como secundaria.

UTILIDAD CLÍNICA

Existen circunstancias especiales en las cuales la medición de los efectos farmacodinámicos después de la administración terapéutica del anticoagulante de acción directa, como las que se detallan a continuación:

Conocer si el paciente toma correctamente el anticoagulante.

Si se precisa una rápida reversión del efecto por complicaciones hemorrágicas, cirugías urgentes o tratamientos que puedan incrementar el riesgo trombótico (por ejemplo, agentes fibrinolíticos).

En complicaciones tromboembólicas para conocer si se relaciona con incumplimientos del tratamientos o fallo terapéutico.

Determinar el momento óptimo del paso de un anticoagulante a otro. e)

Reversión para cirugías programadas.

Valorar el riesgo de anticoagulación excesiva en casos de deterioro de la función renal o hepática,

Valorar la dosificación en pacientes con pesos extremos.

Valorar el efecto anticoagulante en intentos de suicidios o intoxicaciones involuntarias.

Identificar posibles interacciones medicamentosas

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El ensayo usado para determinar los niveles activos de dabigatrán en plasma es una prueba de tiempo de trombina modificada (diluida). El plasma citratado del paciente se diluye con un pool de plasma normal para reducir las interferencias de variables preanalíticas. A continuación, se añade a la muestra del paciente diluida una concentración fija de trombina bovina reconstituida, lo que activa la cascada de la coagulación y convierte el fibrinógeno en fibrina. El tiempo de coagulación asociado en segundos se mide en el autoanalizador. Posteriormente se traza una curva de referencia de dabigatran a partir de los resultados de tiempo de coagulación de un patrón de plasma de referencia conocido. La concentración de dabigatran en las muestras de plasma de los pacientes se determina comparando los valores de tiempo de coagulación con la curva de referencia.

REQUISITOS DEL PACIENTE

Estar bajo tratamiento o profilaxis antitrombótica con fármacos anticoagulantes anti-IIa (Dabigatrán), y haber tomado el fármaco 3 horas antes (niveles pico) o 12 horas antes (niveles valle).

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul con arandela negra.

VALORES DE REFERENCIA

Dabigatrán de 220 mg cada 24 h:

Concentración máxima (2 h tras la toma): 62-440 ng/mL.

Concentración valle (24 h tras la toma): 10-96 ng/mL.

Dabigatrán de 110 mg cada 12 h:

Concentración máxima (2 h tras la toma): 52-275 ng/mL.

Concentración valle (12 h tras la toma): 28-155 ng/mL.

Dabigatrán de 150 mg cada 12 h:

Concentración máxima (2 h tras la toma): 64-440 ng/mL.

Concentración valle (12 h tras la toma): 31-225 ng/mL.

VALORES CRÍTICOS

No aplica.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: 15 días

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La medida puntual del efecto anticoagulante del fármaco en situaciones especiales puede: mejorar la seguridad y eficacia del producto, mejorar el cumplimiento del tratamiento, prevenir sobredosificaciones, orientarnos sobre la necesidad de tomar o no medidas urgentes en casos de hemorragias graves, intervenciones prioritarias u otras complicaciones.

BIBLIOGRAFÍA

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, Foncuberta J, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición.2015

Douxfls J1, Mullier F, Robert S, Chatelain C, Chatelain B, Dogné JM. Impact of dabigatran on a large panel of routine or specific coagulation assays. Laboratory recommendations for monitoring

of dabigatran etexilate. *ThrombHaemost.* 2012 May; 107(5):985-97. doi: 10.1160/TH11-11-0804. Epub 2012 Mar 22.

Brian J. Dale, Noel C. Chan and John W. Eikelboom Laboratory measurement of the direct oral anticoagulants; *British Journal of Haematology* Volume 172, Issue 3, pages 315–336, February 2016

Tripodi A. Laboratory tests and the new oral anticoagulants. *Thromb Res* 2012; 130 (Suppl 1): S95-S97.
7. Miyares MA, Davis K. New oral anticoagulants: A review of laboratory monitoring options and reversal agents in the hemorrhagic patient. *Am J Health-SystPharm* 2012; 69: 1473-84.

TrombopeniaInducidaporheparina –TIH IgG

INFORMACIÓN CLÍNICA

La trombocitopenia inducida por heparina (TIH) es una enfermedad provocada por un inmunocomplejo, que puede causar elevada morbilidad y mortalidad en pacientes que reciben terapia con heparina. La TIH es una enfermedad paradójica ya que la administración de un anticoagulante para la prevención de trombosis, puede provocar un riesgo muy elevado de complicaciones trombóticas venosas y/o arteriales. Se sospecha la existencia de TIH, cuando los pacientes tratados con heparina no fraccionada (HNF) o con heparina de bajo peso molecular (HBPM) muestran un descenso del recuento de plaquetas superior al 50% del nivel basal, habitualmente entre el quinto y el décimo día del inicio del tratamiento. También se han descrito casos con un inicio más temprano o más tardío. El diagnóstico rápido es muy importante porque de confirmarse un cuadro de TIH, el tratamiento con heparina debe suspenderse y usarse anticoagulantes alternativos.

La enfermedad de TIH de tipo II, el tipo inmunoalérgico, está causada por la aparición de anticuerpos activadores de las plaquetas, dirigidos principalmente contra el factor plaquetario 4 (FP4), cuando éste se encuentra formando un complejo con la heparina (FP4/H) 4. Estos anticuerpos son la causa primaria de la inducción de la trombosis venosa y arterial. La actual hipótesis de trabajo es que una exposición temprana del individuo a los complejos de FP4, quizás inducida por factores endógenos no relacionados con la heparina, causaría la agregación del FP4 y la activación de las células B mediante las células T. En otra época, más tardía, estas células B podrían activarse de nuevo, transitoriamente, en presencia de agregados de FP4 inducidos por el tratamiento con heparina. La evolución de la patología está principalmente asociada con los anticuerpos dependientes de heparina del tipo IgG. Sin embargo, la presencia de anticuerpos únicamente del tipo IgM y/o IgA se ha observado en algunos pacientes, incluyendo casos con complicaciones trombóticas

UTILIDAD CLÍNICA

Para el diagnóstico y seguimiento del Síndrome de Trombopenia inducida por heparina.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El ensayo HIT-IgG (PF4-H) es un inmunoensayo quimioluminiscente de dos pasos constituido por partículas magnéticas recubiertas con FP4 en complejo con polivinil sulfonato (PVS) que capturan los anticuerpos anti-FP4/heparina, si estos están presentes en la muestra. Tras una incubación, separación magnética y lavado, se añade un trazador que consiste en un anticuerpo anti-IgG humana marcado con isoluminol que se puede unir a las IgG anti-FP4/heparina capturadas en las partículas. Tras una segunda incubación, separación magnética y lavado, se añaden reactivos que inician la reacción luminiscente y la luz emitida se mide con el sistema óptico del autoanalizador en unidades relativas de luz (RLU). Las RLU son directamente proporcionales a la concentración de anticuerpos IgG anti-FP4/ heparina que contiene la muestra.

REQUISITOS DEL PACIENTE

Estar bajo tratamiento con Heparinas en el momento del estudio o al menos haberlas recibido 48 horas antes.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato): Tubo con tapón azul con arandela negra

VALORES DE REFERENCIA

<1.0 U/mL, se interpreta como resultado negativo

≥1.0 U/ml, se interpreta como resultado positivo

VALORES CRÍTICOS

No aplica

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: 30 días

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El análisis de anticuerpos anti-FP4/H combinado con una apropiada historia clínica constituyen una gran ayuda en el manejo de los pacientes con sospecha de TIH. Particularmente, un resultado negativo de anticuerpos anti-FP4/H puede dar soporte a la decisión clínica de descartar la presencia de TIH y de continuar con el tratamiento con heparina.

Un resultado débilmente positivo de anticuerpos antiPF4/H puede indicar que los anticuerpos no llegarán a activar a las plaquetas, mientras que una fuerte positividad puede indicar un alto riesgo de TIH. Antes de proceder con la confirmación o exclusión del diagnóstico de TIH debe realizarse siempre una correlación con la clínica del paciente, teniendo en cuenta el resultado de las pruebas de estas pruebas de laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

Warkentin TE et al. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. N Eng J Med. 1995;332(1):1330-1335

Greinacher A. Heparin-Induced Thrombocytopenia. J ThrombHaemost. 2009;7 (supl. 1):9-12

Arepally GM, Ortel TL. Clinical practice. Heparin-induced thrombocytopenia. N Engl J Med 2006; 355:809-817

Greinacher A et al. Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a molecular PF4-heparin complex as the major antigen. ThrombHaemost. 1994;71(2):247-251

Amiral J et al. Pathogenicity of IgA and/or IgM antibodies to heparin-PF4 complexes in patients with heparin-induced thrombocytopenia. Br J Haematol. 1996;92(4):954-959

Richmond JY, McKinney RW eds. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4th Edition. U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service;1999

Clinical and Laboratory Standards Institute/CLSI. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline Fifth Edition, CLSI Document H21-A5; Vol. 28 No. 5

Clinical and Laboratory Standards Institute/CLSI. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens: Third Edition, CLSI Document H18-A3; Vol. 24 No. 38

Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation. Am. J. Clin. Pathol. 1970; 53:924-927

Westgard JO and Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Process. AACC Press;1986

Detección de anticuerpos anti-FP4 ELISA

INFORMACIÓN CLÍNICA

Las trombocitopenias inducidas por la heparina (TIH) se clasifican habitualmente en dos tipos: – las TIH de tipo I, debidas al efecto trombocitopénico de la heparina, – las TIH de tipo II, debidas a una reacción inmuno-alérgica . Las TIH de tipo II constituyen una complicación rara, pero grave, de los tratamientos con heparina. Esto ocurre con mayor frecuencia en pacientes que reciben heparinas no fraccionadas (HNF) que en los que reciben heparinas de bajo peso molecular (HBPM) . Se caracterizan por una caída brusca del recuento plaquetario entre el quinto y el decimocuarto día tras iniciar el primer tratamiento con heparina . En caso de un tratamiento posterior con heparina, este plazo puede ser más corto . Con frecuencia, van asociadas a trombosis venosas o arteriales . Al interrumpir el tratamiento y si no se producen complicaciones, el recuento plaquetario se normaliza en 4 o 7 días . Se ha demostrado que en aproximadamente el 85 % de los casos de TIH aparecen anticuerpos dirigidos contra los complejos de heparina y de PF4 . Se trata en la mayoría de los casos de inmunoglobulinas IgG pero pueden ser igualmente de clase IgA o IgM. Si bien su presencia no da lugar obligatoriamente a la aparición de trombocitopenia (2, 9), constituyen una señal de alerta. Aproximadamente el 15 % de los pacientes no presentan anticuerpos antiheparina-PF4. La trombopenia inducida se asocia con la presencia de anticuerpos dirigidos contra otros compuestos, entre los cuales se encuentran, en especial, la interleucina 8 y el neutrophil-activating peptide2 (NAP-2).

En casos muy poco frecuentes se han descrito en relación con las vacunas de vectores no replicantes de adenovirus (Vaxzevria® de AstraZeneca y vacuna COVID-19 de Janssen) casos de trombocitopenia asociada a trombosis, habitualmente en lugares inusuales. El periodo de aparición de los síntomas suelen oscilar entre los 3-21 días tras la vacunación, aunque se han descrito casos hasta 28 días después.

Los eventos trombóticos descritos habitualmente son de localización inusual (trombosis venosa cerebral, trombosis de localización esplácnica,) aunque también se han dado casos de ETEV más habitual como TVP o TEPA. En estos casos el diagnóstico se apoya en la detección de anticuerpos FP4 por este métodos

UTILIDAD CLÍNICA

Para el diagnóstico y seguimiento del Síndrome de Trombopenia inducida por heparina.

Para el diagnóstico de la Trombocitopenia inmune protrombótica asociada a la vacunación (VITT)

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Es un método ELISA parcialmente automatizado con el siguiente fundamento:

Un soporte plástico recubierto de complejos de heparina-PF4 fija los anticuerpos anti-heparina-PF4 eventualmente presentes en la muestra a probar. Estos anticuerpos fijados son puestos en evidencia con la ayuda de un inmunoconjugado constituido de anticuerpos anti-IgG humanas acoplados a la peroxidasa, que se fija a los anticuerpos del paciente. La peroxidasa ligada se mide por su actividad

sobre el sustrato TMB. La intensidad de la coloración producida tras detener la reacción con un ácido fuerte, está en relación con la concentración inicial de autoanticuerpos presente en la muestra.

REQUISITOS DEL PACIENTE

Estar bajo tratamiento con Heparinas en el momento del estudio o al menos haberlas recibido 48 horas antes.

Haber recibido vacunas de vectores no replicantes de adenovirus contra la COVID -19 (Vaxzevria® de AstraZeneca y vacuna COVID-19 de Janssen) y presentar trombopenia o trombosis según el caso.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato): Tubo con tapón azul con arandela negra

VALORES DE REFERENCIA

Los resultados se informaran cualitativamente como negativo o positivo.

VALORES CRÍTICOS

No aplica

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: 30 días

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se consideran positivas las pruebas realizadas según lo indicado, cuyo valor de absorbancia sea superior a x % del obtenido por el usuario para el Reactivo de referencia. Se consideran normales, las muestras cuyo valor de absorbancia sea inferior o igual a x % del obtenido por el usuario para el Reactivo de referencia. No obstante, ya que el aumento de la concentración de anticuerpos antiheparina-PF4 puede ser rápido, en caso de dudas, se recomienda repetir el análisis con muestras posteriores.

BIBLIOGRAFIA

Warkentin TE et al. Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low-molecular-weight heparin or unfractionated heparin. N Eng J Med. 1995;332(1):1330-1335

Greinacher A. Heparin-Induced Thrombocytopenia. J ThrombHaemost. 2009;7 (supl. 1):9-12

Arepally GM, Ortel TL. Clinical practice. Heparin-induced thrombocytopenia. N Engl J Med 2006; 355:809-817

Greinacher A et al. Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a molecular PF4-heparin complex as the major antigen. ThrombHaemost. 1994;71(2):247-251

Amiral J et al. Pathogenicity of IgA and/or IgM antibodies to heparin-PF4 complexes in patients with heparin-induced thrombocytopenia. Br J Haematol. 1996;92(4):954-959

Richmond JY, McKinney RW eds. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4th Edition. U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service;1999

Clinical and Laboratory Standards Institute/CLSI. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline Fifth Edition, CLSI Document H21-A5; Vol. 28 No. 5

Clinical and Laboratory Standards Institute/CLSI. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens: Third Edition, CLSI Document H18-A3; Vol. 24 No. 38

Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation. Am. J. Clin. Pathol. 1970; 53:924-927

Westgard JO and Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Process. AACC Press;1986

Antitrombina III

INFORMACIÓN CLÍNICA

La antitrombina es una alfa₂glicoproteína de síntesis hepática que pertenece a una familia de proteínas llamadas serpinas (inhiben a las serínproteasas) que no sólo neutraliza a la trombina activada, sino también a otras serínproteasas como los factores IXa, Xa, XIa y XIIa.

La heparina no fraccionada mejora la capacidad de la antitrombina para neutralizar la trombina activada unas mil veces su capacidad normal. Las heparinas fraccionadas de bajo peso molecular, retrasan el proceso de coagulación produciendo cambios alostéricos en la molécula de antitrombina que facilitan la neutralización del factor Xa.

El déficit de antitrombina puede ser congénito o adquirido. Los déficits congénitos pueden ser cuantitativos o cualitativos (variantes disfuncionales, pero en cantidad normal). Suponen el 1% de todos los casos de TEV diagnosticados a cualquier edad y el 4-5% de los TEV ocurridos a menores de 40 años.

Los déficits adquiridos pueden ser por defectos de síntesis: Hepatopatía, tratamiento con estrógenos; por aumento de pérdidas: Síndrome nefrótico, enteropatía pierde proteínas; o por consumo: CID (coagulación intravascular diseminada), heparina, episodio trombótico agudo.

UTILIDAD CLÍNICA

Dentro del estudio de trombofilia, CID y en pacientes embarazadas.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Espectrofotométrico. El plasma del paciente se mezcla con un reactivo que contiene heparina y un sustrato medido (el factor Xa de la coagulación) para que reaccione. El exceso de Xa reacciona con un sustrato cromogénico para producir una solución coloreada. La intensidad de color es inversamente proporcional a la actividad de la antitrombina de la muestra.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul.

VALORES DE REFERENCIA

Antitrombina III - Sangre (Test)	De 0 a 30 días (32,80 - 62,80)
	De 1 mes a 5 meses (29,00 - 120,00)
	De 6 meses a 11 meses (63,00 - 121,80)
	De 1 año a 5 años (60,50 - 128,30)
	De 6 años a 10 años (64,20 - 136,40)
	De 11 años a 17 años (69,10 - 135,90)
	De 18 a 150 años (70,00 - 120,00)

VALORES CRÍTICOS

AT inferior a 50%

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Niveles disminuidos de antitrombina se ven en:

- Déficits congénitos.
- Neonatos (los valores se normalizan a los 6 meses).
- Insuficiencia hepática.
- Tratamiento con estrógenos.
- Síndrome nefrótico.
- Enfermedad inflamatoria intestinal.
- CID.

Niveles elevados de antitrombina no tienen interés clínico.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Core: 1 día laborable.

BIBLIOGRAFÍA

Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. J ThrombHaemost 2007; 5(Suppl. 1):95-101.

Esmon CT. Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. Semin ThrombHemost 2006; 32(Suppl. 1):49-60.

Franchini M, Montagnana M, Tarhjer G, Lippi G. Reduced von Willebrand factor-cleaving protease levels in secondary thrombotic microangiopathies and other diseases. Semin ThrombHaemost 2007; 33:787-95.

Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. Semin ThrombHaemost 2005; 31:381-92.

Mackman R, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. ArteriosclerThromb Vas Biol 2007; 27:1687-93.

Morser J, Gabazza EC, Myles T, Leung LLK. What has been learnt from the thrombin-activable fibrinolysis inhibitor-deficient mouse? J ThrombHaemost 2010; 8:868-76.

Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: ¿Is GPVI the central receptor? Blood 2003; 102:449-61.

Pozgajová M, Sachs UJH, Hein L, Nieswandt B. Reduced thrombus stability in mice lacking the α_2A -adrenergic receptor. Blood 2006; 108:510-4.

Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanism of the fibrinolysis system. J ThrombHaemost 2009; 7:4-13.

Vives Corrons JL, Albareda S, Flandrin G, Héller S, Horvath K, Houwen B, et al. Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: Control material. Clin Chem Lab Med 2004; 42:922-6

Zwicker JJ, Trenor CC, Furie BC, Furie B. Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation. ArteriosclerThrombVascBiol 2011; 31:728-33.

Proteína C

INFORMACIÓN CLÍNICA

La proteína C es una glucoproteína sintetizada en el hígado, de efecto proteasa y dependiente de la vitamina K que se activa por un cofactor proteico, la trombomodulina. La trombomodulina se desprende del endotelio vascular e inhibe los factores V y VII de la coagulación, actuando como un anticoagulante fisiológico.

El déficit de proteína puede ser congénito o adquirido. Los déficits congénitos pueden ser cuantitativos o cualitativos (variantes disfuncionales, pero en cantidad normal).

Los déficits adquiridos pueden ser por defectos de síntesis: Déficit de vitamina K, Hepatopatía; o por consumo: CID (coagulación intravascular diseminada), neoplasias, episodio trombótico agudo.

UTILIDAD CLÍNICA

Estudios de trombofilia de cara a establecer el riesgo trombótico de ETEV en forma de eventos primarios como secundarios.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Proteína C Cromogénica (Funcional): Método Cromogénico. El plasma del paciente se mezcla con un reactivo que contiene heparina y un sustrato medido (el factor Xa de la coagulación) para que reaccione. El exceso de Xa reacciona con un sustrato cromogénico para producir una solución coloreada. La intensidad de color es inversamente proporcional a la actividad de la antitrombina de la muestra.

Proteína C coagulativa (anticoagulante) Por método coagulativo que mide la actividad funcional de la proteína C y que se basa en la prolongación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) en presencia de proteína C activada. La utilización del TTPA para medir el efecto de la proteína C activada se debe a su sensibilidad a los niveles de Factor V y Factor VIII. La proteína C de la muestra es activada por el Protac , el cuál es un rápido activador invitro de esta proteína derivado del veneno de la culebra americana CopperheadAgkistrodomContortrixContortrix

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

Los aplicables al estudio de trombofilia.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul.

VALORES DE REFERENCIA

Proteína C Coagulativa	De 0 a 30 días (29,70 - 114,60)
	De 1 mes a 5 meses (28,10 - 127,80)
	De 6 meses a 11 meses (43,70 - 151,30)
	De 1 año a 5 años (61,00 - 143,50)
	De 6 años a 10 años (39,30 - 170,30)
	De 11 años a 17 años (65,80 - 126,60)
	De 18 a 150 años (70,00 - 150,00)
Proteína C Cromogénica	De 0 a 30 días (61,00 - 108,00)
	De 2 mes a 5 meses (48,00 - 126,50)
	De 6 meses a 11 meses (63,00 - 138,90)
	De 1 año a 5 años (53,00 - 134,90)
	De 6 años a 10 años (45,90 - 153,50)
	De 11 años a 17 años (72,30 - 155,10)
	De 18 a 150 años (80,00 - 150,00)

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Niveles disminuidos de proteína C se ven en:

Déficits congénitos.

Insuficiencia hepática.

Déficit de vitamina K.

CID.

Niveles elevados de proteína C no tienen interés clínico.

TIEMPO DE RESPUESTA

Trombosis y Hemostasia Especial: 30 días

BIBLIOGRAFÍA

Margeti S. Laboratory investigation of thrombophilia. J Med Biochem 2014; 33(1):28-11.2014

Nicolaides A. The Case Against Routine Screening for Thrombophilia. Dis Mon 2010; 56(10): 569-73. Acceso 26 de Julio 2014. 19. Khor B, Van Cott E. Laboratory Evaluation of Hypercoagulability. Clin Lab Med 2009; 29(2): 339–66. Acceso 10 de julio 2014.

Cohoon K, Heit J. Inherited and Secondary Thrombophilia. Circulation 2014; 129(2):254-7. Agosto 2014.

Middeldorp S. Evidence-based approach to thrombophilia testing. J Thromb Thrombolysis 2011; 31(3):275–81. Acceso 16 de julio 2014.

Baglin T, et. al. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. Br J Haematol 2010; 149(2):209–20. Acceso 25 de agosto 2014. Disponible

Galioto NJ, Danley DL, Van Maanen RJ. Recurrent Venous Thromboembolism. Am Fam Physician 2011; 83(3):293-300.

Silvey M, Carpenter S. Inherited Thrombophilia in Children. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care 2013; 43(7):163-68.

Maqbool S, et. al. Protein-C deficiency presenting as pulmonary embolism and myocardial infarction in the same patient. Thromb J 2013; 11:19. Acceso 21 de junio 2014.

Román González A, et. al. Paciente con deficiencia de proteína C y múltiples trombosis: reporte de caso. Iatreia 2007; 20(3):308-13.

Vives Corrons JL, Albareda S, Flandrin G, Héller S, Horvath K, Houwen B, et al. Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: Control material. Clin Chem Lab Med 2004; 42:922-6

Walker P, Gregg A. Screening, Testing, or Personalized Medicine: ¿Where do Inherited Thrombophilias Fit Best? ObstetGynecol Clin N Am 2010; 37(1):87–107.

Proteína S

INFORMACIÓN CLÍNICA

También una glicoproteína hepática vit. K-dependiente, pero a diferencia de PC con funciones de cofactor y no de enzima (al carecer de centro activo) en la neutralización del FVa y FVIIIa a través de la proteína C activa (PCa) y el FV. Tampoco requiere activación; sin embargo, únicamente será funcional como cofactor de la PCa su fracción libre (PSL) que oscila alrededor del 40% del total. El otro 60% forma complejos con C4b bindingprotein (transportador del sistema del complemento) que la coloca temporalmente “fuera de servicio”. Este equilibrio reversible significa que a mayor concentración del C4bBP (reactante de fase aguda), menor disponibilidad de PSL.

UTILIDAD CLÍNICA

Para el diagnóstico y seguimiento de los déficits de Proteína S que confieren riesgo trombótico:

Déficit congénito de proteína S

Desde 1984 se vienen describiendo familias con déficit y tendencia al TEV debidas a múltiples polimorfismos en su gen. Sin embargo, dada la variabilidad de sus niveles que se atribuyen a factores exógenos no se puede conocer bien su prevalencia en población sana (libre de TEV); hasta el 1% de la población sana podría registrar algún descenso que se comporta como un débil factor de riesgo (x2) aunque existen también familias con trombosis que sufren una deficiencia clínicamente dominante (más infrecuente y grave) (riesgo = x 5-10 muy similar al producido por el déficit de la proteína C). Se distinguen los siguientes tipos de déficits:

Tipo I: cuantitativo o real (molécula descendida por cualquier método) y el más frecuente. La PSL desciende aún más que la PS Total (PST)

Tipo II: déficit cualitativo (variantes disfuncionales de PS) ya que la PS antigénica es normal pero su molécula exhibe actividad cromogénica y/o coagulométrica mermadas

Tipo III: ausencia de PS libre (PSL)

En conjunto, representa también un 2% de casos de tromboembolismo al azar.

Déficit adquirido de proteína S

Las mismas causas que producen el déficit adquirido de PC con algunas singularidades; a saber:

- se reduce llamativamente en la gestación, especialmente su fracción libre
- el uso de estrógenos produce una situación similar
- los procesos inflamatorios conducirán a una PSL descendida por aumento del C4bBP con PST normal
- dada su mayor vida media, se producen menos casos de necrosis cutánea al inicio del tratamiento con cumarínicos en caso de déficit.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Proteína S libre:

Destacan como métodos la nefelometría o inmunturbidimetria. Estos pueden aumentar su especificidad usando anticuerpos monoclonales anti-proteína S adsorbidos a la superficie plástica.

La presencia de Proteína S libre se determina midiendo el incremento de turbidez debido a la aglutinación de dos reactivos látex. La C4BP adsorbida sobre el primer reactivo de látex reacciona con una alta afinidad con la proteína S libre del plasma del paciente en presencia de iones de calcio. La proteína S libre unida a al C4BP del látex provoca la aglutinación del segundo reactivo de látex, el cual está recubierto con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína S humana. El grado de aglutinación será directamente proporcional a la concentración de proteína S libre en el plasma problema.

Proteína S anticoagulante:

Con la proteína S se suele emplear un método coagulométrico automatizado, basado en el TTPA o en el TP. Como en dosificación factorial empleamos un plasma deficiente en PS al que se le activa su PC con Protac® y se le mide el alargamiento generado en sus tiempos de coagulación por comparación con el valor basal, midiendo: TP si se añade tromboplastina y

TTPA si se añade cefalina.

La proteína S se calibra a partir de un plasma estándar (actividad conocida). Haremos tantos test (tipo TP o TTPA) como plasmas a estudiar (calibradores, pacientes y controles).

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

Los aplicables al estudio de trombofilia.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul.

VALORES DE REFERENCIA

Proteína S anticoagulante - Sangre (Test)	De 0 días a 30 días (29,00 - 115,20)
	De 1 meses a 5 meses (33,30 - 153,90)
	De 6 meses a 11 meses (51,80 - 138,40)
	De 1 años a 5 años (60,20 - 148,80)
	De 6 años a 10 años (66,50 - 161,50)
	De 11 años a 17 años (52,50 - 147,10)
	De 18 años a 150 años (60,00 - 150,00)
Proteína S libre - Sangre (Test)	De 0 a 30 días (61,00 - 108,00)
	De 2 mes a 5 meses (48,00 - 126,50)
	De 6 meses a 11 meses (63,00 - 138,90)
	De 1 año a 5 años (53,00 - 134,90)
	De 6 años a 10 años (61,50 - 141,70)
	De 11 años a 17 años (61,40 - 130,70)
	De 18 años a 45 años (65,00 - 150,00) varones
	De 18 años a 150 (55,00 - 150,00) mujeres
	De 45 años a 150 (75,00 - 150,00) varones

VALORES CRÍTICOS

No aplica

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: 30 días.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Niveles disminuidos de proteína S se ven en:

Déficits congénitos o adquiridos.

-Insuficiencia hepática.

-Déficit de vitamina K.

-CID.

Niveles elevados de proteína S no tienen interés clínico.

BIBLIOGRAFÍA

Margeti S. Laboratory investigation of thrombophilia. J Med Biochem 2014; 33(1):28-11.2014

Nicolaides A. The Case Against Routine Screening for Thrombophilia. Dis Mon 2010; 56(10): 569-73. Acceso 26 de Julio 2014. 19. Khor B, Van Cott E. Laboratory Evaluation of Hypercoagulability. Clin Lab Med 2009; 29(2): 339–66.

Cohoon K, Heit J. Inherited and Secondary Thrombophilia. Circulation 2014; 129(2):254-7. Agosto 2014.

Middeldorp S. Evidence-based approach to thrombophilia testing. J Thromb Thrombolysis 2011; 31(3):275–81.

Baglin T, et. al. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. Br J Haematol 2010; 149(2):209–20.

Galioto NJ, Danley DL, Van Maanen RJ. Recurrent Venous Thromboembolism. Am Fam Physician 2011; 83(3):293-300.

Silvey M, Carpenter S. Inherited Thrombophilia in Children. CurrProblPediatrAdolesc Health Care 2013; 43(7):163-68.

Maqbool S, et. al. Protein-C deficiency presenting as pulmonary embolism and myocardial infarction in the same patient. Thromb J 2013; 11:19.

Román González A, et. al. Paciente con deficiencia de proteína C y múltiples trombosis: reporte de caso. Iatreia 2007; 20(3):308-13.

Vives Corrons JL, Albareda S, Flandrin G, Héller S, Horvath K, Houwen B, et al. Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: Control material. Clin Chem Lab Med 2004; 42:922-6

Walker P, Gregg A. Screening, Testing, or Personalized Medicine: ¿Where do Inherited Thrombophilias Fit Best? ObstetGynecol Clin N Am 2010; 37(1):87–107.

Anticoagulante lúpico

INFORMACIÓN CLÍNICA

Dentro de la definición de anticuerpos antifosfolípidos se engloban una familia heterogénea de anticuerpos que reaccionan frente a epítomos de complejos proteína-fosfolípidos con carga aniónica. Forman parte de los mismos el anticoagulante lúpico y los anticuerpos anticardiolipina.

Los dos anticuerpos representativos del grupo se caracterizan por las alteraciones en los tests de laboratorio. El anticoagulante lúpico interfiere con una o más reacciones de la coagulación in vitro que dependen de complejos proteína-fosfolípidos. Los anticuerpos anticardiolipina se identifican con técnicas de enzoinmunoensayo o radioinmunoensayo.

El determinante antigénico en los anticuerpos anticardiolipina y en el anticoagulante lúpico se ha identificado como correspondiente a la β 2-glucoproteína I, una proteína plasmática que fija fosfolípidos

y con débil actividad anticoagulante. Sin embargo, otras proteínas plasmáticas pueden fijar fosfolípidos y representar el sitio de unión del anticuerpo, entre ellas, la protrombina, anexina V, proteína C, proteína S, trombomodulina y quinínógenos de alto peso molecular.

UTILIDAD CLÍNICA

Papel patogénico en la enfermedad tromboembólica. El síndrome antifosfolípido es un ejemplo de enfermedad tromboembólica mediada por autoanticuerpos.

Marcador protrombótico: Existen múltiples estudios y evidencias de su papel en la patogenia del proceso trombótico, los anticuerpos antifosfolípido constituyen marcadores de un síndrome protrombótico con una patogenia multifactorial, posiblemente autoinmune.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

La detección es cualitativa (se detecta o no se detecta).

No existe ningún test aislado que tenga una sensibilidad del 100% para el diagnóstico y según indicaciones internacionales se recomienda, para aumentar la misma, realizar al menos dos tipos diferentes de pruebas.

Dentro de un mismo tipo de test diagnóstico hay variabilidad en cuanto a la sensibilidad y especificidad del mismo. En esta variabilidad influye por un lado la composición de fosfolípidos en cuanto a cantidad de los mismos y, por otro, en cuanto al tipo de fosfolípido. Según algunas recomendaciones, dentro de un mismo test se deberían utilizar más de un reactivo.

La determinación del anticoagulante lúpico está sujeta a variaciones importantes en la fase preanalítica que sobre todo tienen que ver con la cantidad de plaquetas en la muestra a analizar.

Una vez realizado el diagnóstico de anticoagulante lúpico, debe confirmarse al menos en las 12 semanas posteriores con una nueva determinación.

El fundamento de los test diagnósticos in vitro es la realización de pruebas coagulométricas dependientes de fosfolípidos y las modificaciones que ocurren en estas pruebas al variar la concentración de fosfolípidos.

Criterios diagnósticos:

Prolongación de un test de coagulación dependiente de fosfolípidos: SilicaClotting Time sensible y tiempo del veneno de víbora Russel.

Evidencia mediante pruebas de mezclas de la naturaleza inhibitoria del mismo.

Confirmación de la dependencia de fosfolípidos: neutralización con mayor concentración de fosfolípidos: Silicaclotting time confirmatorio y tiempo del veneno de víbora Russel plaquetario.

Ausencia de inhibidor específico frente a un factor de la coagulación.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No estar tomando fármacos tipo anticoagulantes orales de acción directa ni recibiendo Heparina No Fraccionada. Así mismo el paciente no debe presentar una hiperbilirrubinemia superior a 30 mg/dL o una hipertigliceridemia superior a 750 mg/dL.

En caso de tratamiento con anticoagulantes orales tipo antivitaminas K, se podrá realizar la técnica con seguridad hasta un valor de INR de 3.5 realizando una dilución previa en el caso de la prueba del Veneno de víbora de Russel de 100 µL de plasma del paciente con 300 µL de plasma de control normal, para evitar falsos positivos. Con niveles de INR superiores a 3,5 no está indicado realizar esta determinación, por alto riesgo de falsos positivos incluso con el procesamiento de la muestra antes comentado.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul sometido a doble centrifugación.

VALORES DE REFERENCIA

SilicaClotting Time Confirmatorio: Ratio de ratios (0.5 -1.20)

Veneno de Víbora de Russel sensible: Ratio de ratios (0.5 -1.20)

Veneno de víbora de Russel confirmatorio (plaquetario): Ratio de ratios (0.5 -1.20)

VALORES CRÍTICOS

No aplica

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Core: Un día laborable.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Interpretación cuantitativa y cualitativa, a partir de determinado punto de corte el estudio se informa como presencia o ausencia de anticoagulante lúpico. Dicha interpretación es de utilidad en las siguientes patologías:

Enfermedad tromboembólica venosa: constituye una de las determinaciones analíticas en los estudios de trombofilia. En pacientes jóvenes, con trombosis venosa recurrente y/o en casos espontáneos, está indicada su determinación.

Procesos isquémicos arteriales, incluyendo accidentes cerebrovasculares, sobre todo en pacientes jóvenes, en los que no existan factores de riesgo de ateromatosis.

Pérdidas fetales recurrentes y abortos de repetición: dentro del amplio número de causas que incluyen las ginecológicas, hormonales, cromosómicas, la determinación de anticuerpos antifosfolípido se suele incluir en la valoración inicial ante estas situaciones.

Trombopenias: la trombopenia constituye uno de los criterios clínicos del síndrome antifosfolípido y su realización es uno de las pruebas complementarias en su estudio.

Lupus eritematoso disseminado y otros conectivopatías: la determinación de los anticuerpos antifosfolípidos forma parte del estudio del perfil autoinmune de estas enfermedades, y con implicaciones sobre indicaciones de profilaxis ante situaciones de riesgo trombótico.

BIBLIOGRAFÍA:

Willis R, Harris EN, Pierangeli SS. Current international initiatives in antiphospholipid antibody testing. *Semin Thromb Hemost*. 2012; 38(4):360-74.

Adams M. Measurement of lupus anticoagulants: an update on quality in laboratory testing. *Semin Thromb Hemost*. 2013; 39(3):267-71.

Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost*. 2009;7(10):1737-40.

Pengo V. ISTH guidelines on Lupus Anticoagulant testing. *Thromb Res*. 2012;130: S76-S77.

Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol*. 2012;57(1):47-58.

CLSI. Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant; Approved Guideline. CLSI document H60-A. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

Moore GW, Brown KL, Bromidge ES, and Drew AJ, Ledford-Kraemer MR. Lupus anticoagulant detection: out of control? *Int J Lab Hematol*. 2013; 35(2):128-36.

Moore GW. Commonalities and contrasts in recent guidelines for lupus anticoagulant detection. *Int J Lab Hematol*. 2014; 36(3):364-73.

Moore GW. Recent guidelines and recommendations for laboratory detection of lupus anticoagulants. *Semin Thromb Hemost* .2014;40(2)163-71.

Kumano O, Ieko M, Naito S, Yoshida M, Takahashi N. APTT reagent with ellagic acid as activator shows adequate lupus anticoagulant sensitivity in comparison to silica-based reagent. *J Thromb Hemost.* 2012;10(11):2338-43

Lawrie AS, Mackie IJ, Purdy G, Machin SJ. The sensitivity and specificity of commercial reagents for the detection of lupus anticoagulant show marked differences in performance between photo-optical and mechanical coagulometers. *Thromb Haemost.* 1999; 81:758-62.

Devreese KMJ. Antiphospholipid antibody testing and standardization. *Int J Lab Hematol.* 2014;36(3):352-63.

Bertolaccini ML, Amengual O, Andreoli L, Atsumi T, Chighizola CB, Forastiero R, et al. 14th International Congress on Antiphospholipid Antibodies Task Force. Report on antiphospholipid syndrome laboratory diagnostics and trends. *Autoimmunity reviews.* Elsevier B.V.; 2014 May 10.

Martinuzzo ME, Barrera LH, D'Adamo MA, Otaso JC, Gimenez MI, Oyhamburu J. Frequent false-positive results of lupus anticoagulant tests in plasmas of patients receiving the new oral anticoagulants and enoxaparin. *Int J Lab Hematol.* 2014; 36(2):144-50.

Greaves M, Cohen H, Machin SJ, Mackie I. Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol.* 2000; 109:704-15.

Kershaw G, Suresh S, Orellana D, Nguy YM. Laboratory identification of lupus anticoagulants. *Semin Thromb Hemost.* 2012; 38:375-84.

Moore GW. Combining Taipan snake venom time/Ecarin time screening with the mixing studies of conventional assays increases detection rates of lupus anticoagulants in orally anticoagulated patients. *Thromb J.* 2007; 5

Van Os GM, de Laat B, Kamphuisen PW, Meijers JC, de Groot PG. Detection of lupus anticoagulant in the presence of rivaroxaban using Taipan snake venom time. *J Thromb Haemost.* 2011; 9:1657-9

Estudio de trombofilia

INFORMACIÓN CLÍNICA

Se podría definir la trombofilia (tendencia trombótica) como aquella situación biológica predisponente a la aparición de trombosis por analogía al término hemofilia (tendencia hemorrágica) como predisponente a la aparición de hemorragias, si bien no hace referencia a una enfermedad concreta. Se distingue -en primer lugar- una TROMBOFILIA HEREDITARIA que incluye con frecuencia, la mera presencia -con carácter congénito y hereditario- de cualquiera de los factores de riesgo trombótico conocidos a los que se atribuye un incremento del riesgo de sufrir un tromboembolismo venoso (TEV) y una TROMBOFILIA ADQUIRIDA (de curso más o menos transitorio aunque puede prolongarse en el tiempo) en relación con diversas situaciones (como la ingestión de estrógenos o el período postparto) y enfermedades (lupus, cáncer, síndrome nefrótico).

El concepto de trombofilia se refiere más a la tendencia trombótica sobre el territorio venoso que sobre el arterial; se aplica fundamentalmente a la predisposición para desarrollar una trombosis venosa profunda (TVP) o una embolia pulmonar (EP) debido -principalmente- a que sus factores de riesgo biológicos están mejor perfilados. Sin embargo, algunas trombofilias como el síndrome antifosfolípido extienden este riesgo trombótico claramente al territorio arterial.

Hemos de comprender que -en el estado actual del conocimiento- será imposible descartar con certeza (o incluso indagar) todas las causas biológicas de trombofilia, la mayoría porque aún resultan desconocidas y muchas otras por razones de operatividad (prevalencia extremadamente baja o extrema laboriosidad y coste económico).

Para un estudio “completo” de trombofilia se efectuarán dos grandes tipos de estudios:

Rutinarios: propios del estudio básico de coagulación

Especiales: aquellos los que por su rareza, dificultad o precio se posponen para su análisis posterior. En general para analizar muestras de varios pacientes en tandas amplias, lo que suele significar que sus muestras deberán ser congeladas.

Recordando la fisiología del proceso coagulativo comprendemos que el desequilibrio protrombótico puede surgir tanto de un exceso de procoagulantes como de un defecto de anticoagulantes en sangre. Es decir, dependerá de:

Un exceso de factores de coagulación (como el F. VIIC)

Un déficit de inhibidores de coagulación (antitrombina o prot. C /S)

Un déficit de profibrinolíticos

Un exceso de inhibidores de la fibrinólisis

El estudio de Trombofilia debe Incluir:

Hemograma y estudio básico de Coagulación

Inhibidores fisiológicos (y test relacionados):

ATIII

Proteína C

Proteína S

Resistencia a proteína C activada (RPCA)

Pruebas de cribado síndrome antifosfolípido:

Anticuerpos anticardiolipina y Anticuerpos anti- β 2 glicoproteína. (Ver cartera de Servicios de Inmunología)

Anticoagulante Lúpico

Incremento de FVIII

Cribado de disfibrinogenemias: Tiempo de Trombina,Tiempo de reptilase, FibrinógenoClaus.

Homocisteína

Polimorfismos genéticos: protrombina G20210A, factor V Leiden (Ver cartera de Servicios de Genética)

En ocasiones puede incluir el estudio del Sistema Fibrinolítico(Plasminógeno y Plasmina)

UTILIDAD CLÍNICA

Diagnóstico de Trombofilia adquirida o hereditaria, en los **pacientes en los que este indicado** este estudio:

Primer episodio de tromboembolismo venoso (TEV) espontáneo en individuo menor de 50 años

Primer episodio de TEV asociado a factor de riesgo transitorio y de magnitud desproporcionada al factor desencadenante en individuo menor a 50 años

TEV asociado a terapia hormonal o a embarazo y/o puerperio

TEV recurrente espontáneo o provocado por factor de riesgo transitorio bajo trombopprofilaxis adecuada

TEV a cualquier edad con fuerte historia de TEV en familiares de primer grado (2 o más afectados antes de los 50 años sin causa).

Individuo menor de 50 años con trombosis venosa superficial recurrente sin causa desencadenante

Trombosis espontánea en vena central y/o ramas de la retina en individuo menor de 45 años sin factores de riesgo cardiovascular ni locales

Trombosis venosa esplácica (síndrome de Budd Chiari, trombosis portal y mesentérica) en ausencia de factores locales precipitantes

Trombosis de senos venosos cerebrales sin factores loco-regionales (infecciosos, traumáticos, tumorales)

Individuo menor de 50 años con trombosis venosa espontánea de miembro superior y/o cuello, no asociada a uso de catéter o a mecanismo compresivo

Mujer con 2 o más abortos consecutivos tempranos (antes de las 10 semanas) de embarazo embrionado, sin causas genéticas.

Mujer con un aborto de más de 10 semanas de feto sin malformaciones y sin causa gineco-obstétrica que lo explique, o insuficiencia vascular placentaria, caracterizada por: 1) uno o más nacimientos prematuros de neonatos morfológicamente normales antes de la semana 34, debidos a: a) eclampsia o pre-eclampsia severa; b) hallazgos reconocidos de insuficiencia placentaria (anormalidad del test de no stress o del doppler obstétrico sugerentes de hipoxemia, oligohidramnios, peso menor al percentil 10 para edad gestacional); 2) desprendimiento prematuro de placenta normoinsera (abruptio placentario). No hay evidencias hasta la fecha con respecto a la utilidad del estudio de trombofilia en pacientes que presentan fallas de implantación

Individuo menor de 50 años con un evento trombótico arterial en ausencia de factores de riesgo cardiovascular, especialmente con historia de tromboembolismo venoso

Antecedente de necrosis cutánea asociada al uso de fármacos antagonistas de la vitamina K

En pacientes pediátricos:

Neonatos con púrpura fulminans

Neonatos con TEV espontáneo extenso

Niños y adolescentes con TEV espontáneo

Niños y adolescentes con TEV recurrente

Niños y adolescentes con TEV asociado a factor de riesgo transitorio, NO relacionado con catéter venoso central. Se sugiere considerar el estudio previa discusión con los padres y el niño acerca del impacto de los resultados en el manejo individual y de la familia.

Niños y adolescentes con trombosis arterial: sin evidencias suficientes para realizar recomendaciones en este grupo

Individuos asintomáticos:

Aquellos adultos familiares en primer grado de un individuo con historia de TEV (especialmente si fueron eventos espontáneos) y trombofilia hereditaria conocida.

¿Por qué y para qué debe solicitarse un estudio de Trombofilia?

1. Identificar sujetos con MÁS RIESGO de padecer un primer evento trombótico, en especial de evento venoso espontáneo en sitio inusual o asociado al uso de hormonas, embarazo o puerperio.

2. Identificar a algunos individuos que poseen mayor riesgo de recurrencia luego de suspendido el tratamiento anticoagulante inicial. El mayor valor predictivo positivo (VPP) se da en individuos que presentan TEV espontáneo y que son portadores de trombofilias de alto riesgo trombótico, por lo que en estos individuos debe evaluarse la anticoagulación indefinida.

3. Identificar sujetos que ameriten el uso de profilaxis del TEV que, de otro modo, no hubieran calificado para recibirla.

Portadoras durante el puerperio (todas las trombofilias).

Portadoras durante TODO el embarazo (sólo trombofilia de alto riesgo).

Portadoras que serán sometidas a técnicas de reproducción asistida que impliquen estimulación hormonal.

Cirugía en pacientes portadores de Trombofilia.

REQUISITOS DEL PACIENTE

No recibir ningún tipo de Tratamiento anticoagulante oral en las 4 semanas previas al estudio y al menos haber transcurrido tres meses desde el evento trombótico agudo.

Se permite la realización del estudio recibiendo HPBM a dosis profilácticas o intermedias.

Sólo puede ser solicitado por Hematología tras la valoración clínica pertinente de la indicación de este estudio.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (Citrato): Tubo de tapón azul con arandela negra para las pruebas de Hemostasia.

Sangre con anticoagulante (EDTA): Tubo de Tapón malva EDTA K3 para los estudios genéticos y hematimétricos.

Sangres sin anticoagulante: Tubo de tapón rojo para los estudios inmunológicos.

VALORES DE REFERENCIA

Los que se explican de forma individual en este documento para cada una de las pruebas que componen este estudio.

VALORES CRÍTICOS

Los que aplican de forma individual para cada una de las pruebas que forman parte de este estudio.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: 30 días.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se basan en la presencia o no de factores protrombóticos dependiendo del resultado de las pruebas individuales que forman parte de este estudio. Algunas de ellas se expresan de forma cualitativa (positividad o negatividad) y otras de forma cuantitativa que se relaciona con los valores de referencia.

BIBLIOGRAFÍA

Margeti S. Laboratory investigation of thrombophilia. J Med Biochem 2014; 33(1):28-11.2014

Nicolaides A. The Case Against Routine Screening for Thrombophilia. Dis Mon 2010; 56(10): 569-73. Acceso 26 de Julio 2014. 19. Khor B, Van Cott E. Laboratory Evaluation of Hypercoagulability. Clin Lab Med 2009; 29(2): 339–66.

Cohoon K, Heit J. Inherited and Secondary Thrombophilia. Circulation 2014; 129(2):254-7. Agosto 2014.

Middeldorp S. Evidence-based approach to thrombophilia testing. J Thromb Thrombolysis 2011; 31(3):275–81.

Baglin T, et. al. Clinical guidelines for testing for heritable thrombophilia. Br J Haematol 2010; 149(2):209–20.

Galioto NJ, Danley DL, Van Maanen RJ. Recurrent Venous Thromboembolism. Am Fam Physician 2011; 83(3):293-300.

Silvey M, Carpenter S. Inherited Thrombophilia in Children. CurrProblPediatrAdolesc Health Care 2013; 43(7):163-68.

Maqbool S, et. al. Protein-C deficiency presenting as pulmonary embolism and myocardial infarction in the same patient. Thromb J 2013; 11:19. Acceso 21 de junio 2014.

Román González A, et. al. Paciente con deficiencia de proteína C y múltiples trombosis: reporte de caso. Iatreia 2007; 20(3):308-13.

Vives Corrons JL, Albareda S, Flandrin G, Héller S, Horvath K, Houwen B, et al. Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: Control material. Clin Chem Lab Med 2004; 42:922-6

Walker P, Gregg A. Screening, Testing, or Personalized Medicine: Where do Inherited Thrombophilias Fit Best? ObstetGynecol Clin N Am 2010; 37(1):87–107.

Prueba de Mezclas

INFORMACIÓN CLÍNICA

La prueba de mezcla tiene como objetivo orientar el examen hacia el déficit de factores o la presencia de un anticoagulante circulante. Dicha prueba de mezcla habitualmente se realiza para el tiempo de tromboplastina parcial activada o, aunque también se puede realizar para el estudio del tiempo de protrombina alargado.

UTILIDAD CLÍNICA

Demostrar si el alargamiento de los estudios de coagulación, se debe aún déficit factorial con el consiguiente riesgo hemorrágico o se debe a la presencia de inhibidores específicos o inespecíficos frente a determinados factores de coagulación, lo que se puede traducir en un riesgo hemorrágico o trombótico. De este estudio dependerán los siguientes estudios a realizar en el Laboratorio de hemostasia bien hacia estudios de dosificación factorial o a investigación de la presencia de inhibidores circulantes (anticoagulante lúpico, hemofilia adquirida...).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Los tiempos de TTPA de esta mezcla se comparan con la misma proporción de plasma del paciente y plasma control que se han incubado por separado con tromboplastina, y se mezclan justo antes de recalcificarse.

Si en el plasma del enfermo hay anticuerpos contra algún factor de la vía intrínseca, el tiempo de coagulación de la mezcla en que se han incubado juntos el plasma del paciente y el plasma control será más largo que el del tubo en que se han incubado por separado. Los anticuerpos del plasma del paciente habrán degradado el factor del plasma control contra el que van dirigidos.

La incubación del plasma durante 2 h con la tromboplastina (fosfolípidos) neutraliza un posible anticoagulante tipo lupus.

REQUISITOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul arandela negra.

VALORES DE REFERENCIA

Índice de Rosner inferior a 12% corrección.

Índice de Rosner superior a 15% no corrección.

Índice de Rosner entre 12-15% intervalo de incertidumbre, a valorar por facultativo de hemostasia.

VALORESCRÍTICOS:

No aplica

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: Un día laborable.

Área de Trombosis y Hemostasia de Laboratorio de Respuesta Rápida: 2h 30 min.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La corrección o la no corrección del TTPA se determina mediante el cálculo del **índice de Rosner** de la siguiente manera:

$$IR = [(TTPA \text{ mezcla} - TTPA \text{ control}) / TTPA \text{ paciente}] \times 100$$

Se estima que el TTPA se habrá corregido si el valor del índice de Rosner es inferior al 12 %. Por otra parte, no se habrá corregido si el valor el índice de Rosner es superior al 15 %. Además, existe una zona de incertidumbre entre el 12 y el 15 %.

La corrección del TTPA durante la prueba de mezcla indicaría un déficit de factor de coagulación y haría que el examen se oriente hacia la medición de factores.

La no corrección del TTPA indicaría la presencia de un anticoagulante circulante. La presencia de un anticoagulante circulante de tipo 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 (Hemofilia adquirida A o B, inhibidores contra factor VII, XIII, XI...)

BIBLIOGRAFÍA:

Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. J ThrombHaemost 2007;5(Suppl. 1):95-101.

Esmon CT. Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway. Semin ThrombHaemost 2006; 32(Suppl. 1):49-60.

Franchini M, Montagnana M, Tarhjer G, Lippi G. Reduced von Willebrand factor-cleaving protease levels in secondary thrombotic microangiopathies and other diseases. Semin ThrombHaemost 2007; 33:787-95.

Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. Semin ThrombHaemost 2005; 31:381-92.

Mackman R, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. ArteriosclerThromb Vas Biol 2007; 27:1687-93.

Morser J, Gabazza EC, Myles T, Leung LLK. What has been learnt from the thrombin-activable fibrinolysis inhibitor-deficient mouse? J ThrombHaemost 2010; 8:868-76.

Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: Is GPVI the central receptor? Blood 2003; 102:449-61.

Pozgajová M, Sachs UJH, Hein L, Nieswandt B. Reduced thrombus stability in mice lacking the $\alpha 2A$ -adrenergic receptor. Blood 2006; 108:510-4.

Rijken DC, Lijnen HR. New insights into the molecular mechanism of the fibrinolysis system. J ThrombHaemost 2009; 7:4-13.

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, Foncuberta J, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición.2015

Zwicker JJ, Trenor CC, Furie BC, Furie B. Tissue factor-bearing microparticles and thrombus formation. ArteriosclerThrombVascBiol 2011; 31:728-33

Dosificación Factores vía extrínseca

INFORMACIÓN CLÍNICA

La determinación del TP en un paciente con déficit de un factor dará un resultado acortado del mismo.

Para la determinación se hará una prueba de mezclas, es decir, se mezclará el plasma problema con plasma control normal, si el TP corrige se deberá a que existe un déficit de factor de la vía extrínseca.

Las técnicas más utilizadas para el cribado son las pruebas funcionales, sobre todo coagulométricas, si bien el Factor X cromogénico tiene aplicaciones como la medición de la actividad de las heparinasde bajo peso molecular (HBPM) y en la medicación de las concentraciones activas de los Anticoagulantes de acción directa anti-Xa.

UTILIDAD CLÍNICA

Se usa para el diagnóstico y monitorización del tratamiento de coagulopatías congénitas o adquiridas que conllevan el descenso de la actividad coagulante de los factores II, V, VII y X.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Las dosificaciones se fundamentan en el TP. Utilizando un plasma carente de factor a estudiar (que aporta todos los demás factores y el fibrinógeno) se combina con el plasma del paciente. Un plasma de paciente deficiente en un factor específico, no puede compensar ese factor en el plasma deficiente correspondiente, con lo cual resultara un alargamiento del TP. La actividad del factor de la coagulación en % será determinada sobre una curva de referencia la cual ha sido establecida por medio de la dilución de plasmas humanos o de un pool de plasmas normales mezclado con este plasma deficiente.

REQUISITOS DEL PACIENTE

Para el diagnóstico de coagulopatías: no haber recibido derivados plasmáticos o tratamientossustitutivos con factor los 7 días antes al estudio. Este tiempo puede ajustar dependiendo de la vida media del factor y producto administrado para corregirlo.

Para la monitorización del tratamiento sustitutivo hemostático en las coagulopatías: se debe conocer el producto hemostático administrado, la cantidad y la hora de la última dosis para poder valorar los resultados correctamente.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul arandela negra.

VALORES DE REFERENCIA

Factor II:C - Sangre (Test)	De 0 a 30 días (44,80 - 74,30)
	De 1 mes a 5 meses (46,70 - 110,60)
	De 6 meses a 11 meses (73,90 - 117,20)
	De 1 año a 5 años (49,40 - 130,00)
	De 6 años a 10 años (68,40 - 132,00)
	De 11 años a 17 años (47,60 - 119,20)
	De 18 a 150 años (70,00 - 120,00)
Factor V:C	De 0 a 30 días (69,00 - 123,70)
	De 1 mes a 5 meses (59,50 - 147,00)
	De 6 meses a 11 meses (59,00 - 159,80)
	De 1 año a 5 años (73,20 - 188,10)
	De 6 años a 10 años (82,00 - 140,60)
	De 11 años a 17 años (61,70 - 124,80)
	De 18 a 150 años (70,00 - 120,00)
Factor X:C	De 0 a 30 días (66,00-92,00)
	De 1 mes a 5 meses (67,50 - 122,20)
	De 6 meses a 11 meses (75,80 - 134,40)
	De 1 año a 5 años (59,70 - 152,80)
	De 6 años a 10 años (71,30 - 161,50)
	De 11 años a 17 años (64,00 - 130,50)
	De 18 a 150 años (70,00 - 120,00)
Factor VII:C - Sangre (Test)	De 0 a 30 días (55,00 - 108,00)
	De 1 mes a 5 meses (43,00 - 141,10)
	De 6 meses a 11 meses (55,20-128,00)
	De 1 año a 5 años (47,80-124,20)
	De 6 años a 10 años (55,00-135,40)
	De 11 años a 17 años (55,40-133,10)
	De 18 a 150 años (70,00 - 120,00)

VALORES CRÍTICOS

Factor II o protrombina: < 10% o U/dL

Factor VII o proconvertina: < 10% o U/dL

Factor X o Factor de Stuart: < 10% o U/dL

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: 7 días.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Detección y monitorización de déficit de factores II, V, VII y X congénitos o adquiridos.

BIBLIOGRAFÍA:

J.C. Westgard; C. McLaren; B.S. Bull. Measures of dispersion and their use in the hematology laboratory. Laboratory Hematology, 4: 130-132. 1998.

Robert B. Fairweather, MD, PhD; Jack Ansell, MD; Anton M. H. P. van den Besselaar, PhD; John T. Brandt, MD; Henry I. Bussey, PharmD; Leon Poller, MD, DSc; Douglas A. Triplett, MD; Richard H. White, MD. College of American Pathologists Conference XXXI on Laboratory Monitoring of anticoagulant Therapy. Laboratory Monitoring of Oral Anticoagulant Therapy. Arch Pathol Lab Med. 1998; 122:768–781.

Bernard E. Statland, MD, PhD; James O. Westgard, PhD. Control de calidad, en Diagnóstico y tratamientos clínicos por el laboratorio. 9ª edición. Director de la obra: John Bernard Henry. Masson, 1993. 83-101.

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, Foncuberta J, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición.2015

Dosificación Factores vía intrínseca

INFORMACIÓN CLÍNICA

La determinación del TTPA de una mezcla de plasma carente en un factor y del plasma problema diluido, da lugar a un tiempo de coagulación inversamente proporcional a la concentración de dicho factor en la muestra problema. Este método nos sirve para el despistaje de déficits factoriales congénitos o adquiridos que participan en esta vía.

UTILIDAD CLÍNICA

Se usa para el diagnóstico y monitorización del tratamiento de coagulopatías congénitas o adquiridas que conlleven el descenso de la actividad coagulante de los factores: VIII, IX, XI y XII

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Existen también dos métodos para analizar los factores: antigénicos o inmunológicos funcionales o de actividad y cromogénicos.

Dentro de los ensayos inmunológicos se aplica fundamentalmente para el FvW: Ag. (Ver complejo VIII)

La inmunoturbidimetría o nefelometría: sería útil para la dosificación del factor de Von Willebrand y Factor XIII (Ver complejo VIII y Dosificación de Factor XIII).

Dentro de los estudios cromogénicos debe recordarse el FVIII por método cromogénico usado en el diagnóstico de Hemofilia A y la Enfermedad de Von Willebrand (ver complejo VIII)

Técnicas coagulométricas: Para factores de la vía intrínseca se fundamentan en el TTPA. Se utiliza plasma carente del factor a estudio (aportara los demás factores y el fibrinógeno) combinado con una dilución de plasma de referencia o problema se obtienen unos tiempos de coagulación inversamente proporcionales a la actividad del factor a estudio.

La presencia de un déficit de factor de la vía intrínseca dará como resultado un alargamiento del TTPA.

Se realizará la prueba de mezclas y se normalizará el valor del TTPA.

REQUISITOS DEL PACIENTE

Para el diagnóstico de coagulopatías: no haber recibido derivados plasmáticos o tratamientos sustitutivos con factor los 7 días antes al estudio. Este tiempo puede ajustarse dependiendo de la vida media del factor y producto administrado para corregirlo.

Para la monitorización del tratamiento sustitutivo hemostático en las coagulopatías: se debe conocer el producto hemostático administrado, la cantidad y la hora de la última dosis para poder valorar los resultados correctamente.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul arandela negra.

VALORES DE REFERENCIA

Factor VIII:C	De 0 a 30 días (65,20 - 153,40)
	De 1 mes a 5 meses (50,30 - 187,30)
	De 6 meses a 11 meses (53,40 - 132,20)
	De 1 año a 5 años (59,00 - 167,00)
	De 6 años a 10 años (60,60 - 154,40)
	De 11 años a 17 años (42,80 - 154,60)
	De 18 a 150 años (50,00 - 150,00)
Factor IX:C	De 0 a 30 días (30,00 - 77,00)

	De 1 mes a 5 meses (29,00 - 105,00)
	De 6 meses a 11 meses (50,50 - 106,80)
	De 1 año a 5 años (52,60 - 128,90)
	De 6 años a 10 años (55,30 - 156,00)
	De 11 años a 17 años (60,20 - 138,40)
	De 18 a 150 años (70,00 - 120,00)
Factor XI:C	De 0 a 30 días (32,90 - 75,00)
	De 1 mes a 5 meses (27,60 - 126,40)
	De 6 meses a 11 meses (60,90 - 125,60)
	De 1 año a 5 años (58,00 - 154,00)
	De 6 años a 10 años (31,80 - 154,00)
	De 11 años a 17 años (55,40 - 139,40)
	De 18 a 150 años (70,00 - 120,00)
Factor XII:C	De 0 a 30 días (25,00 - 81,00)
	De 1 mes a 5 meses (76,00 - 136,60)
	De 6 meses a 11 meses (48,00 - 156,10)
	De 1 año a 5 años (50,00 - 174,70)
	De 6 años a 10 años (49,40 - 153,50)
	De 11 años a 17 años (49,40 - 153,50)
	De 18 a 150 años (70,00 - 120,00)

VALORES CRÍTICOS

Factor VIII: C o antihemofílico A: <10% o U/dL

Factor IX o antihemofílico B: <15% o U/dL

Factor XI o antihemofílico C: <15% o U/dL

Factor XII o Factor Hageman: No aplica

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: 7 días.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Detección y monitorización de déficit de factores VIII, IX, XI y XII congénitos o adquiridos.

BIBLIOGRAFÍA:

J.C. Westengard; C. McLaren; B.S. Bull. Measures of dispersion and their use in the hematology laboratory. Laboratory Hematology, 4: 130-132. 1998.

Robert B. Fairweather, MD, PhD; Jack Ansell, MD; Anton M. H. P. van den Besselaar, PhD; John T. Brandt, MD; Henry I. Bussey, PharmD; Leon Poller, MD, DSc; Douglas A. Triplett, MD; Richard H. White, MD. College of American Pathologists Conference XXXI on Laboratory Monitoring of anticoagulant Therapy. Laboratory Monitoring of Oral Anticoagulant Therapy. Arch Pathol Lab Med. 1998; 122:768–781.

Bernard E. Statland, MD, PhD; James O. Westgard, PhD. Control de calidad, en Diagnóstico y tratamientos clínicos por el laboratorio. 9ª edición. Director de la obra: John Bernard Henry. Masson, 1993. 83-101.

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, Foncuberta J, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición.2015

Factor VIII cromogénico bovino y Factor VIII cromogénico Humano

INFORMACIÓN CLÍNICA

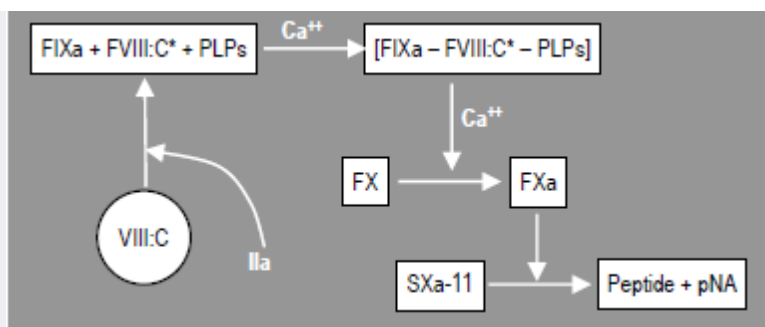
El FVIII es una proteína plasmática de alto peso molecular que actúa como cofactor del FIXa en la activación del FX en FXa. Una deficiencia en el FVIII provoca una severa alteración hemorrágica, la Hemofilia A. El grado de la intensidad hemorrágica está inversamente relacionado con la concentración del FVIII. Los pacientes con Hemofilia A se clasifican en tres categorías en función de la actividad de su Factor VIII: < 0,01 IU/mL = severa, 0,01-0,04 IU/mL = moderada y 0,05-0,25 IU/mL = Hemofilia leve.

UTILIDAD CLÍNICA

Se usa para el diagnóstico y monitorización del tratamiento de la Hemofilia A y enfermedad de Von Willebrand

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

En presencia de calcio y fosfolípidos, el FX es activado a FXa por el FIXa. Esta activación está potenciada por el FVIII que actúa como cofactor en esta reacción. Utilizando una concentración óptima de Calcio, fosfolípidos, FIXa y un exceso de FX, la proporción de activación del FX está relacionada linealmente con la cantidad de FVIII. El FXa hidroliza el sustrato cromogénico, liberándose un grupo cromogénico sintético, la paranitroanilina (pNa). El FXa generado, y la intensidad de color, es proporcional a la actividad del FVIII en la muestra. Un inhibidor sintético de la Trombina añadido al sustrato cromogénico evita la posible hidrólisis de éste por parte de la Trombina.



Método de obtención del Factor VIII cromogénico

En el caso del Factor VIII cromogénico puede ser humano o bovino . El factor VIII cromogénico bovino es el utilizado para la el diagnóstico y monitorización de niveles basales de Pacientes con Hemofilia A congénita o adquirida, así como Enfermedad de Vonwillebrand.

En el caso del Factor VIII:Cro Humano se usa para medir la actividad del emicizumabes un anticuerpo monoclonal humanizado modificado inmunoglobulina G4 (IgG4) con una estructura de anticuerpo biespecífico que se usa en el tratamiento de pacientes con Hemofilia A .

REQUISITOS DEL PACIENTE

Para el diagnóstico de coagulopatías: no haber recibido derivados plasmáticos o tratamientos sustitutivos con factor los 7 días antes al estudio. Este tiempo puede ajustar dependiendo de la vida media del factor y producto administrado para corregirlo.

Para la monitorización del tratamiento sustitutivo hemostático en las coagulopatías: se debe conocer el producto hemostático administrado, la cantidad y la hora de la última dosis para poder valorar los resultados correctamente.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul arandela negra.

VALORES DE REFERENCIA

Factor VIII: Cro: 50-150% o U/dL

VALORES CRÍTICOS

Factor VIII: Cro < 10% o U/dL

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: 7 días.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Detección y monitorización de déficit de pacientes con Hemofilia A , con hemofilia Adquirida o Enfermedad de Vonwillebrand

Factor VIII cromogénico humano monitorización de niveles de emicizumab expresados en funcionalidad del factor VIII de la coagulación.

BIBLIOGRAFÍA:

Wagenvoort RJ et al. Development of a simple chromogenic factor VIII assay for clinical use. Haemostasis Vol. 19, N°4, 196-204 (1989).

Mikaelsson M. et al. Influence of phospholipids on the assessment of factor VIII activity. Haemophilia Vol. 4, N°4, 646-50 (1998.)

Lee CA. et al. Pharmacokinetics of recombinant factor VIII (recombinate) using one-stage clotting and chromogenic factor VIII assay. Thromb. Haemost. Vol. 82, N° 6, 1644-7 (1999).

Lundblad RL. et al. Issues with the assay of factor VIII activity in plasma and factor VIII concentrates. Thromb. Haemost. Vol 84, N° 6, 942-8 (2000).

Hubbard AR. et al. Potency estimation of recombinant factor VIII: effect of assay method and standard. Br. J Haematol Vol. 113, N° 2, 533-6 (2001).

Raut S. et al. A collaborative study to establish the 6th International Standard for factor VIII concentrate. Thromb. Haemost. Vol. 85, N° 6, 1071-8 (2001).

Barrowcliffe TW. et al. Coagulation and chromogenic assays of factor VIII activity: general aspects, standardization, and recommendations. Semin. Thromb. Hemost. Vol 28, N° 3, 247-56 (2002).

Kirschbaum N. et al. Calibration of the Ph. Eur. BRP Batch 3/Mega 2 (US/FDA) standard for human coagulation factor VIII concentrate for use in the potency assay. Pharmeuropo Spec Issue Biol Vol 1, 31-64 (2002).

Mikaelsson M. et al. Assaying the circulating factor VIII activity in haemophilia A patients treated with recombinant factor VIII products. Semin. Thromb. Hemost. Vol 28, N° 3, 257-64 (2002).

J.C. Westengard; C. McLaren; B.S. Bull. Measures of dispersion and their use in the hematology laboratory. Laboratory Hematology, 4: 130-132. 1998.

Bernard E. Statland, MD, PhD; James O. Westgard, PhD. Control de calidad, en Diagnóstico y tratamientos clínicos por el laboratorio. 9ª edición. Director de la obra: John Bernard Henry. Masson, 1993. 83-101.

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, Foncuberta J, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición.2015

Factor IX Cromogénico

INFORMACIÓN CLÍNICA

FIX es una glicoproteína dependiente de la vitamina K de cadena simple de aproximadamente 55 KDa, que se activa por el FXIa o factor tisular / FVIIa. El FIX activado (FIXa) convierte al FX en FXa en presencia de FVIII, fosfolípidos e iones de calcio.

UTILIDAD CLÍNICA

Para la determinación de la actividad del Factor IX (FIX) en plasma y en concentrados de factor que contengan FIX, sobre todo aquellos que son de vida media extendida usado en el tratamiento de pacientes con Hemofilia B.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

La actividad del FIX se determina mediante un método cromogénico, en el que el FIX humano se activa por FXIa humano y donde FIXa formado activa al FX humano en presencia de FVIII humano, iones de calcio y fosfolípidos. Similar a las condiciones in vivo, el FVIII es activado por la trombina que se genera durante la incubación. La cantidad de FXa formada se relaciona con la actividad FIX y se determina a partir de la hidrólisis de un sustrato de FXacromogénico. La actividad del FIX de la muestra se asigna frente a un plasma FIX o un estándar de FIX valorado y se expresa en unidades internacionales (IU).

REQUISITOS DEL PACIENTE

Para el diagnóstico de coagulopatías: no haber recibido derivados plasmáticos o tratamientos sustitutivos con factor los 7 días antes al estudio. Este tiempo puede ajustarse dependiendo de la vida media del factor y producto administrado para corregirlo.

Para la monitorización del tratamiento sustitutivo hemostático en las coagulopatías: se debe conocer el producto hemostático administrado, la cantidad y la hora de la última dosis para poder valorar los resultados correctamente.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul arandela negra.

VALORES DE REFERENCIA

Factor IX cromogenico 60-130% o U/dL

VALORES CRÍTICOS

Factor IX:Cro<10% o U/dL

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia EspecialFVIIIcromogénico: 7 días.

Área de Trombosis y Hemostasia EspecialFVIIIcromogénico Humano o concentración de emicizumab: 30 días.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Diagnóstico y monitorización de tratamiento en pacientes con Hemofilia B .

BIBLIOGRAFÍA:

Gray E, Barson H, Hockley J, Rigsby P. Collaborative study for value assignment of the 4th International Standard for Factors II, VII, IX, X, Plasma. WHO/BS/10.2145; 2010: 1-43.

Pickering WM, Gray E. The effect of activated Factor IX on the Factor IX coagulant and NAPTT activity of high-purity Factor IX concentrates. J. ThrombHaemost 2007; 5, Supplement 2: P-T-156.

Blanchette VS, Key NS, Ljung LR, Manco-Johnson MJ, van der Berg HM, Srivastava A. Definitions in hemophilia: Communication from the SSC of the ISTH. J ThrombHaemost 12: 1935-1939 (2014).

Bertina RM. Elevated clotting factor levels and venous thrombosis. PathophysiolHaemostThromb 2003/2004; 33: 395-400.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), www.clsi.org 6th Edition of the European Pharmacopoeia, General Chapter 5.3 Statistical analysis of results of biological assays and tests. Bernard E. Statland, MD, PhD; James O. Westgard, PhD.

Control de calidad, en Diagnóstico y tratamientos clínicos por el laboratorio. 9ª edición. Director de la obra: John Bernard Henry. Masson, 1993. 83-101.

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, Foncuberta J, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición.2015

Dosificación de Factor XIII antigénico:

INFORMACIÓN CLÍNICA:

El Factor XIII, también llamado factor estabilizante de la fibrina, es un zimógeno compuesto por dos subunidades A, potencialmente activas, y dos subunidades B, portadoras de proteínas, que circula por el plasma en forma de tetrámero. Las subunidades A se disocian de las subunidades B en la fase terminal de la cascada de coagulación por la acción de la trombina y el Ca²⁺, dando lugar a una configuración enzimáticamente activa.

El Factor XIII es esencial para mantener la hemostasis debido a su papel en la estabilización de la fibrina y en la protección de la fibrina respecto a la degradación proteolítica por el sistema fibrinolítico.

UTILIDAD CLÍNICA

Evaluar desordenes hemorrágicos debidos a deficiencia de Factor XIII que permitirá tomar las decisiones terapéuticas adecuadas.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Es utilizado un reactivo Látex FXIII que es una suspensión de partículas de látex de poliestireno de tamaño uniforme, a las que se les ha unido un anticuerpo policlonal de conejo altamente específico contra la subunidad A del FXIII. Cuando se mezcla un plasma que contiene la subunidad A activa del FXIII con el Reactivo Látex y el Tampón, las partículas de látex aglutinan. El grado de aglutinación es directamente proporcional a la concentración de FXIII Ag contenida en el plasma y se determina midiendo el descenso de la luz transmitida causada por los agregados

REQUISITOS DEL PACIENTE

Para el diagnóstico del Déficit de FXIII: no haber recibido derivados plasmáticos o tratamientos sustitutivos con factor los 9 días antes al estudio.

Para la monitorización del tratamiento sustitutivo hemostático en la deficiencia del Factor XIII: se debe conocer el producto hemostático administrado, la cantidad y la hora de la última dosis para poder valorar los resultados correctamente

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul arandela negra.

VALORES DE REFERENCIA

Factor XII:C - Sangre (Test)	De 0 a 30 días (25,00 - 81,00)
	De 1 mes a 5 meses (76,00 - 136,60)
	De 6 meses a 11 meses (48,00 - 156,10)
	De 1 año a 5 años (50,00 - 174,70)
	De 6 años a 10 años (49,40 - 153,50)
	De 11 años a 17 años (49,40 - 153,50)
	De 18 a 150 años (70,00 - 120,00)

VALORES CRÍTICOS:

Niveles inferiores al 15% o U/dL

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: 7 días.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los pacientes con deficiencias hereditarias de FXIII presentan predisposición a sangrados severos, además, está involucrado en el mantenimiento del embarazo evitando abortos precoces y en la cicatrización de las heridas.

Puede aparecer deficiencia adquirida de FXIII en algunas enfermedades tales como enfermedades inflamatorias del intestino y leucemias agudas. Se ha observado incremento de la actividad del FXIII en el plasma de pacientes con arteriosclerosis obliterativa y angiopatía diabética

BIBLIOGRAFÍA:

Bolton-Maggs PH, Perry DJ, Chalmers EA, Parapia LA, Wilde JT, Williams MD, Collins PW, Kitchen S, Dolan G, Mumford AD. The rare coagulation disorders – review with guidelines for the management from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. Haemophilia 2004; 10(5): 593–628

Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Problems relating to the diagnosis of FXIII deficiency. ThrombHaemost 2003; 1: 2603

Chanarin I (Ed.). Laboratory Haematology: An Account of Laboratory Techniques. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989.

Steve Kitchen, Angus McCraw, Marión Echenagucia; Diagnóstico de la hemofilia y otros trastornos de la coagulación: Manual de Laboratorio.Federación Mundial de Hemofilia.2010

Vives Corrons J.L., Aguilar Bascompte J.P, Colomer D, Foncuberta J, Muñiz E, Nonmededéu Josep, Solé F, Villamor N. Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología 4ª Edición.2015.

Complejo del Factor VIII

INFORMACIÓN CLÍNICA

El factor VIII de la coagulación es una glicoproteína de 320 kD sintetizada fundamentalmente en el hígado, que circula en plasma en una concentración de 0,1-0,2 µg/mL formando un complejo estable con otra glicoproteína, el factor vonWillebrand.Cuando se activa por el factor Xa o la trombina (por proteólisis), actúa como cofactor acelerando la activación del factor X por el factor IXa.

El factor von Willebrand es una glicoproteína multimérica grande (multímeros grandes de más de 20000 kD), sintetizada en endotelio y megacariocitos y presente en las plaquetas.

El factor von Willebrand tiene dos funciones fisiológicas: 1) Unión al colágeno del subendotelio y a la superficie plaquetaria (glicoproteína Ib), favoreciendo la formación de un agregado plaquetario en los sitios de lesión vascular. 2) Fijación y transporte del factor VIII, impidiendo su inactivación y concentrándolo en los sitios de lesión vascular.

El estudio del complejo VIII incluye:

Estudio Básico de coagulación, FVIII: C y Cro Fracción funcional determinable por métodos cualitativos y FVW: Ag; Fracción antigénica, determinable por métodos cuantitativos.

FVW: CoR; Fracción funcional, dependiente de la ristocetina, determinable por métodos cualitativos. Medida indirecta de la afinidad del factor por la glucoproteína Ib.

FVW: CB; Fracción funcional (fracción de la molécula que se une al colágeno), determinable por métodos cuantitativos (inmunológicos). Sensible a defectos de grandes multímeros.

FVW: FVIIIb; Fracción funcional (parte de la molécula que se une al factor VIII), determinable por métodos cuantitativo

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO:

Cada una de las pruebas que componen este estudio tiene un método específico que se detalla a continuación:

Fracción	Método	Ventajas	Inconvenientes
FvW: Ag	ELISA	• Buena correlación con el FVW: CoR • Reproducible y sencillo	• No detecta alteraciones cualitativas
FvW: CB	ELISA	• Sensible a los defectos de los grandes multímeros • Reproducible y sencillo	• Tipo de colágeno apropiado • Valor en el tipo 1 no claro y en tipo 2M
FvW: CoR	Inmunoturbidimétrico	Método más sensible para detección de todos subtipos	• Automatizado y reproducible
FVIII:C	Coagulométrica en un paso	• Simple • Fácil automatización • Rápido	• Sensible a activación e interferencias • Necesidad de plasma deficiente en factor VIII • Variable en función del reactivo de TTPA
FVIII: Cro	Cromogénico	• No sensible a activación. • No requiere plasma deficiente • Fácil automatización • Precisión	• Exactitud cuestionable en presencia de inhibidores • Instrumentación específica

FVW: FVIIIb; Fracción funcional (parte de la molécula que se une al factor VIII), determinable por métodos cuantitativo

REQUISITOS DEL PACIENTE:

Los niveles de factor VIII y von Willebrand sufren variaciones en situaciones fisiológicas y patológicas: la liberación de adrenalina y el ejercicio intenso o estrés, los procesos inflamatorios (reactante de fase aguda), enfermedad hepática severa, el hipertiroidismo y los niveles altos de estrógenos y progesterona, como en el embarazo o el tratamiento hormonal. Todo esto se debe tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados. Se recomienda un reposo previo del paciente 30 minutos antes de la extracción analítica y usar la menor estasis venosa para el procedimiento.

REQUISITOS DE LA MUESTRA:

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul arandela negra.

VALORES DE REFERENCIA:

Factor VIII:C - Sangre (Test)	De 0 a 30 días (65,20 - 153,40)
	De 1 mes a 5 meses (50,30 - 187,30)
	De 6 meses a 11 meses (53,40 - 132,20)
	De 1 año a 5 años (59,00 - 167,00)
	De 6 años a 10 años (60,60 - 154,40)
	De 11 años a 17 años (42,80 - 154,60)
	De 18 a 150 años (50,00 - 150,00)
Factor VIII:Cro- Sangre (Test)	De 0 a 150 años (50 - 150)
Factor vW:Ag- Sangre (Test)	De 0 a 30 días (46,0 - 215,9)
	De 1 mes a 5 meses (35,5 - 217,0)
	De 6 meses a 11 meses (48,4 - 199,4)
	De 1 año a 5 años (41,0 - 185,7)
	De 6 años a 10 años (44,8 - 141,1)
	De 11 años a 17 años (55,6 - 123,4)
	De 18 a 150 años (50,0 - 150,0)
Factor vW:CBA- Sangre (Test)	De 0 a 30 días (74 - 189)
	De 1 mes a 5 meses (41 - 191)
	De 6 meses a 11 meses (43 - 176)
	De 1 año a 5 años (44-156)
	De 6 años a 10 años (41-129)
	De 11 años a 17 años (54-137)
	De 18 a 150 años (50 - 150)
Factor vW:RCO ELISA- Sangre (Test)	De 0 a 30 días (87,8 - 121,5)
	De 1 mes a 5 meses (33,2 - 154,1)
	De 6 meses a 11 meses (37,1 - 118,6)
	De 1 año a 5 años (40,8 - 131,8)
	De 6 años a 10 años (42,1 - 162,6)
	De 11 años a 17 años (45,0 - 139,1)
	De 18 a 150 años (50,0 - 150,0)

VALORES CRÍTICOS:

Factor VIII Coagulante (FVIII: C) < 10%.

Factor VIII Cromogénico (FVIII: Cro): <10%

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: 15 días

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Test	Tipo 1	Tipo 2A	Tipo 2B	Tipo 2M	Tipo 2N	Tipo 3	Plaquetario
FVIII	No↓	No↓	No↓	N	↓↓↓	↓↓↓	↓
FvW: Ag	↓	↓	↓	↓oN	↓oN	↓↓↓↓	↓
FvW: CoR	↓	↓↓↓	↓↓	↓	↓oN	↓↓↓↓	↓↓
FvW:CB	↓	↓↓↓	↓↓	↓	↓oN	↓↓↓↓	-

	Hemofilia grave	Hemofilia moderada	Hemofilia leve
Factor VIII	<1% (0-0,01 U/mL)	2-5% (0,02-0,05 U/mL)	6-40% (0,06-0,40 U/mL)
Factor von Willebrand	Normal		

BIBLIOGRAFÍA:

Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E et al. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. ThrombHaemost (2000); 84:160-174.

Favaloro EJ, Lillicrap D, Lazzari MA et al. Von Willebrand disease: laboratory aspects of diagnosis and treatment. Haemophilia (2004); 10 (suppl 4): 164-168.

Chuansumrit A, McCraw A, Prestoni F. Essential signs of laboratory investigation for patients with haemophilia and bleeding disorders. Haemophilia (2004); 10 (suppl 4): 105-108.

Favaloro EJ, Bonar R, Kershaw J et al. Laboratory diagnosis of von Willebrand's disorder: quality and diagnostic improvements driven by peer review in a multilaboratory test process. Haemophilia (2004); 10: 232-242.

Schneppenham R, Budde U. Phenotypic and genotypic diagnosis of von Willebrand disease: a 2004 update. Seminars in Hematology (2005); 42: 15-28.

Favaloro EJ, Bonar R, Sioufi J et al. Laboratory diagnosis of von Willebrand disorder. Am J Clin Pathol (2003); 119: 882-893.

Laffan M, Brown SA, Collins PW et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. Haemophilia (2004); 10: 199-217

Union Factor VIII- FVW

INFORMACIÓN CLÍNICA

En la variante 2N de la enfermedad de von Willebrand, los resultados de los estudios de laboratorio son indistinguibles a los de la hemofilia A hasta que se realiza la técnica que evalúa la función del enlace FvW: FVIII o el estudio genético que caracteriza esta patología.

La enfermedad de von Willebrand tipo 2N constituye uno de los diagnósticos diferenciales de un nivel aislado, de leve a moderadamente bajo de FVIII. Los resultados que se obtienen por el resto de técnicas de Laboratorio se describen a continuación: FVIII y FVIII: C disminuidos. VWF:Ag ligeramente disminuido o normal. VWF: RCo y RIPA normales. Multímeros presentes. Es una variante cualitativa con disminución de la unión al FVIII, muy rara y con una herencia autosómica recesiva.

El diagnóstico diferencial entre Hemofilia A leve y EvW tipo 2 N es fundamental dado que su manejo terapéutico es muy distinto.

UTILIDAD CLÍNICA:

Diagnóstico diferencial entre Hemofilia A leve y EVW tipo 2 N

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO:

ELISA semiautomatizado: Un soporte de plástico recubierto de fragmento F(ab')₂ de conejo anti-VWF humano (Reactivo 1) fija el factor von Willebrand contenido en el plasma a probar. El factor VIII del plasma analizado que se disocia durante la primera etapa del análisis es eliminado. El factor recombinante VIII (Reactivo 2a) añadido a la prueba se fija al VWF. El factor VIII recombinante (FVIIIr) fijado se revela con anticuerpo monoclonal de ratón anti-FVIII humano marcado con peroxidasa (Reactivo 2b) que se fija sobre los determinantes antigénicos libres. La cantidad de peroxidasa unida se mide por su actividad sobre el sustrato TMB (Reactivo 3). Tras detener la reacción con un ácido fuerte, la intensidad de la coloración está en función de la concentración inicial de VWF capaz de unirse al FVIII (VWF:FVIIIb) presente en el medio.

REQUISITOS DEL PACIENTE:

Los niveles de factor VIII y von Willebrand sufren variaciones en situaciones fisiológicas y patológicas: la liberación de adrenalina y el ejercicio intenso o estrés, los procesos inflamatorios (reactante de fase aguda), enfermedad hepática severa, el hipertiroidismo y los niveles altos de estrógenos y progesterona, como en el embarazo o el tratamiento hormonal.

Todo esto se debe tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados. Se recomienda un reposo previo del paciente 30 minutos antes de la extracción analítica y usar la menor estasis venosa para el procedimiento.

REQUISITOS DE LA MUESTRA:

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul arandela negra.

Es necesario un nivel de VWF:Ag superior o igual a 15 % para una correcta interpretación de los resultados de VWF:FVIIIb.

VALORES DE REFERENCIA:

> 20% Normalidad

≤ 20% Indicativo de EVW tipo 2N

Valores críticos:

No aplica

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: 30 días.

BIBLIOGRAFÍA:

1. MAZURIER C., GAUCHER C., JORIEUX S., PARQUET-GERNEZ A., GOUDEMAND M.: "Evidence for a von Willebrand factor defect in factor VIII binding in three members of a family previously misdiagnosed mild haemophilia A and haemophilia A carriers: consequences for therapy and genetic counselling". Br. J. Haematol., 76, 372-379, 1990.
2. SADLER J.E.: "A revised classification of von Willebrand disease". Thromb. Haemostasis, 71, 4, 520-525, 1994.
3. SCHNEPPENHEIM R., BUDDE U., KREY S., DREWKE E., BERGMANN F., LECHLER E., OLDENBURG J., SCHWAAB R.: "Results of a screening for von Willebrand disease type 2N in patients with suspected haemophilia A or von Willebrand disease type 1". Thromb. Haemostasis, 76, 4, 598-602, 1996.
4. VLOT A.J., KOPPELMAN S.J., MEIJERS J.C.M., DAMAS C., VAN DEN BERG H.M., BOUMA B.N., SIXMA J.J., WILLEMS G.M.: "Kinetics of factor VIII-von Willebrand factor association". Blood, 87, 1809-1816, 1996.
5. SCHWARZ H.P., LENTING P.J., BINDER B., MIHALY J., DENIS C., DORNER F., TURECEK P.L.: "Involvement of flow-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in the clearance of factor VIII in von Willebrand factor-deficient mice". Blood, 95, 5, 1703-1708, 2000.
6. FAVALORO E.J.: "Appropriate laboratory assessment as a critical facet in the proper diagnosis and classification of von Willebrand disorder". Best Practice & Research Clinical Haematology, 14, 2, 299-319, 2001.

7. CARON C., MAZURIER C., GOUDEMAND J.: "Large experience with a factor VIII binding assay of plasma von Willebrand factor using commercial reagents". Br. J. Haematol., 117, 716-718, 2002.
8. FRESSINAUD E., MEYER D.: "Von Willebrand disease: biological diagnosis" in "Textbook of hemophilia". Lee C.A., Berntorp E., Hoots K., Oxford: Blackwell Publishing, 272-278, 2005.
9. FRESSINAUD E., MEYER D.: "La maladie de Willebrand: du diagnostic au traitement". Revue du praticien, 55, 20, 2209-2218, 2005. 10. FRANCHINI M., VENERI D., LIPPI G.: "The use of recombinant activated factor VII in congenital and acquired Von Willebrand disease". Blood coagulation and fibrinolysis, 17, 8, 615-61

Estudio de inhibidores específicos e inespecíficos en Hemofilia congénita, adquirida y otras coagulopatías menos frecuentes

INFORMACIÓN CLÍNICA

Se trata de anticuerpos que interfieren en el proceso coagulativo, y que dan lugar a una prolongación de las pruebas básicas de coagulación. Esta prolongación no se corrige por la mezcla a partes iguales con plasma normal, a diferencia de lo que ocurre en los déficits de factores. Pueden ser de dos tipos:

1. Los anticoagulantes lúpicos. Son muy frecuentes; en realidad se trata de anticuerpos dirigidos contra complejos de proteínas unidas a fosfolípidos. No tienen acción anticoagulante in vivo y, por el contrario, se asocian a complicaciones trombóticas y abortos de repetición (Ver prueba de Anticoagulante lúpico)
2. Los anticuerpos dirigidos contra un determinado factor de la coagulación. Son más raros. El más frecuente es el que va dirigido contra el factor VIII, y puede aparecer como respuesta al tratamiento

UTILIDAD CLÍNICA

Detección de inhibidores específicos contra el Factor VIII (hemofilia adquirida) o contra otros factores de la coagulación (más infrecuentes).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Al incubar una mezcla de plasma de un paciente con inhibidor mediante un plasma control, el anticuerpo del paciente degradará el factor contra el que va dirigido el plasma control.

Método Bethesda para el inhibidor contra el FVIII (puede aplicarse al resto de factores realizados por método coagulativo o cromogénico): El ensayo se basa en medir la cantidad de factor VIII residual de un plasma control que se ha incubado con el plasma del paciente durante 2 h a 37 °C. La fuente de factor VIII es un pool de plasmas normales que contiene aproximadamente 1 U/ml de factor VIII.

Se incuban partes iguales de plasma del paciente y plasma control. Pasadas las 2 h se mide el factor VIII residual. Una unidad Bethesda (UB) se define como la cantidad de inhibidor que neutraliza la mitad del factor VIII de la mezcla en estas condiciones.

REQUISITOS DEL PACIENTE

Presencia de un déficit factorial con pruebas de mezclas que no corrigen.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato sódico). (Contenedor): Tubo de plástico tapón azul arandela negra.

VALORES DE REFERENCIA

0-0.6 Unidades Bethesda, no se detecta inhibidor clínicamente relevante.

0.6-5 Unidades Bethesda; Inhibidor de bajo título.

Más de 5 Unidades Bethesda: Inhibidor de alto título.

VALORES CRÍTICOS

No aplican

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: 15días.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Casi todos los inhibidores del factor VIII son reconocidos debido a su interferencia o neutralización de la actividad procoagulante. Los inhibidores contra el factor VIII se presentan en las siguientes condiciones clínicas: hemofilia A, Hemofilia B, más raramente en Hemofilia C, Hemofilia adquirida (postparto, vejez, enfermedades autoinmunes de base...) En todas estas situaciones, los inhibidores están caracterizados como anticuerpos específicos del Factor VIII. Estos inhibidores son generalmente inmunoglobulinas IgG y presentan dependencia del tiempo en la neutralización del factor VIII.

Los inhibidores en pacientes no hemofílicos frecuentemente difieren en sus reacciones cinéticas de los inhibidores que provienen de pacientes hemofílicos.

La presencia de estos inhibidores tiene un alto riesgo hemorrágico y supone que se deban iniciar tratamientos de inmunotolerancia junto a agentes by-pass en los pacientes hemofílicos, y agentes by-pass junto a inmunosupresores en los casos de pacientes que desarrollen una hemofilia adquirida. La monitorización de los niveles del inhibidor es necesaria para la estrategia terapéutica adecuada con cada paciente y trastorno hemostático subyacente.

BIBLIOGRAFÍA

Kasper C, Aledort L, Counts R, Edron J, Fratantoni J, Green D, Hampton J, Hilgartner M, Laserson J, Levine P, MacMillan C, Pool J, Shapiro S, Shulman N, Eys J. A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. *ThrombDiathHaemorrh* 1975; 34:869–872.

Verbruggen B, Giles A, Samis J, Verbeek K, Meninsk E, Novakova I. The type of FVIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assays for factor VIII inhibitors.

ThrombHameost 2001; 86:1435–1439. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, MauserBunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda Assay for factor VIII:C inhibitors: Improved specificity and reliability. *ThrombHaemost* 1995; 73:247–251. (fortheNijmegenmodification)

Coagulación Intravascular Diseminada (C.I.D.)

INFORMACIÓN CLÍNICA

“La coagulación intravascular diseminada (C.I.D.) es un síndrome adquirido caracterizado por la activación generalizada intravascular de la coagulación producida por múltiples causas. Puede ser originada por lesión de la microvascularización y, a su vez, puede provocar lesión de esta misma microvascularización. Si esta lesión es importante puede producir fracaso orgánico”. Comité Científico y de Estandarización de la Asociación Internacional de Trombosis y Hemostasia

La C.I.D. es un síndrome. No es una enfermedad ni un síntoma sino un síndrome caracterizado por un proceso dinámico de coagulación intravascular. Puede ser originada de forma local y extenderse de forma generalizada o generalizada desde el inicio.

La C.I.D. es un proceso adquirido. En todos los procesos desencadenantes se produce una respuesta inflamatoria masiva localizada o generalizada con liberación de proteasas, citoquinas y hormonas desde células inflamatorias y vasculares que producen una lesión endotelial extensa. Como consecuencia se produce:

Exposición de la sangre a sustancias procoagulantes como el factor tisular.

Excesiva generación de trombina y formación de fibrina dentro de la circulación.

Formación de microtrombos locales y a distancia del sitio de la lesión original.

Fibrinolisis secundaria.

La activación de la coagulación producir trombos en la microcirculación que produce como consecuencia isquemia orgánica.

La C.I.D. incluye un coagulopatía de consumo. La coagulopatía de consumo describe el proceso hemorrágico que ocurre en el curso de la C.I.D. como consecuencia del consumo de plaquetas, factores de coagulación e inhibidores de la coagulación. A esta coagulopatía se añade la activación del sistema fibrinolítico, que

intensifica la tendencia hemorrágica. La coagulopatía de consumo no siempre está presente en todos los pacientes.

En la C.I.D. se puede demostrar un aumento de marcadores de activación de la coagulación.

Existe una variante de C.I.D que es la que se produce en el paciente politraumatizado y que se denomina C.T.A, coagulopatía asociada al trauma, en la que la alteración principal es la hipocoagulabilidad por activación de la vía de la Proteína C y del sistema fibrinolítico.

UTILIDAD CLÍNICA

Diagnóstico Trombosis de la microcirculación, con su expresión clínica de isquemia y fracaso orgánico y de los estados Hemorrágicos asociados a este cuadro.

Las indicaciones de solicitud de este estudio son:

Infecciones severas/sepsis: por cualquier microorganismo.

Traumatismo: politraumatismo, traumatismo encefálico, embolismo graso.

Destrucción orgánica: pancreatitis severa.

Neoplasias malignas: tumores sólidos, síndromes mielo y linfoproliferativos.

Trastornos obstétricos: embolismo de líquido amniótico, abrupsioplacentae...

Anormalidades vasculares: síndrome de Kasabach-Merrit, aneurismas gigantes.

Fallo hepático grave.

Reacciones tóxicas e inmunológicas: veneno de serpientes, drogas, reacciones transfusionales, rechazo de trasplante

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Se deben realizar las siguientes determinaciones:

Estudios globales de la coagulación: incluye tiempo de tromboplastina parcial, tiempo de protrombina y tiempo de trombina. La normalidad de los mismos no excluye la activación del sistema hemostático. Si están alargados, indica una activación importante de la coagulación, causando una coagulopatía de consumo. Por otro lado, sirven para monitorizar la evolución del proceso y el tratamiento del mismo.

Plaquetas: una cifra normal de plaquetas estable en el tiempo sugiere que la generación de trombina no esté incrementada, mientras que una disminución en el número de las mismas, medidas a intervalos de 1 a 4 horas indica generación de trombina y agregación plaquetaria. Se suele determinar junto con los tests incluidos en el punto anterior.

Fibrinógeno: el consumo de fibrinógeno suele ser un dato analítico tardío en el contexto de una C.I.D.

D-Dímero y Productos de Degradación del Fibrinógeno.

La dinámica de la C.I.D. puede ser valorada midiendo marcadores de activación de la coagulación como el fibrinopéptido A, fragmento 1+2 de la protrombina, complejos trombina – antitrombina (TAT) y fibrina soluble. Estos cuatro marcadores indican la generación de trombina y el efecto de la misma en los factores de coagulación. Los dos primeros no son específicos, ya que se pueden producir en coagulación extravascular asociada a otros problemas, como neumonía peritonitis... En contraste, la presencia de fibrina soluble y de complejos trombina antitrombina en el plasma sólo puede ser generada intravascularmente y representan test diagnósticos específicos de hipercoagulabilidad. Por otro lado, el fibrinopéptido A y los TAT tienen una vida media en plasma muy corta (de minutos) que dificultan su determinación.

La liberación de los fibrinopéptidos A y B da lugar a los monómeros de fibrina, que tienen una tendencia importante a la polimerización, con disminución de la solubilidad en plaquetas y formación de enlaces covalentes cruzados entre los monómeros (factor XIIIa) da lugar al coágulo plasmático (formación de fibrina insoluble). Los monómeros de fibrina se encuentran unidos al fibrinógeno y a varios derivados proteolíticos del fibrinógeno y de la fibrina. Estos complejos solubles los podemos medir con distintas técnicas (paracoagulación, inmunológicas...). Las pruebas de ELISA en la práctica clínica diaria no son útiles pues son métodos laboriosos, los resultados pueden no estar disponibles en un tiempo aceptable, son caros y no disponibles en muchos laboratorios.

REQUISITOS DEL PACIENTE:

No precisa

REQUISITOS DE LA MUESTRA:

Sangre con anticoagulante (citrato): Tubo con tapón azul

VALORES DE REFERENCIA:

Los aplicables a cada una de las pruebas que contiene este perfil

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: 1 día laborable.

Área de Trombosis y Hemostasia Laboratorio de Respuesta Rápida: 45 min.

Área de Trombosis y Hemostasia Core: 1 día laborable.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

La combinación de una serie de pruebas sencillas suele ser suficiente para establecer el diagnóstico. Estas pruebas incluyen recuento de plaquetas, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada, tiempo de trombina, fibrinógeno, PDF, dímero D y morfología de sangre periférica. Sobre la base de algunas de estas pruebas, el Comité de Estandarización de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH) ha propuesto índices de CID establecida o manifiesta, pre-CID o ausencia de CID

Fases	Datos de laboratorio
Fase I. Activación compensada del sistema hemostático No hay hallazgos clínicos	-Aumento de marcadores de activación: F 1+2, trombina- antitrombina. Fibrina soluble. -Disminución de inhibidores: antitrombina III. -No consumo plaquetario ni de factores procoagulantes.

TRANSICIÓN CID ASINTOMÁTICA/SINTOMÁTICA

Fase II. A. Descompensada del sistema hemostático Sangrado por sitios de venopunción y en zonas quirúrgicas. Fallo orgánico.	-Plaquetas y fibrinógeno pueden ser normales. -Consumo (prolongación de tiempos de coagulación). - Alteraciones de la fase anterior.
Fase III. CID Sangrado generalizado. y fracaso multiorgánico	-Coagulopatía de consumo: TTP, TP, TT alargados o incoagulables. Plaquetas menores del 40% del valor inicial. Fibrinógeno, antitrombina y factores de coagulación inferiores al 50% del valor inicial... -Alteraciones de la fase anterior

El diagnóstico de CID une criterios clínicos y de Laboratorio.

CRITERIOS DE LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE TROMBOSIS Y HEMOSTASIA (ISTH):

1. **Valoración clínica del riesgo** ¿Presenta el paciente una enfermedad probablemente asociada con CID manifiesta? Continuar algoritmo sólo si la respuesta es afirmativa

2. Realizar estudio de coagulación con pruebas globales

Recuento de plaquetas/ μL : > 100.000 , < 100.000 o < 50.000 ; 0, 1 y 2 puntos respectivamente

Dímero D: Sin aumento, $\uparrow$ moderado o $\uparrow$ grave; 0, 1 y 2 puntos respectivamente

Tasa de Protrombina: $> 70\%$, $70-55\%$ o $< 55\%$; 0, 1 y 2 puntos respectivamente

Fibrinógeno (g/L): > 1 o < 1 ; 0 y 1 punto respectivamente.

Si tras aplicar este sistema se obtienen cinco o más puntos estamos ante una CID, si se obtienen menos de cinco puntos aplicar el siguiente algoritmo:

3. Realizar las siguientes determinaciones:

Recuento de plaquetas/ μL : > 100.000 , < 100.000 o < 50.000 ; 0, 1 y 2 puntos respectivamente

Dímero D: Sin aumento, $\uparrow$ moderado o $\uparrow$ grave; 0, 1 y 2 puntos respectivamente

Índice de Quick: $> 70\%$, $70-55\%$ o $< 55\%$; 0, 1 y 2 puntos respectivamente

Proteína C: $50-70\%$, $< 50\%$ o $> 70\%$; 0, 1 y 2 puntos respectivamente

Antitrombina: $< 60\%$, $> 60\%$; 0 y 1 punto respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA:

G. Hurtado, MT. Orùe, ML. Antelo, 2008 Coagulación Intravascular diseminada, libro electrónico de temas de urgencias.

Risberg, B; Andreasson, S; Eriksson, E (1991). «Disseminated intravascular coagulation». Acta AnaesthesiolScandSuppl (en inglés) 95: 60–71. PMID 1927229.

Pabón R; Ripoll, Leiria M; Velasco, Gimena F. «Coagulación intravascular diseminada. Historia». 2013.

Taylor FB Jr, Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M; Scientific Subcommittee on Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. ThrombHaemost. 2001 Nov; 86(5):1327-30 2.

Dempfle CE, Wurst M, Smolinski M, Lorenz S, Osika A, Olenik D, Fiedler F, Borggrefe M. Use of soluble fibrin antigen instead of Ddimer as fibrin-related marker may enhance the prognostic power of the ISTH overt DIC score. ThrombHaemost. 2004 Apr;91(4):812-8.

Levi M, Toh CH, Thachil J, Watson HG. Guidelines for the diagnosis and management of disseminated intravascular coagulation. British Committee for Standards in Haematology.Br J Haematol. 2009 Apr; 145(1):24-33.

Iwai K, Uchino S, Endo A, Saito K, Kase Y, Prospective external validation of the new scoring system for disseminated intravascular coagulation by Japanese Association for Acute Medicine (JAAM). Thromb Res. 2010 Sep; 126(3):217-21

Okamoto K, Wada H, Hatada T, Uchiyama T, Kawasugi K, Mayumi T, Gando S, Kushimoto S, Seki Y, Madoiwa S, Asakura H, Koga S, Iba T, Maruyama I; Japanese Frequency and hemostatic abnormalities in pre-DIC patients. Society of Thrombosis Hemostasis/DIC subcommittee. Thromb Res. 2010 Jul;126(1):74-8

Levi M. Japanese consensus for disseminated intravascular coagulation (DIC): is it a small world after all? Thromb Res. 2010 Jan; 125(1)

Determinación de los niveles de Plasminógeno

INFORMACIÓN CLÍNICA

El plasminógeno o profibrinolisisina es una glicoproteína sintetizada por el hígado, presente en el plasma sanguíneo y la mayor parte del extracelular como el precursor inactivo de una enzima proteasa llamada plasmina. Dos glicoformas principales de plasminógeno están presentes en los seres humanos; plasminógeno tipo I contiene dos restos de glicosilación, mientras que el tipo II plasminógeno contiene sólo un único azúcar unida al oxígeno. El Tipo II del plasminógeno está preferentemente presente en la superficie de la célula. Por el contrario, el plasminógeno tipo I aparece reclutado en los coágulos de fibrina.

En la circulación, plasminógeno adopta una conformación cerrada resistente. Tras la unión a coágulos de fibrina, o a la superficie de la célula, el plasminógeno adopta una forma abierta que puede ser convertido en plasmina activa por una variedad de enzimas, incluyendo activador del plasminógeno tisular, activador de plasminógeno uroquinasa, calicreína, y el factor XII.

La fibrina es un cofactor para la activación del plasminógeno por el activador del plasminógeno tisular. La uroquinasa es otro activador del plasminógeno, es un cofactor para la activación del plasminógeno por la uroquinasa activadora del plasminógeno. La conversión de plasminógeno a plasmina implica la escisión del enlace peptídico entre Arg-561 y Val-562.

El plasminógeno es el componente central del sistema fibrinolítico del organismo, es decir, actúa en la fibrinólisis del coagulo de fibrina.

UTILIDAD CLÍNICA

La determinación de los niveles de plasminógeno se puede usar en la monitorización de la terapia fibrinolítica en pacientes con ictus isquémicos, infartos agudos de miocardio o trombosis venosas y arteriales graves en otras localizaciones.

Así mismo esta determinación puede incluirse dentro de los estudios de trombofilia, para completar el estudio diagnóstico de las trombosis idiopáticas en pacientes menores de 50 años, los abortos de repetición o las complicaciones vasculares relacionadas con la gestación.

Se usa como diagnóstico en la coagulopatía intravascular diseminada o en el estado hiperfibrinolítico de los pacientes politraumatizados, en cirugía cardíaca o de trasplantes de órganos

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El plasminógeno en una muestra de plasma se activa a través de reacción con un exceso de estreptoquinasa en presencia de fibrinógeno. El complejo plasminógeno - estreptoquinasa se determina por la velocidad de hidrólisis de un sustrato cromogénico.

El kit de plasminógeno se basa en un sustrato cromogénico sintético los niveles de plasminógeno en el paciente en plasma, se miden automáticamente en los sistemas de coagulación en dos etapas:

1. La incubación del plasma con el reactivo de estreptoquinasa en presencia de fibrinógeno.
2. La cuantificación de los complejos de plasminógeno - estreptoquinasa por un sustrato cromógeno sintético. La nitroanilina liberada se controla cinéticamente a 405 nm y es directamente proporcional al nivel de plasminógeno en la muestra del paciente.

REQUISITOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato): Tubo con tapón azul con arandela negra

VALORES DE REFERENCIA

Plasminógeno	De 0 días a 30 días (41,0 . 82,7)
	De 1 meses a 5 meses (37,6 . 109,6)
	De 6 meses a 11 meses (49,3 - 126,4)
	De 1 años a 5 años (59,6 - 178,00)
	De 6 años a 10 años (52,4 - 158,1)
	De 11 años a 17 años (58,1 - 130,6)
	De 18 a 150 años (80,00 - 140,00)

VALORES CRÍTICOS

No aplica

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: Un día laborable.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La displasmogenemia o los niveles descendidos de plasminógeno congénitos se asocian con trombosis venosa. Existen también deficiencias adquiridas del plasminógeno que están asociados con la terapia trombolítica, sepsis y coagulación Intravascular diseminada.

BIBLIOGRAFIA

Aoki N, Moroi M, Yoshida N, Matsuda M. Abnormal Plasminogen. A Hereditary Molecular Abnormality Found in a Patient with Recurrent Thrombosis, J. Clin. Invest. 1978; 61: 1186-1195.

Robbins KC. Dysplasminogenemias, Prog. Cardiovasc. Disease. 1992; 4: 295- 308.

Latallo ZS, Teisseyre E, Lopaciuk S. Evaluation of a Fibrinolytic Profile of Plasma using Chromogenic Substrates. In: Chromogenic Peptide Substrate. Chemistry and Clinical usage. Scully MK, Kakkar VV (eds), Churchill Livingstone, London. 1979; 262-268.

Gallimore MJ, Aasen AO, Erichsen NS, Larsbraaten M, Lyngaas K, Amundsen E. Plasminogen Concentrations and Functional Activities and Concentration of Plasmin Inhibitors in Plasma Samples from Normal Subjects and Patients with Septic Shock, Thrombosis Research. 1980; 18: 601-608.

Soria J, Soria C, Samama M. A Plasminogen Assay using a Chromogenic Synthetic Substrate. Results from Clinical Work and from Studies of Thrombolysis. In: Progress of Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis. Davidson JF, Rowan RM, Samama MM, Desnoyers PC (eds). Raven Press, New York. 1978; 337-346.

Richmond JY, McKinney RW eds. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, 4th Edition, 1999.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. Fourth, Edition, CLSI Document C3-A4; Vol. 26 No.22.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation and Molecular Haemostasis Assays; Approved Guideline – Fifth Edition, CLSI Document H21-A5; Vol. 28 No. 5.

Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation, Am J. Clin. Pathol. 1970; 53: 924-927.

Westgard JO, and Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC Press 1986.

IFCC Committee Report, J. Clin. Chem. Clin Biochem. 1983; 21: 749-760

Determinación de los niveles del Inhibidor de la plasmina:

INFORMACIÓN CLÍNICA

El inhibidor de la plasmina o α -antiplasmina es una glicoproteína constituida por 500 aminoácidos y un contenido en carbohidratos del 13%, cuyo peso molecular es de 70.000 daltons. Dicha molécula se sintetiza en el hígado. Su vida media es de 2,6 días y su concentración plasmática de 1 mcM.

En el torrente sanguíneo se encuentra de dos formas, un 70% es funcionalmente activa y un 30% inactiva. Es el principal inhibidor fisiológico de la plasmina y representa el 75% de la actividad antiplasmínica del plasma.

En cuanto a su mecanismo de acción, la molécula forma un complejo 1:1 con la plasmina en dos fases: una muy rápida y reversible y otra más lenta e irreversible. La interacción tiene lugar entre los LBS (lysisbinding sites) y el centro activo serina de la plasmina con los lugares correspondientes de la alfa2-antiplasmina. Esta reacción se produce mucho más lentamente cuando los LBS y el centro activo están ocupados, como sucede a nivel de la superficie de la fibrina, de esta manera la vida media de la plasmina ligada a la fibrina es dos a tres veces superior a la de la plasmina libre. Este inhibidor reacciona débilmente con el Glu-plasminógeno y se une de forma covalente a la cadena alfa de la fibrina durante el proceso de la coagulación.

Por consiguiente, se podría concluir que la alfa2-antiplasmina ejerce su efecto inhibitorio sobre la fibrinólisis a tres niveles:

Inactivación rápida de la plasmina

Interferencia con la unión del plasminógeno a la fibrina

Unión covalente con la fibrina, haciendo que ésta sea más resistente a la acción de la plasmina

UTILIDAD CLÍNICA

La determinación de los niveles del inhibidor de la plasmina se utiliza para el despistaje de estados protrombóticos en pacientes con cáncer. Así mismo esta determinación puede incluirse dentro de los estudios de trombofilia, para completar el estudio diagnóstico de las trombosis idiopáticas en pacientes menores de 50 años, los abortos de repetición o las complicaciones vasculares relacionadas con la gestación.

Se usa como diagnóstico y seguimiento en la coagulopatía intravascular diseminada o en el estado hiperfibrinolítico de los pacientes politraumatizados, en cirugía cardíaca o de trasplantes de órganos

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El kit para determinar el Inhibidor de la Plasmina es una técnica basada en un sustrato cromogénico sintético y en la inactivación de la Plasmina. El nivel de Inhibidor de la Plasmina en el plasma de pacientes es medido automáticamente en los sistemas de coagulación en dos etapas:

1. Incubación del plasma con el reactivo Plasmina en presencia de un exceso de metilamina.
2. Cuantificación de la actividad de la Plasmina residual con un sustrato cromogénico sintético. La Paranitroanilina liberada es medida cinéticamente a 405 nm, siendo su nivel inversamente proporcional a la actividad del Inhibidor de la Plasmina de la muestra.

REQUISITOS DEL PACIENTE

No precisa.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citratado): Tubo con tapón azul con arandela negra

VALORES DE REFERENCIA

80.2-132.5%

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se observa disminución del nivel del Inhibidor de la Plasmina en enfermedades hepáticas, y en coagulación Intravascular diseminada. Se han reportado aumentos de su nivel durante periodos post-operatorios.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: Un día laborable.

BIBLIOGRAFÍA

Collen D, Wiman B. Fast-acting Plasmin Inhibitor in Human Plasma, Blood. 1978; 51: 536-569.

Booth NA. The Natural Inhibitors of Fibrinolysis, Haemostasis and Thrombosis. Editors, Bloom AL, Forbes CH, Thomas DP, Tuddenham EGD. Edition 3. 1994; 1: 699-717.

Aoki N, Yamanaka T. The α_2 -Plasmin Inhibitor Levels in Liver Diseases, Clin. Chem. Acta. 1978; 84: 99-105.

Matsuda M, Wakabayashi K, Aoki N, Morioka Y. α_2 -Plasmin Inhibitor is among Acute Phase Reactants, Thromb. Res. 1980; 17: 527-532.

Billing Clason S, Meijer P, Kluft C, Ersdal E. A Novel Method COAMATIC® Plasmin Inhibitor, for the Specific Determination of Plasmin Inhibitor Activity in Plasma, Fibrinolysis. 1996; 10. Suppl. 2: 165-167.

Richmond JY, McKinney RW eds. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, 4th Edition, 1999.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. Fourth, Edition, CLSI Document C3-A4; Vol. 26 No.22

Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth Edition, CLSI Document H21-A5; Vol. 28 No. 5.

Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimen for Coagulation, Am. J. Clin. Pathol. 1970; 53: 924-927.

Westgard JO and Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC press. 1986.

IFCC Committee Report, J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1983; 21: 749-760

Determinación de los niveles de actividad del ADAMS-13 y de su inhibidor

INFORMACIÓN CLÍNICA

El ADAMTS13 es una desintegrina y metaloproteasa con motivo de trombofosfodina tipo 1 que escinde específicamente multímeros de factor von Willebrand (VWF) de gran tamaño en el enlace Tyr1605-Met1606 situado en el dominio A2 del VWF. Si la actividad de ADAMTS13 disminuye, ya sea debido a una mutación hereditaria dentro del gen ADAMTS13, o debido al desarrollo de un autoanticuerpo, la acumulación de multímeros de VWF ultragrandes puede causar una trombosis microvascular debido a la agregación plaquetaria y producir el síndrome potencialmente mortal de la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), un trastorno grave que generalmente se diagnostica a partir de la historia clínica y de parámetros analíticos de rutina.

La determinación de la presencia de inhibidor es muy útil para el diagnóstico diferencial entre PTT congénita y adquirida en este escenario.

UTILIDAD CLÍNICA

Se deben realizar ensayos de la actividad de la ADAMTS13 y su inhibidor para confirmar el diagnóstico de PTT, particularmente en casos difíciles; también se pueden utilizar en la predicción de la recaída de la PTT.

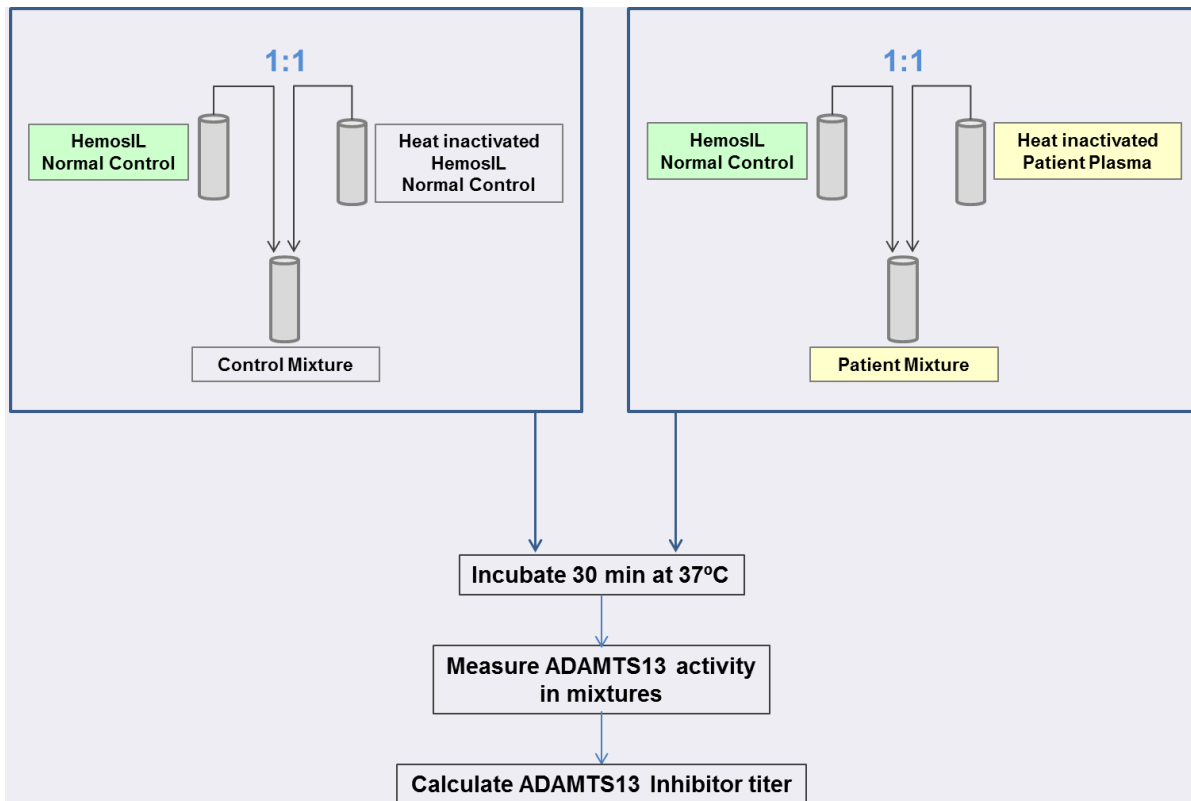
Así mismo esta técnica es de utilidad para el diagnóstico diferencial de las microangiopatías trombóticas en la práctica asistencial.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El ensayo AcuStar ADAMTS13 Activity es un inmunoensayo en dos pasos para cuantificar la actividad de la ADAMTS13 en plasma humano citratado utilizando partículas magnéticas como fase sólida y un sistema de detección quimioluminiscente.

En el primer paso, la muestra se mezcla con el tampón de ensayo y las partículas magnéticas recubiertas con un sustrato peptídico GST-VWF73 recombinante que contiene el punto de escisión de la ADAMTS13 (tirosina1605-metionina1606) por medio de un anticuerpo monoclonal específico anti-glutaminil-S-transferasa (GST). El ADAMTS13 presente en la muestra escinde el sustrato unido a las partículas magnéticas proporcionalmente a su actividad. Después de la separación magnética y el lavado, se añade un anticuerpo monoclonal etiquetado con isoluminol que reacciona específicamente con el péptido escindido (anti-N10) y se incuban en un segundo paso. Tras una segunda separación magnética y lavado, se añaden dos reactivos y se mide la reacción quimioluminiscente en unidades relativas de luz (RLUs) con el sistema óptico ACL AcuStar. Las RLUs son directamente proporcionales a la actividad de la ADAMTS13 en la muestra.

El cálculo de la presencia de inhibidor se realiza mediante un método manual, consistente en un test Bethesda modificado según el siguiente esquema:



REQUISITOS DEL PACIENTE

No existen requisitos específicos

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (citrato): Tubo con tapón azul con arandela negrabilirrubina de hasta 18 mg/dl, triglicéridos de hasta 1250 mg/dl, del anticuerpo antirratón humano (HAMA) de hasta 1 µg/ml, del VWF de hasta 200 UI/dl, y de la LMWH y la UFH de hasta 2 UI/ml.

La presencia del factor reumatoide puede producir una subestimación de los resultados de la prueba con el ADAMTS13 Activity. Es posible que se requieran pruebas adicionales.

VALORES DE REFERENCIA

ADAMTS-13 actividad 60.60-130.60%

ADAMTS-13 Inhibidor: 0.0-0.6 U.B.

VALORES CRÍTICOS

<10% de actividad

>0.6 U.B.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de estas determinaciones se usan para el diagnóstico y la monitorización de la PTT y en el diagnóstico diferencial de otras MAT.

Esta determinación y sus resultados siempre son valoradas por el Facultativo del área.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: Un día laborable para la actividad , en el caso del inhibidor 7 días laborables.

BIBLIOGRAFÍA

KremerHovinga JA, Coppo P, Lämmle B, Moake JL, Miyata T, Vanhoorelbeke K. Thromboticthrombocytopenic purpura. Nat Rev Dis Primers. 2017 Apr 6; 3:17020.

Saha M, McDaniel JK, Zheng XL. Thrombotic thrombocytopenic purpura: pathogenesis, diagnosis and potential novel therapeutics. J ThrombHaemost 2017; 15: 1889–900.

Scully M, Hunt BJ, Benjamin S, Liesner R, Rose P, Peyvandi F, Cheung B, Machin SJ. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. Br J Haematol. 2012; 158:323-35

Scully M, Cataland S, Coppo P, de la Rubia J, Friedman KD, Kremer Hovinga J, L ämmle B, Matsumoto M, Pavenski K, Sadler, E, Sarode R, Wu H, for the International Working Group for Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. J ThrombHaemost 2017; 15: 312–22.

Masias C, Cataland SR. The role of ADAMTS13 testing in the diagnosis and management of thrombotic microangiopathies and thrombosis. Blood 2018; 132:903-91

Richmond JY, McKinney RW eds. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, 4th Edition, 1999

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing

Plasma-Based Coagulation and Molecular Hemostasis Assays; Approve Guideline, Fifth Edition, CLSI/NCCLS Document H21-A5; Vol. 28 No. 5.

Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation, Am. J. Clin. Pathol. 1970; 53: 924-92.

Westgard JO, and Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC Press 1986

Hubbard AR, Heath AB, Kremer Hovinga JA; Subcommittee on von Willebrand Factor. Establishment of the WHO 1st International Standard ADAMTS13, plasma (12/252): communication from the SSC of the ISTH. J ThrombHaemost. 2015; 13:1151-1153.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory. 3th ed. Wayne, PA: The Institute; 2010. (CLSI Doc; 28, 30). 76 p. EP28-A3c

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved guideline. Third edition. Wayne, PA: The Institute; 2014. (CLSI Doc; 34, 12). 120 p. EP5-A3.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved. 3rd ed. CLSI guideline EP09c. Wayne, PA: 2018

Sadler JE, Moake JL, Miyata T, George JN. Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2004:407-23

The Instrumentation Laboratory logo, HemosIL, ACL, ACL Elite and ACL TOP are trademarks of Instrumentation Laboratory Company and/or one of its subsidiaries or parent companies, and may be registered in the United States Patent and Trademark Office and in other jurisdictions.

Función plaquetaria global

INFORMACIÓN CLÍNICA

El sistema PFA -100 es un sistema de análisis compuesto por un instrumento y cartuchos de prueba, en el cual se simula in vitro el proceso de adhesión y agregación de las plaquetas que ocurre tras una lesión vascular. Este sistema de función plaquetaria permite el reconocimiento de anomalías de la función plaquetaria ya sean congénitas, adquiridas o inducidas por inhibidores de la agregación plaquetaria. Las causas más frecuentes de una alteración de la función plaquetaria son la uremia, la Enfermedad de VonWillebrand y la toma de distintos fármacos como el ácido acetil salicílico y otros antiagregantes.

UTILIDAD CLÍNICA

Es una prueba de screening de la función plaquetaria que tras diversos estudios clínicos ha demostrado capacidad y en el diagnóstico y monitorización de las siguientes situaciones clínicas:

Despistaje de trombopatías congénitas o adquiridas como test inicial de screening previo a la realización de la agregación plaquetaria.

Despistaje de la trombopatías asociada a la enfermedad de Von Willebrand.

Detección de la antiagregación por ácido acetil salicílico.

Control del riesgo de hemorragia preoperatoria, los pacientes con alteraciones en este test presentan más sangrados intraoperatorios y mayor terapia transfusional frente a aquellos donde se demuestra por este método una función plaquetaria normal.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El sistema PFA 100 permite la evaluación rápida de la función plaquetaria en muestras pequeñas de sangre citratada, en base al método de Kratzer y Born. El cartucho de prueba en este sistema está compuesto por varios componentes integrados, incluyendo un capilar un depósito para las muestras y una membrana biológicamente activa con orificio central. La muestra de la sangre total citratada va a ser aspirada por un capilar a través del orificio mencionado anteriormente, por lo que las plaquetas van a estar expuestas a altas pruebas de cizalladura. La membrana de este dispositivo está cubierta con colágeno que actúa como matriz inicial para la adhesión de las plaquetas que al contactar con el colágeno se activarán (primer impulso fisiológico). Por otro lado, la membrana va a estar recubierta con otros agonistas fisiológicos de las plaquetas como ADP o epinefrina.

Tras todo este proceso activador las plaquetas se unirán a la membrana activándose, secretando sus gránulos y adhiriéndose formando agregados que irán obturando el orificio del paso de la sangre hasta impedir el paso de la misma. Dicha obturación medida por agregometría óptica se transformará en tiempo de obturación, por cambios en la turbidez detectados por variaciones en la luz transmitida (tiempo de obturación).

REQUISITOS DEL PACIENTE

Se precisa información clínica de si el paciente toma tratamiento antiagregante y que tipo toma para evaluar correctamente la monitorización ha dicho tratamiento.

El paciente no debe haber recibido antiinflamatorios no esteroideos o cualquier otro fármaco que altere la función plaquetaria 10 días antes, cuando lo que se pretenda evaluar es la existencia o no de trombopatías congénitas o adquiridas.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (Citrato): Tubo de tapón azul con arandela negra para las pruebas de Hemostasia, sin centrifugar y debe llegar al laboratorio en mano (no por tubo neumático).

VALORES DE REFERENCIA:

Col/EPI: 84-160s

Col /ADP: 68-121 S

VALORES CRÍTICOS

No aplican

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los tiempos de obturación alargados para cada uno de los test de este estudio tienen sus propias interpretaciones patológicas:

Col/EPI: El alargamiento del tiempo de obturación de este test nos va a orientar para el diagnóstico de defectos intrínsecos de las plaquetas, EVW o por la toma de inhibidores de la agregación plaquetaria.

Col /ADP: Fundamentalmente los tiempos alargados en este parámetro se corresponden con la presencia de ácido acetil salicílico en la muestra o antiagregantes tipo inhibidores del ADP.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: Un día laborable.

BIBLIOGRAFÍA

Jilma B. Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 2001; 138:152-163.

Favaloro EJ. Clinical application of the PFA-100. Current opinion in hematology 2002; 9:407- 415.

Franchini M. The platelet-function analyzer (PFA-100) for evaluating primary hemostasis. Hematology 2005; 10:177-181.

Homoncik M, Jilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Panzer S, Speiser W. Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. Thrombosis and Haemostasis 2000; 83:316-321

Feuring M, Schultz A, Losel R, Wehling M. Monitoring acetylsalicylic acid effects with the platelet function analyzer PFA-100. Seminars in thrombosis and Hemostasis 2005; 31:411-415

Schlamadinger A, Kerenyi A, Muszbek L, Boda Z. Comparison of the O'Brien filter test and the PFA-100 platelet analyzer in the laboratory diagnosis of von Willebrand's disease. Thrombosis and Haemostasis 2000; 84:88-92.

Jambor C, von Pape KW, Spannagl M, Dietrich W, Giebl A, Weisser H. Multiple electrode whole blood aggregometry, PFA-100, and in vivo bleeding time for the point-of-care assessment of aspirin-induced platelet dysfunction in the preoperative setting. Anesthesia and Analgesia 2011; 113:31-39.

Cariappa R, Wilhite TR, Parvin CA, Luchtman-Jones L. Comparison of PFA-100 and bleeding time testing in pediatric patients with suspected hemorrhagic problems. Journal of Pediatric Hematology/Oncology: official journal of the American Society of Pediatric Hematology/Oncology 2003; 25:474-479.

Podda GM, Bucciarelli P, Lussana F, Lecchi A, Cattaneo M. Usefulness of PFA-100 testing in the diagnostic screening of patients with suspected abnormalities of hemostasis: comparison with the bleeding time. Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH 2007; 5:2393-2398

Karger R, Reuter K, Rohlf J, Nimsky C, Sure U, Kretschmer V. The Platelet Function Analyzer (PFA-100) as a screening tool in neurosurgery. ISRN Hematol 2012; 2012:839242

Favaloro EJ. Time for a conceptual shift in assessment of internal quality control for whole blood or cell-based testing systems? An evaluation using platelet function and the PFA-100 as a case example. Clin Chem Lab Med 2013; 51:767- 774.

Ertug Z, Celik U, Hadimioglu N, Dinckan A, Ozdem S. The assessment of PFA-100 test for the estimation of blood loss in renal transplantation operation. Annals of transplantation: quarterly of the Polish Transplantation Society 2010; 15:46-52.

Agregación plaquetaria:

INFORMACIÓN CLÍNICA

Como consecuencia de la activación por contacto con sustancias extrañas se producen cambios en la forma y función plaquetaria que incluyen la exposición de las glicoproteínas de membrana IIb-IIIa que son sitios de unión para el fibrinógeno (y otros). El fibrinógeno actúa como puente entre receptores de plaquetas adyacentes, produciéndose como resultado la agregación plaquetaria.

Usando distintos agonistas que activen las plaquetas se puede medir el efecto antitrombótico de ciertos fármacos y se puede llegar al diagnóstico de trombopatías.

UTILIDAD CLÍNICA

Las plaquetas no solo desempeñan un papel fundamental en la hemostasia fisiológica, sino también en el desarrollo de la trombosis arterial (infarto de miocardio e ictus). Las pruebas de función plaquetaria se usan para analizar trastornos de dicha función, ya sean hereditarios o adquiridos, para comprobar su funcionamiento en anestesia y cuidados intensivos, así como para monitorizar los antagonistas de la función plaquetaria.

Análisis de los trastornos plaquetarios: Diversos fármacos y patologías, así como factores genéticos pueden provocar disfunción plaquetaria que puede causar una tendencia hemorrágica transitoria o permanente. El test de agregación plaquetaria ayuda al diagnóstico y al manejo terapéutico de los pacientes con trombopatías.

La función plaquetaria en enfermos críticos (UVI, Anestesia, Cirugía cardíaca, trasplantes de órganos sólidos...): La disfunción plaquetaria puede provocar graves complicaciones hemorrágicas en este tipo de pacientes. La detección o exclusión de esta disfunción antes de procedimientos invasivos o en pacientes con trastornos hemorrágicos puede ayudar a la estratificación del riesgo y al manejo de estas situaciones.

Monitorización del tratamiento antiplaquetario: Los antiagregantes plaquetarios son algunos de los fármacos más comúnmente administrados en la medicina moderna. Una combinación de ácido acetil salicílico con un antagonista del receptor de ADP (clopidogrel, prasugrel o ticagrelor) es el tratamiento antiplaquetario principal para pacientes con síndrome coronario agudo (SCA) y/o intervenciones coronarias con colocación de stent. Conocer el grado de respuesta a los antiagregantes, ya que el 20% de la población es resistente a ellos y conocer el grado de cumplimiento, resulta fundamental para evitar complicaciones graves e incluso mortales en los procedimientos de implantación de stent (coronarios, intracraneales...) así como en la prevención secundaria tras un evento isquémico de cualquier localización

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Describimos el procedimiento según cada agonista plaquetario utilizado:

ADP test: El reactivo ADPtest contiene ADP, que desencadena la activación plaquetaria a través de los receptores de ADP de las plaquetas. En la celda de medición las plaquetas activadas se adhieren y agregan en los filamentos detectores. Ello provoca una mayor resistencia entre dichos detectores, que es registrada de forma continua y se expresa mediante el área bajo la curva (AUC) ($AU \cdot \min$ o U; conversión: $1 U = 10 AU \cdot \min$). El ensayo ADPtest es sensible a la inhibición del receptor P2Y₁₂ así como a la ausencia del receptor GpIIb/IIIa.

ASPI Test: El reactivo ASPI Test contiene ácido araquidónico que es convertido en tromboxano A₂ por la ciclooxygenasa plaquetaria. Las plaquetas activadas en la celda de medición se adhieren y agregan sobre los filamentos de cobre. Ello provoca un aumento de la resistencia entre dichos detectores que es registrada de forma continua y expresada a través del área bajo la curva (AUC ($AU \cdot \min$ o U; conversión: $1 U = 10 AU \cdot \min$). El ASPItest es sensible a una inhibición de la ciclooxygenasa plaquetaria, así como a una inhibición o ausencia del receptor GpIIb/IIIa.

TRAP test: El péptido activador del receptor de trombina-6 (TRAP-6) es un potente activador plaquetario que estimula la agregación de las plaquetas a través del receptor de trombina PAR-1, dando lugar a una fuerte activación plaquetaria. Resultados expresados como área bajo la curva (AUC).

RISTO Test: El reactivo RISTOtest contiene ristocetina. El RISTOtest, dependiendo del procedimiento de pipeteo utilizado, puede ser aplicado en dos concentraciones:

Con el procedimiento de pipeteo para RISTO high se aplica una alta concentración de ristocetina (0.77 mg/mL) lo que normalmente induce una fuerte agregación plaquetaria. Con el procedimiento de pipeteo RISTOlow, la concentración de ristocetina aplicada es menor (0.2 mg/mL) lo que por lo general no induce una fuerte respuesta de agregación. Resultados expresados como área bajo la curva (AUC).

COL Test: El reactivo COLtest contiene colágeno (tipo I) que activa las plaquetas a través de sus receptores de colágeno. Tras la unión del colágeno a sus receptores se libera el ácido araquidónico que es el sustituto de la enzima plaquetaria ciclooxygenasa la cual transforma el ácido araquidónico en tromboxano A₂, un potente activador plaquetario.

REQUISITOS DEL PACIENTE

Se precisa información clínica de si el paciente está bajo tratamiento antiagregante y que tipo toma para evaluar correctamente la monitorización ha dicho tratamiento.

El paciente no debe haber recibido antiinflamatorios no esteroideos o cualquier otro fármaco que altere la función plaquetaria 10 días antes, cuando lo que se pretenda evaluar es la existencia o no de trombopatías congénitas o adquiridas.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (Hirundina): Tubo Hirundina 1.6 mL con tapón verde y debe llegar al laboratorio en mano antes de 3 horas (no por tubo neumático).

VALORES DE REFERENCIA

ASPI test: 86-162 A.U.C.

ADP Test: 53-140 A.U.C.

TRAP Test: 97-182 A.U.C.

RISTO Test High: 98-180 A.U.C.

RISTO Test Low: 1-20 A.U.C.

COL Test: 72-125 A.U.C.

VALORES CRÍTICOS

No aplican

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Dependiendo de los resultados de este estudio con los distintos agonistas se puede interpretar como déficit de agregación aquellos valores por debajo de los intervalos de referencia expresados en AUC, o como un aumento de función plaquetaria aquellos valores por encima de los rangos de referencia antes mencionados. Todo ello nos ayuda al diagnóstico de trombopatías, monitorización del tratamiento antiagregante o a identificar estados protrombóticos.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: Un día laborable o supeditado al tiempo de respuesta a otras muestras de hemostasia especial cuando se solicite de forma conjunta a las mismas

BIBLIOGRAFÍA

Zhang, H. Z., Yu, L. H., & Kim, M. H. (2013). Effect of different anticoagulants on multiple electrode platelet aggregometry after clopidogrel and aspirin administration in patients undergoing coronary stent implantation: A comparison between citrate and hirudin. *Platelets*, 24(5): 339-347.

Beynon, C., Sakowitz, O. W., & Unterberg, A. W. (2013). Multiple electrode aggregometry in antiplatelet-related intracerebral haemorrhage. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*

Di Dedda, U., Ranucci, M., Baryshnikova, E., & Castelveccchio, S. (2013). Thienopyridines resistance and recovery of platelet function after discontinuation of thienopyridines in cardiac surgery patients. *European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardiothoracic Surgery*.

Siller-Matula, J. M., Delle-Karth, G., Christ, G., Neunteufl, T., Maurer, G., Huber, K., et al. (2013). Dual non-responsiveness to antiplatelet treatment is a stronger predictor of cardiac adverse events than isolated non-responsiveness to clopidogrel or aspirin. *International journal of cardiology*, 167(2): 430-435

Christ, G., Hafner, T., Siller-Matula, J. M., Francesconi, M., Grohs, K., Wilhelm, E., et al. (2013). Platelet Inhibition by Abciximab Bolus-Only Administration and Oral ADP Receptor Antagonist Loading in Acute Coronary Syndrome Patients: The Blocking and Bridging Strategy. *Thrombosis research*

Emeklibas, N., Kammerer, I., Bach, J., Sack, F. U., & Hellstern, P. (2013). Preoperative hemostasis and its association with bleeding and blood component transfusion requirements in cardiopulmonary bypass surgery. *Transfusion*, 53(6)

Gremmel, T., Perkmann, T., Seidinger, D., Koppensteiner, R., Panzer, S., Kopp, C. W., et al. (2013). Differential Impact of Inflammation on Six Laboratory Assays Measuring Residual Arachidonic Acid-Inducible Platelet Reactivity During Dual Antiplatelet Therapy. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*

Jakubowski, J. A., Zhou, C., Small, D. S., Winters, K. J., Lachno, D. R., Frelinger, A. L., 3rd, et al. (2013). A phase 1 study of prasugrel in patients with sickle cell disease: pharmacokinetics and effects on ex vivo platelet reactivity. *British journal of clinical pharmacology*, 75(6): 1433-1444.

Panova-Noeva, M., Marchetti, M., Russo, L., Tartari, C. J., Leuzzi, A., Finazzi, G., et al. (2013). ADP-induced platelet aggregation and thrombin generation are increased in Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera. *Thrombosis research*.

Reddel, C. J., Curnow, J. L., Voitl, J., Rosenov, A., Pennings, G. J., Morel-Kopp, M. C., et al. (2013). Detection of hypofibrinolysis in stable coronary artery disease using the overall haemostatic potential assay. *Thrombosis research*, 131(5).

Johnston, L. R., Larsen, P. D., La Flamme, A. C., & Harding, S. A. (2013). Methodological considerations for the assessment of ADP induced platelet aggregation using the Multiplate(R) analyser. *Platelets*, 24(4): 303-307.

Marschner, C.B., Kristensen, A.T., Spodsberg, E.H., Wiinberg, B. (2012). Evaluation of platelet aggregometry in dogs using the Multiplate platelet analyzer: impact of anticoagulant choice and assay duration. *J Vet Emerg Crit Care*; 22(1): 107–115.

Görlinger, K., Dirkmann, D., Hanke, A.A., Kamler, M., Kottenberg, E., Thielmann, M., Jakob, H., Peters, J. (2011). First-line Therapy with Coagulation Factor Concentrates Combined with Point-of-Care Coagulation Testing Is Associated with Decreased Allogeneic Blood Transfusion in Cardiovascular Surgery: A Retrospective, Single-center Cohort Study. *Anesthesiology*. Dec;115(6):1179-91.

Solomon, C., Hartmann, J., Osthaus, A., Schöchl, H., Raymondos, K., Koppert, W., Rahe-Meyer, N. (2010). Platelet concentrates transfusion in cardiac surgery in relation to preoperative point-of-care assessment of platelet adhesion and aggregation. *Platelets* 21(3):221-8.

Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ, Minford A, Mumford AD, Parapia LA, Perry DJ, Watson SP, Wilde JT, Williams MD; UKHCDO. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UK HCDO. *Br J Haematol* 2006; 135:603–33.

Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: A report from the Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. *ThrombHaemost* 2009; 7:1029.

Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F. Platelet aggregation studies: Autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica* 2007; 92:694–7.

Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Clinical, laboratory and therapeutic aspects of platelet-type von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol* 2008; 30:91–4.

Jennings I, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Platelet function testing: practice among UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation participants, 2006. *J Clin Pathol* 2008; 61:950–4.

Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: An adjustment for platelet count is not necessary. *ThrombHaemost* 2008; 6:677–83

Monitorización de los antiagregantes (VerifyNow)

INFORMACIÓN CLÍNICA

En general, las pruebas de función plaquetaria miden la actividad de las plaquetas.

Entre los antiagregantes los más usados son, el ácido acetilsalicílico (aspirina) y los inhibidores P2Y12

Verifynow detecta la actividad plaquetaria midiendo la agregación plaquetaria in vitro en una muestra de sangre expuesta a agonistas específicos. Esto incluye la inhibición de la actividad plaquetaria en respuesta a los distintos agentes antiagregantes usados en distintas indicaciones clínicas.

El sistema VerifyNow es midela agregación como un aumento en la transmitancia de la luz. Consiste en un instrumento turbidimétrico de detección óptica, con dispositivos de ensayo de un solo uso y controles de calidad asociados.

UTILIDAD CLÍNICA

Al menos 1 de cada 3 pacientes en terapias antiplaquetarias no reciben el efecto fisiológico deseado y la respuesta individual a las terapias antiplaquetarias puede cambiar con el tiempo.El 40 % de los pacientes que reciben clopidogrel pueden no responder adecuadamente a la terapia. Por otro lado, la hiperrespuestade los antiagreantes se asocia con un mayor riesgo de hemorragias. Por tanto, poder valorar efectoantiagrenate en distintos pacientes y escenario mejora los resultados incrementando la seguridad de las terapias que se indican.

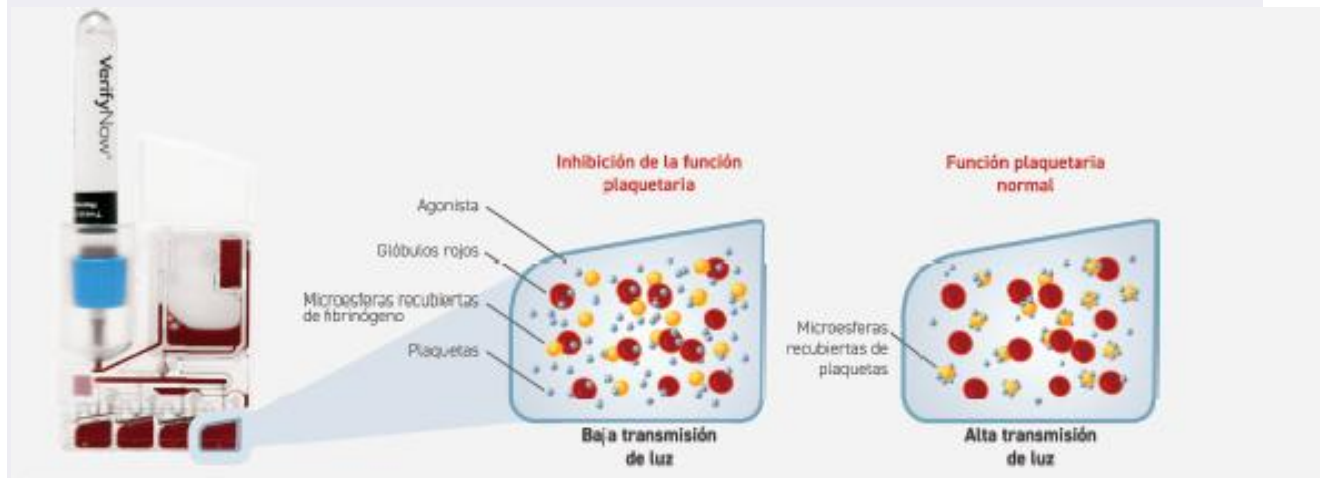
DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Mediante la tecnología de correlacionada con la agregometría de trasmisión de luz (LTA)

El ensayo de aspirina VerifyNow es una prueba cualitativa para la detección de disfunción plaquetariadebida a la ingestión de AAS en sangre total para diagnóstico de laboratorio. El ensayo incorpora el agonista ácido araquidónico para activar las plaquetas y mide función plaquetaria basada en la capacidad de las plaquetas activadas para unirse al fibrinógeno. Las micropartículas recubiertas de fibrinógeno se agregan en la sangre total en proporción al número de receptores de plaquetas GP IIb / IIIa activados. Si el AAS ha producido esperado efecto antiplaquetario , dicha agregación se reducirá. El ensayo de aspirina VerifyNow informa el grado de agregación plaquetaria como unidades de reacción de aspirina (ARU).

El ensayo VerifyNow P2Y12 es un ensayo en sangre total que se utiliza en el laboratorio o en el diagnóstico de laboratorio para medir el bloqueo del receptor P2Y12. El ensayo incorpora el agonista ADP para activar las plaquetas. Este método también usa PGE1 para aumentar el AMPc y reducir la contribución del receptor P2Y1 en la activación. El ensayo mide la función de las plaquetas basada en la capacidad de las plaquetas activadas para unirse al fibrinógeno. Recubierto de fibrinógeno las

micropartículas se agregan en la sangre entera en proporción al número de receptores de plaquetas GP IIb / IIIa; y si el inhibidor P2Y12 ha producido el esperado efecto antiplaquetario, dicha agregación se reducirá. Los informes del ensayo VerifyNow P2Y12 expresan el grado de agregación plaquetaria en las unidades de reacción P2Y12 (PRU) y el porcentaje de inhibición. PRU informa la cantidad de agregación mediada por ADP específica para la plaqueta P2Y12 receptor, y se calcula en función de la velocidad y extensión de la agregación plaquetaria en el canal ADP. El porcentaje de inhibición (%) es el cambio porcentual desde la agregación inicial, y se calcula a partir del resultado de PRU y un resultado base. El resultado base es una medición independiente basada en la velocidad y extensión de la agregación plaquetaria de los receptores de trombina, específicamente los receptores PAR-1 y PAR-4. Para activar las plaquetas, el canal de base incorpora el péptido activador de los receptores de trombina (iso-TRAP) y Péptido activador de PAR-4 (PAR-4 AP) para los canales PAR-1 y PAR-4 respectivamente.



Método simplificado de funcionamiento del VerifyNow

REQUISITOS DEL PACIENTE

Se precisa información clínica de si el paciente está bajo tratamiento antiagregante y que tipo toma para evaluar correctamente la monitorización ha dicho tratamiento.

El paciente no debe haber recibido antiinflamatorios no esteroideos o cualquier otro fármaco que altere la función plaquetaria 10 días antes, cuando lo que se pretenda evaluar es la existencia o no de trombotopatías congénitas o adquiridas.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (Hirundina): Tubo Azul citrato Arandela Blanca y debe llegar al laboratorio en mano antes de 3 horas (no por tubo neumático).

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En el caso del TEST de Aspirina hablaremos de No Respondedor si el resultado es > 550 ARU Y Respondedor si resultado < 550 ARU

En el caso del test del P2Y12 será No Respondedor si > 240 PRU o (% de inhibición < 17 %) y será Respondedor (*) si < 240 PRU (% de inhibición > 17 %)

No obstante, de lo anterior los informes de Laboratorio siempre van con una interpretación del facultativo que valida la técnica con las distintas matizaciones en caso de ser necesario según el escenario

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Especial: Un día laborable.

.

Referencias

1. Gurbel PA, et al. Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. J Am Coll Cardiol. 2007; 50(19):1822–34.
2. Krasopoulos G, et al. Aspirin “resistance” and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. BMJ. 2008; 336(7637):195–8.
3. Steinhubl SR, et al. Point-of-care measured platelet inhibition correlates with a reduced risk of an adverse cardiac event after percutaneous coronary intervention: results of the GOLD (AU - Assessing Ultegra) multicenter study. Circulation. 2001; 103(21): 2572–8.
4. Stone G, et al. Platelet reactivity and clinical outcomes after coronary artery implantation of drug-eluting stents (ADAPT-DES): a prospective multicenter registry study. Lancet. 2013; 382(9892):614–23.
5. Aradi D, et al Bleeding and Stent Thrombosis on P2Y12 -inhibitors: Collaborative Analysis on the Role of Platelet Reactivity for Risk Stratification after Percutaneous Coronary Intervention. European Heart Journal. 2015; 36(27):1762–71.
6. Delgado Almandoz JE, et al. Variability in initial response to standard clopidogrel therapy, delayed conversion to clopidogrel hyper-response, and associated thromboembolic and hemorrhagic complications in patients undergoing endovascular treatment of unruptured cerebral aneurysms. Journal of NeuroInterventional Surgery. 2014; 6:767–73.
7. Brizzio ME, et al. Use of an objective tool to assess platelet inhibition prior to off-pump coronary surgery to reduce blood usage. J Invasive Cardiol. 2012;24(2):49–52.
8. Serebruany, VL, et al. Variability in Platelet Responsiveness to Clopidogrel among 544 Individuals. Journal of the American College of Cardiology, vol. 45, nº 2, 2005, pp. 246–251.

9. Price MJ, et al. Recovery of platelet function after discontinuation of prasugrel or clopidogrel maintenance dosing in aspirin-treated patients with stable coronarydisease; the recovery trial. J Am Coll Cardiol. 2012; 59(25): 2338–43.
10. PRUtestVerifyNow [Ficha Técnica del Producto]. San Diego, CA; AccrivaDiagnostics.
11. Prueba de Aspirina VerifyNow [Ficha Técnica del Producto]. San Diego, CA; AccrivaDiagnostics.

Tromboelastometría por Rotación (ROTEM)

INFORMACIÓN CLÍNICA

El uso de la Tromboelastometría para la valoración del Sistema Hemostático del paciente tanto para diagnóstico como para Tratamiento se base en el siguiente principio técnico:

La Tromboelastometría es un método de diagnóstico (viscoelástico) por la que las propiedades de coagulación (hemostasia) pueden ser examinadas en sangre total. El sistema ROTEM mide la interacción de los factores de coagulación, inhibidores y componentes de la célula, mientras que se forma el coágulo y en la lisis posterior. Las condiciones reológicas de este método imitan el flujo de sangre estancada en las venas Este método ahora mejorado, que fue desarrollado en 1948 por Hartert.

Una muestra de sangre total se coloca en una cubeta y un sensor cilíndrico se sumerge. Entre el sensor y la cubeta existe un espacio de 1 mm, unido por puentes establecidos por la sangre total dispensada para el análisis. El sensor es rotado por un resorte hacia la derecha y la izquierda. Mientras la sangre que es un tejido líquido, restringe dicho movimiento. Cuando se inicia el proceso de coagulación, el coágulo restringe cada vez la rotación de la clavija con el aumento de la firmeza del coágulo. Este cambio se detecta por cinética mecánica y se calcula a través de un ordenador integrando las curvas típicas de coagulación (TEMogram) y emite parámetros numéricos para valorar la normalidad del proceso.

UTILIDAD CLÍNICA

ROTEM[®] detecta etapas hipo e hiperfuncionantes del proceso de coagulación. Los resultados están rápidamente disponibles en menos de 5 -15 minutos y permiten un diagnóstico diferencial de los distintos trastornos de la hemostasia. Cuando se utiliza unido a la historia del paciente y al cuadro clínico, ROTEM ayuda a discriminar entre el sangrado quirúrgico, un trastorno de la hemostasia primaria o secundaria, y la hiperfibrinólisis. Estos resultados también pueden ayudar a determinar el grado de coagulopatía dilucional, la necesidad de transfusión de fibrinógeno, de plaquetas o plasma y permite monitorizar los efectos de las distintas dosis de heparina y de su reversión con protamina.

Por otro lado, este método también es capaz de detectar estados de hipercoagulabilidad pudiendo orientar en las decisiones de terapia antitrombotica en situaciones difíciles y que no pueden ser correctamente valoradas por los parámetros clásicos

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Tromboelastometría es un método viscoelástico para las pruebas de la hemostasia en la sangre entera. ROTEM[®] mide las interacciones de los factores de coagulación, inhibidores y componentes celulares durante las fases de coagulación y la posterior lisis en el tiempo. Las condiciones reológicas de este método imitan el flujo lento de la sangre en las venas. Es sistema que consiste en una mejora de la TEG (tromboelastografía tradicional[®]) método desarrollado por Hartert en 1948.

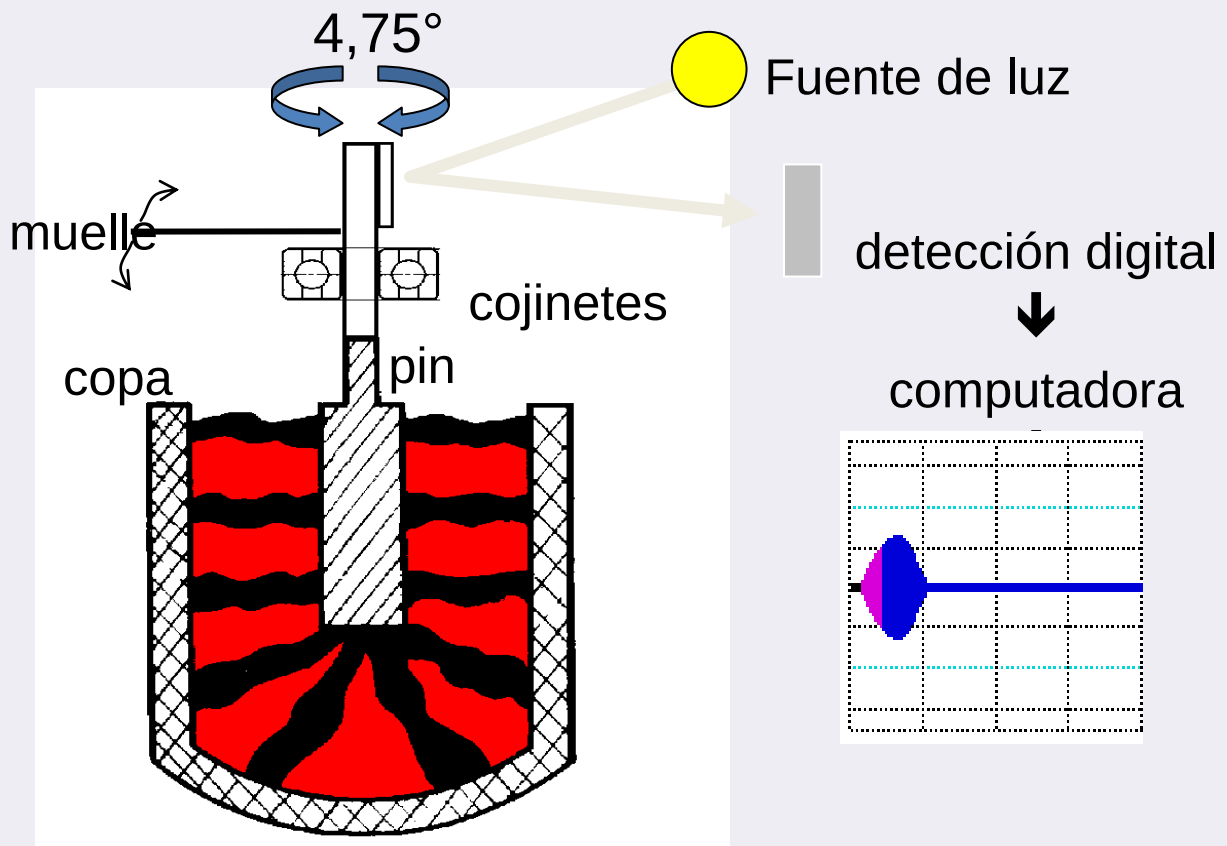
La muestra de sangre citratada se coloca en una cubeta y un brazo cilíndrico se sumerge. Entre pin y cubeta permanece un espacio de 1 mm, con puentes generados por la sangre. El cilindro es rotado por un resorte hacia la derecha y la izquierda. Mientras la sangre es líquida, el movimiento es libre. Cuando la sangre comienza la coagulación, el coágulo restringe cada vez la rotación del cilindro con el aumento de la firmeza del coágulo. Esta cinética se detecta mecánicamente y se calcula en un PC integrando a las curvas típicas y transformándose también en parámetros numéricos.

Con esta técnica somos capaces de detectar etapas hipo e hiperfuncionantes del proceso de coagulación. Los resultados rápidamente disponibles permiten un diagnóstico diferencial basando en la funcionalidad de la hemostasia en vivo. Se puede discriminar entre sangrado quirúrgico y un trastorno de la hemostasia subyacente (Coagulopatía, hiperfibrinólisis...)

Estos hallazgos nos ayudaran a orientar la terapia transfusional y hemostática más adecuada en los momentos de compromiso hemostático grave.

Como ventaja respecto al sistema TEG el sistema ROTEM no se ve influido por las vibraciones mecánicas (golpes, vibraciones por autoanalizadores o aparataje cercano...) siendo sus resultados más fiables.

> ROTEM[®] Método de Detección



REQUISITOS DEL PACIENTE

Se precisa información clínica de si el paciente está bajo tratamiento antiagregante o anticoagulante y que tipo de antitrombotico toma para evaluar correctamente la monitorización ha dicho tratamiento.

Así mismo para decidir los test que incorporamos en la determinación inicial, es necesario conocer el diagnóstico por el que se solicita este estudio, lo que se traducirá en mayor eficiencia y efectividad sobre las decisionesterapéuticas que se tomen para el paciente.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (Citrato): Tubo de tapón azul 4.5 mL. Enviar al laboratorio de Respuesta Rápida de Trombosis y Hemostasia por tubo neumático (debe llamarse previamente al Laboratorio para informar de que se solicita esta prueba).

VALORES DE REFERENCIA

	CT	CFT	MCF	ML
	<i>Tiempo de coagulación [s]</i>	<i>Tiempo de formación del coagulo [s]</i>	<i>Firmeza máxima del coagulo [mm]</i>	<i>Lisis máxima [% de MCF]</i>
	35-80	35-160	53-72	< 15
	100-240	35-110	53-72	< 15
	100-240	35-110	53-72	< 15
	<i>Un CT del HEPTTEM significativamente corto al compararlo con el INTEM es indicativo de efecto de</i>			
	35-80	35-160	53-72	< 15
	<i>Una coagulación mejorada (acortamiento de CFT, MCF mas alto) en el test APTTEM comparado con EXTEM es un</i>			
			8-20	
	<i>MCF < 8 mm → Nivel de fibrinógeno reducido o polimerización afectada. Terapia: infusión de fibrinógeno (o grandes cantidades de FFP). MCF > 20 mm → Nivel de fibrinógeno elevado. Esto puede conseguir una formación normal del coagulo</i>			

VALORES CRÍTICOS

No aplican

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Dependiendo de los resultados numéricos obtenidos y de las gráficas obtenidas, se pueden diferenciar varios patrones típicos de alteraciones hemostáticas

MCF

MCF > 72 mm: Elevada reserva hemostática

MCF 53-72 mm: Rango normal

MCF 46-52 mm: Desajuste hemostático con reserva reducida

MCF 45-40 mm: Riesgo de hemorragia

MCF 39-30 mm: Alto riesgo de hemorragia

MCF < 30 mm: Normalmente hemostasia ineficaz

CFT

CFT 35-160 s: Rango normal

CFT 160-220 s: Desajuste hemostático con reserva reducida

CFT 220-300 s: Riesgo de hemorragia

CFT 300-400 s: Alto riesgo de hemorragia

CFT > 400 s: Normalmente hemostasia ineficaz

Fibrinólisis

Lisis del coagulo antes de 20 minutos (lisis fulminante): Normalmente hemorragia aguda

Lisis del coagulo entre 20-40 minutos: Alto riesgo de hemorragia

Lisis del coagulo después de más de 40 minutos: Frecuentemente clínicamente no significativa , Aunque puede aumentar el riesgo a lisis fulminante en determinados casos

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia Laboratorio de Respuesta Rápida : 45 minutos.

Existe la posibilidad de consultar las gráficas y resultados en tiempo real a través de la aplicación instalada en todos los ordenadores del centro mediante una página web.

BIBLIOGRAFÍA

Reproducibility of thromboelastometry (ROTEM): Point of care versus hospital laboratory performance. Thorsteen Hass, Nelly Spielmann et al.; Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Rotation Thromboelastometry (ROTEM) stability and reproducibility over time. Oliver Michel Theusinger, Johannes Nümborg, Lars M. Armis et al. Institute of anesthesiology, clinic of hematology and Biostatistics in Zurich, Switzerland. Multicentric comparison of single portion and liquid reagents for thromboelastometry. Niels Rahe-Meyer, Cristina Solomon ET al. Blood coagulation and fibrinolysis 2009, Vol 20 Nº2

European Guidelines on severe bleeding management: Recommendations dealing with viscoelastic testing and goal-directed therapy. Febrero de 2013.

Klaus Görlinger, Dr. med, Daniel Dirkmann, Dr. med, Alexander A. Hanke, Dr. med, Markus Kamler, Dr. med, Eva Kottenberg, Dr. med, Matthias Thielmann, Dr. med, Heinz Jakob, Dr. med, Jürgen Peters, Dr. med. Et al. First-line Therapy with Coagulation Factor Concentrates Combined with Point-of-Care Coagulation Testing is Associated with Decreased Allogeneic Blood Transfusion in Cardiovascular Surgery A Retrospective, Single-center Cohort Study.

Levrat A, Gros A, Ruggeri L. Evaluation of rotation thromboelastography for the diagnosis of hyperfibrinolysis in trauma patients. British journal of anesthesiology: 792-7; 2008.

2013. Documento Sevilla de Consenso sobre Alternativas a la Transfusión de Sangre Alogénica. Actualización del Documento Sevilla, S.R. Leal-Noval a, *, M. Muñoz ~ a, M. Asuero b, E. Contreras et al. Sociedad Española de Medicina Intensiva, Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC) b Sociedad Española de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor (SEDAR) c Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), Transfusión Sanguínea (SETS), Trombosis y Hemostasia (SETH) d Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH).

Koller T, Paniagua P, Gil JM et al. Eficacia y Eficiencia de la tromboelastometría (ROTEM) en el manejo del sangrado postcirugía cardíaca con circulación extracorpórea. Experiencia Hospital Sant Creu y Sant Pau .Barcelona.

2013. Documento Sevilla de Consenso sobre Alternativas a la Transfusión de Sangre Alogénica. Actualización del Documento Sevilla, S.R. Leal-Noval a, *, M. Muñoz ~ a, M. Asuero b, E. Contreras et al. Sociedad Española de Medicina Intensiva, Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC) b Sociedad Española de Anestesiología, Reanimación y Terapéutica del Dolor (SEDAR) c Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH), Transfusión Sanguínea (SETS), Trombosis y Hemostasia (SETH) d Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria (SEFH).

Rotation thromboelastometry detects thrombocytopenia and hypofibrinogenaemia during orthotopic liver transplantation S. Roulet1*, J. Pillot1, G. Freyburger2, M. Biais1, A. Quinart1, A. Rault3, P. Revel1 and F. Sztark1 British Journal of Anaesthesia 104 (4): 422–8 (2010).

Thromboelastometry to Guide Recombinant Activated Factor VII Therapy for Postoperative Refractory Intracranial Bleeding Yuji Hirasaki, MD, Yoshihiro Suematsu, MD, PhD, Tadanobu Yasuda, MD, PhD,

Keiichi Tajima, MD Department of Anesthesia, Tsukuba Memorial Hospital Tsukuba, Ibaraki, Japan
International Anesthesia Research Society Vol. 110, No. 1, January 2010.

Haemostatic monitoring during postpartum haemorrhage and implications for management C. Solomon, R.E. Collis, P.W. Collins, Department of Anaesthesiology and Intensive Care, Salzburger Landeskliniken SALK, 5020 Salzburg, Austria, Department of Anaesthesia, University Hospital of Wales, Cardiff, UK, Department of Haematology, School of Medicine, Cardiff University, Cardiff, UK British Journal of Anaesthesia.

Comparison of thromboelastometry (ROTEM®) with standard plasmatic coagulation testing in paediatric surgery T. Haas^{1*}, N. Spielmann¹, J. Mauch¹, C. Madjdpour¹, O. Speer^{2,3,4}, M. Schmutz² and M. Weiss; Department of Anaesthesia, Department of Haematology, and Children's Research Center, University Children's Hospital Zurich, 4 Zurich Center for Integrative Human Physiology, University of Zurich, Institute of Physiology. British Journal of Anesthesia;

Early and individualized goal-directed therapy for trauma-induced coagulopathy Herbert Schoechl, Marc Maegele, Cristina Solomon, Klaus Goerlinger, Wolfgang Voelckel Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine 2012, Plasma Expanded Redding Management

Impact of experimental haemodilution on platelet function, thrombin generation and clot firmness: effects of different coagulation factor concentrates; Carolina Caballo, Gines Escolar, Maribel Diaz-Ricart, Irene Lopez-Vilchez, Miguel Lozano, Joan Cid, Marcos Pino, Joan Beltrán, Misericordia Basora², Arturo Pereira¹, Ana Maria Galan¹

Haemotherapy-Haemostasis Department, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona; Department of Anaesthesiology, Hospital Clinic, Barcelona, Spain

Thromboelastometry in patients with severe sepsis and disseminated intravascular coagulation; Mirka S, Ville P et al. Blood coagulation and Fibrinolysis 2009; 20: 419-426.

Linda Shore-Lesserson, MD*, Heather E. Manspeizer, MD*, Marietta DePerio, RN*, Sanjeev Francis, BS*, Frances Vela-Cantos, RN*, and M. Arisan Ergin, MD, PhD†. Thromboelastography-Guided Transfusion Algorithm Reduces Transfusions in Complex Cardiac. Cardiovascular Anaesthesia 2014

Klaus Görlinger, Dr. med, Daniel Dirkmann, Dr. med, Alexander A. Hanke, Dr. med, Markus Kamler, Dr. med, Eva Kottenberg, Dr. med, Matthias Thielmann, Dr. med, Heinz Jakob, Dr. med, Jürgen Peters, Dr. med. Et al. First-line Therapy with Coagulation Factor Concentrates Combined with Point-of-Care Coagulation Testing is Associated with Decreased Allogeneic Blood Transfusion in Cardiovascular Surgery A Retrospective, Single-center Cohort Study

Anderson L, Quasim I., Soutar, R et al. An audit of red cell and blood product use after institution of thromboelastometry in a cardiac intensive care unit. Transfusion medicine 2006, 16, 31-39.

Goerlinger K, Dirkmann A, Hanke F, Dusse M, Harmann. Reduction of blood transfusion and cost saving by thromboelastometry-based point of care coagulation management in visceral and transplantation surgery. Euroanaesthesia 2008

Recomendaciones NHS QualityImprovement Scotland recomienda el uso de la Tromboelastografía / Tromboelastometría (TE) en cirugía cardíaca y trasplante hepático. Counsel Del Health technology Assessment 11 – junio 2008.

HTA Programme: Health Technology Assessment Report 11 – June 2008. The clinical and cost effectiveness of thromboelastography / thromboelastometry(NHS Scotland 2008)

Spalding Grit J., HartrumpfM,Sierig T, Oesberg N et al. Cost reduction of perioperative coagulation management in cardiac surgery: Value of bedside thromboelastographyRotem. European Journal of Cardio-thoracic surgery; 2007

Koller T, Paniagua P, Gil JM et al. Eficacia y Eficiencia de la tromboelastometría (ROTEM) en el manejo del sangrado postcirugía cardiaca con circulación extracorpórea. Experiencia Hospital Sant Creu y Sant Pau .Barcelona.

Linda Shore-Lesserson, MD*, Heather E. Manspeizer, MD*, Marietta DePerio, RN*, Sanjeev Francis, BS*, Frances Vela-Cantos, RN*, and M. ArisanErgin, MD, PhD†. Thromboelastography-Guided Transfusion Algorithm Reduces Transfusions in Complex Cardiac. Cardiovascular Anaesthesia 2014.

Test de Generación de Trombina

INFORMACIÓN CLÍNICA

El test de generación de trombina (TGT) evalúa la capacidad de formación de trombina total de la muestra en estudio tras la activación de la coagulación. En la actualidad, la técnica más utilizada es la trombinografía automática calibrada (CAT, CalibratedAutomatedThrombogram), Se trata de una técnica muy versátil que permite el análisis de la muestra en presencia o ausencia del factor tisular y fosfolípidos, con plasma pobre en plaquetas (PPP) o plasma rico en plaquetas (PRP), todo ello en función de la variable que se desee estudiar.

Este test no va a permitir medir la generación total de trombina, dado que los estudios básicos de coagulación actuales sólo permiten medir el 5% de la trombina generada. Por este hecho es un test mucho más sensible y específico para definir el riesgo hemorrágico y trombótico en determinadas situaciones.

UTILIDAD CLÍNICA

Este método tiene las siguientes utilidades:

Evaluación del riesgo trombótico:

- Deficiencias en AT, Proteína C y Proteína S
- Resistencia a la PC debido a FV Leiden
- Mutaciones protrombina 20210A que lleva a hiperprotrombinemia

- Recurrencia del VTE durante o posterior a la anticoagulación oral

Evaluación del riesgo de sangrado:

- En hemofilia y otras coagulopatías
- Pacientes con Hemorragia crítica
- Trombocitopenias

Evaluación de fármacos anticoagulantes inhibidores directos Anti Xa y IIa, HBPM y HNF o VKA: La generación de trombina correlación con el nivel de inhibición del sistema hemostático. Dependiendo del fármaco administrado, se ven influenciados todos o algunos de los parámetros del trombograma

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

La medición de fluorescencia se realiza en plasma destrombocitado, que debe prepararse conforme a las instrucciones incluidas en los folletos de los paquetes de kits de reactivos.

Se añade un sustrato fluorógeno (ZGGR-AMC) "STG®-FluoStart". La trombina generada en la muestra separa el aminometil cumarina (AMC) de fluorocromo del sustrato. La fluorescencia en aumento de la muestra se mide cada 15-20 segundos. Una muestra puede analizarse con distintos activadores. La principal señal medida muestra la fluorescencia que la trombina ha generado en la muestra. La primera derivada de esta señal medida representa los niveles de trombina activa, que ya posee aspecto de un Trombograma. Esta curva debe corregirse para varios factores de influencia y convertirse de FU (unidades de fluorescencia) en trombina nanomolar (nM) a fin de proporcionar el Trombograma final.

Existen tres kits distintos de reactivos dependiendo de lo que se quiera evaluar:

BleedScreen Mezcla de FL y baja concentración de FT

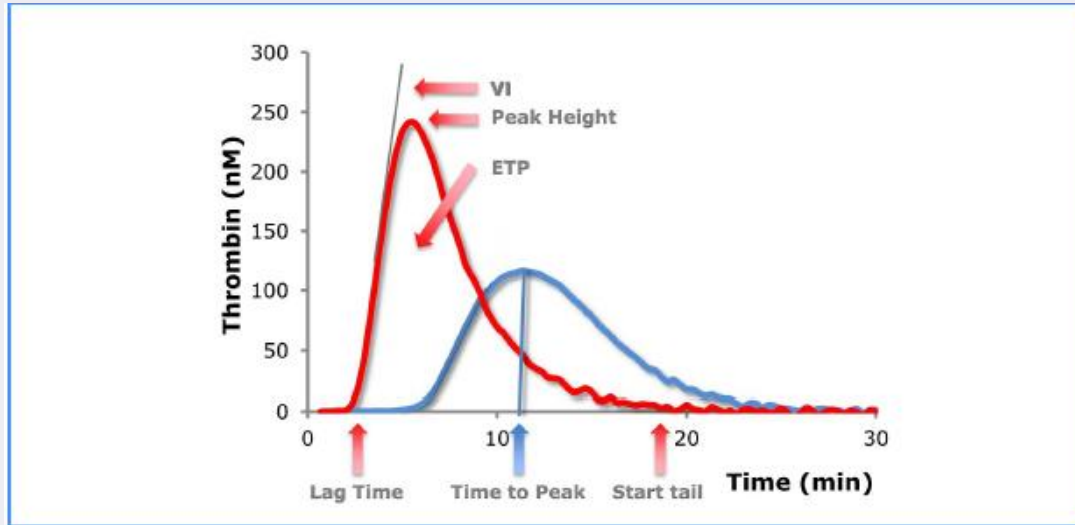
- Evaluación del riesgo de sangrado en la hemofilia grave
- Estudios de las discrepancias entre los métodos cromogénicos y coagulativos en la hemofilia moderada y leve

DrugScreen Mezcla de FL y alta concentración de FT

- Monitorización de anticoagulantes orales (inhibidores de FXa y trombina)
- Monitorización del tratamiento con heparina
- Monitorización del tratamiento con antagonistas de la vitamina K

ThromboScreen Mezcla de FL y baja concentración de FT con y sin trombomodulina

- Monitorización de anticoagulantes orales(AVK/ACOD) y parenterales (Heparinas y Heparinoides)



Curva Tipo que se obtiene en el test de Generación de Trombina

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No precisa

REQUERIMIENTOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (Citrato): Tubo de tapón azul 4.5 ML

VALORES DE REFERENCIA

Informe de resultados interpretativo con la gráfica obtenida

Por otro lado, en cada determinación se comparan los resultados obtenidos con los de un plasma normal obteniéndose el siguiente perfil analítico:

Parámetros	Definición	Unidad (absoluta)	Unidad (normalizada)
Lag Time	Tiempo entre la adición de cloruro de calcio y el momento en que se inicia de verdad la formación de trombina	minutos (min)	cociente
Peak Height	Máximo nivel de trombina alcanzado.	trombina nanomolar (nM)	porcentaje (%)
Time to Peak	Tiempo entre la adición de cloruro de calcio y el momento en que se alcanza la Peak Height. Este también es el momento en que la velocidad de la conversión de protrombina y la inactivación de trombina son iguales.	minutos (min)	cociente
Potencial endógeno de la trombina (ETP)	Área debajo de la curva de generación de trombina.	trombina nanomolar multiplicada por minuto (nM.min)	porcentaje (%)
Velocity index	Máxima velocidad de generación de trombina entre Lag Time y Time to Peak.	trombina nanomolar por minuto (nM/min)	porcentaje (%)
Start Tail	Momento en el que los niveles de trombina vuelven a cero.	minutos (min)	cociente
Inhibición de ETP	Se determina únicamente si se realiza una prueba con y sin trombomodulina. Inhibición de la generación de trombina de una muestra, inducida por este agente externo.	porcentaje (%)	No aplicable

Parámetros obtenidos, dependiendo que se usen los reactivos Drug-Screen para ACOD, AVK, HNFA, HBPM y heparinoides, bleeding-screen para trastornos hemorrágicos congénitos y/o adquiridos o el Trombo-screen para trombofilia y estados protrombóticos, la interpretación de los resultados tendrá sus peculiaridades. El facultativo de Área al realizar la valoración interpretará la gráfica y transcribirá un breve comentario para la correcta interpretación de la prueba.

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los parámetros obtenidos dependiendo que se usen los reactivos Drug-Screen para ACOD, AVK, HNFA, HBPM y heparinoides, bleeding-screen para trastornos hemorrágicos congénitos y /o adquiridos o el Trombo-screen para trombofilia y estados protrombóticos son levemente distintos. La interpretación de los resultados tendrá sus peculiaridades. El facultativo de Área al realizar la valoración interpretará la gráfica y transcribirá un breve comentario para la correcta interpretación de la prueba.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Trombosis y Hemostasia: 30 días

Para casos urgentes donde el tratamiento del paciente dependa del resultado: 7 días.

BIBLIOGRAFÍA:

Baglin T. The measurement and application of thrombin generation. Br J Haematol. 2005; 130: 653-61.

Hemker HC. Recollections on thrombin generation. J Thromb Haemost. 2008; 6: 219-26.

Castoldi E, Rosing J. Thrombin generation tests. Thromb Res. 2011; 127 (Suppl 3): S21-5.

Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Giesen PL, Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. Haematologica. 2003; 88: 547-54.

Beltran-Miranda CP, Khan A, Jaloma-Cruz AR, Laffan MA. Thrombin generation and phenotypic correlation in haemophilia A. Haemophilia. 2005; 11: 326-34.

Santagostino E, Mancuso ME, Tripodi A, Chantarangkul V, Clerici M, Garagiola I, et al. Severe hemophilia with mild bleeding phenotype: molecular characterization and global coagulation profile. J Thromb Haemost. 2010; 8: 737-43.

Lewis SJ, Stephens E, Florou G, Macartney NJ, Hathaway LS, Knipping J, et al. Measurement of global haemostasis in severe haemophilia A following factor VIII infusion. Br J Haematol. 2007; 138: 775-82.

Turecek PL, Varadi K, Keil B, Negrier C, Berntorp E, Astermark J, et al. Factor VIII inhibitor-bypassing agents act by inducing thrombin generation and can be monitored by a thrombin generation assay. Pathophysiol Haemost Thromb. 2003; 33: 16-22.

Livnat T, Martinowitz U, Zivelin A, Seligsohn U. Effects of factor VIII inhibitor bypassing activity (FEIBA), recombinant factor VIIa or both on thrombin generation in normal and haemophilia A plasma. *Haemophilia*. 2008; 14: 782-6.

Dargaud Y, Lambert T, Trossaert M. New advances in the therapeutic and laboratory management of patients with haemophilia and inhibitors. *Haemophilia*. 2008; 14 (Suppl 4): 20-7. 11. Dargaud Y, Lienhart A, Negrier C. Prospective assessment of thrombin generation test for dose monitoring of bypassing therapy in hemophilia patients with inhibitors undergoing elective surgery. *Blood*. 2010; 116: 5734-7.

Klintman J, Berntorp E, Astermark J, Group MS. Thrombin generation in vitro in the presence of bypassing agents in siblings with severe haemophilia A. *Haemophilia*. 2010; 16: e210-5.

Livnat T, Martinowitz U, Zivelin A, Rima D, Kenet G. A highly sensitive thrombin generation assay for assessment of recombinant activated factor VII therapy in haemophilia patients with an inhibitor. *ThrombHaemost*. 2011; 105: 688-95.

Fernández-Bello I, Stenmo C, Butta N, Lind V, Ezban M, Jiménez-Yuste V. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-dose and multiple-dose recombinant activated factor VII in patients with haemophilia A or B. *Haemophilia*. 2017. doi: 10.1111/hae.13312.

Nummi V, Jouppila A, Lassila R. Monitoring once-weekly recombinant factor IX prophylaxis in hemophilia B with thrombin generation assay and factor IX activity. *Int J Lab Hematol*. 2017; 39: 359-68.

Pavlova A, Delev D, Pezeshkpoor B, Müller J, Oldenburg J. Haemophilia A mutations in patients with non-severe phenotype associated with a discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assays. *ThrombHaemost*. 2014; 111: 851-61.

Simioni P, Castoldi E, Lunghi B, Tormene D, Rosing J, Bernardi F. An underestimated combination of opposites resulting in enhanced thrombotic tendency. *Blood*. 2005; 106: 2363-5.

Castoldi E, Simioni P, Tormene D, Thomassen M, Spiezia L, Gavasso S, et al. Differential effects of high prothrombin levels on thrombin generation depending on the cause of the hyperprothrombinemia. *J ThrombHaemost*. 2007; 5: 971-9.

Alhenc-Gelas M, Canonico M, Picard V. Influence of natural SERPINC1 mutations on ex vivo thrombin generation. *J ThrombHaemost*. 2010; 8: 845-8.

Castoldi E, Maurissen LF, Tormene D, Spiezia L, Gavasso S, Radu C, et al. Similar hypercoagulable state and thrombosis risk in type I and type III protein S-deficient individuals from families with mixed type I/III protein S deficiency. *Haematologica*. 2010; 95: 1563-71.

Tripodi A, Martinelli I, Chantarangkul V, Battaglioli T, Clerici M, Mannucci PM. The endogenous thrombin potential and the risk of venous thromboembolism. *Thromb Res*. 2007; 121: 353-9. 22. Hron G, Kollars M, Binder BR, Eichinger S, Kyrle PA. Identification of patients at low risk for recurrent venous thromboembolism by measuring thrombin generation. *JAMA*. 2006; 296: 397-402.

AREA DE CITOGENÉTICA HEMATOLÓGICA

Cariotipo

INFORMACIÓN CLÍNICA

Las anomalías cromosómicas son frecuentes en las neoplasias hematolinfoides. El estudio de anomalías numéricas o estructurales es fundamental para el correcto diagnóstico, pronóstico y seguimiento de distintas enfermedades hematológicas como la leucemia linfocítica crónica, la leucemia mieloide crónica, leucemias agudas, neoplasias mieloides, linfomas o mielomas múltiples. La utilidad clínica en cada una de estas enfermedades excede el propósito de esta biblioteca de pruebas

UTILIDAD CLÍNICA

Asistir en el diagnóstico y clasificación de enfermedades hematolinfoides. Evaluación pronóstica en enfermedades hematolinfoides. Monitorización de la eficacia del tratamiento. Monitorización de pacientes en remisión.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Cultivo celular para producir uno o varias extensiones celulares para conseguir capturar y analizar 20 o más metafases. Se pueden realizar otras técnicas adicionales a criterio del laboratorio.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No aplica

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Médula ósea con anticoagulante (Heparina NA). (Contenedor): Tubo de tapón verde para Citogenética

Pieza de adenopatía (Tejido-Biopsia) (Contenedor): Contenedor estéril.

Sangre con anticoagulante (Heparina NA). (Contenedor): Tubo de tapón verde para Citogenética

Punción aspiración con aguja fina con anticoagulante (Heparina NA). (Contenedor): Tubo de tapón verde para Citogenética

Líquido cefalorraquídeo con anticoagulante (Heparina NA). (Contenedor): Tubo de tapón verde para Citogenética

Otros líquidos biológicos con anticoagulante (Heparina NA). (Contenedor): Tubo de tapón verde para Citogenética

Otras muestras pueden ser aceptables a partir de los estudios del laboratorio y/o tras discusión con el laboratorio.

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

Informe de resultados interpretativo

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Por parte de los facultativos de citogenéticahematológica. Se emitirá un informe con la fórmula cromosómica y un comentario interpretativo a ésta.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Citogenética Hematológica: 30 días desde la recepción de la muestra en el laboratorio

Para casos urgentes donde el tratamiento del paciente dependa del resultado: 10 días.

BIBLIOGRAFÍA

Algara P, Mateo MS, Sánchez-Beato M, et al. Analysis of the IgV (H) somatic mutations in splenic marginal zone lymphoma defines a group of unmutated cases with frequent 7q deletion and adverse clinical course. *Blood* 2002; 99(4):1299-304.

Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23(26):6306-15.

Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* 2011; 117(8): 2319-31.

Available prognostic models for risk stratification of diffuse large B cell lymphoma patients: a systematic review. Jelcic J, Larsen TS, Maksimovic M, Trajkovic G. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019 Jan; 133:1-16.

Bejar R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2014; 99:956-964.

Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. Baliakas P et al. ERIC, the European Research Initiative on CLL. *Blood*. 2019 Mar 14;133(11):1205-1216.

Cytogenetics in the genomic era. Granada I, Palomo L, Ruiz-Xivillé N, Mallo M, Solé F. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2020 Sep;33(3):101196.

Cytogenetics of Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Review of the Current Knowledge. Quessada J, Cuccuini W, Saultier P, Loosveld M, Harrison CJ, Lafage-Pochitaloff M. *Genes (Basel)*. 2021 Jun 17;12(6):924.

Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. Liu Y, Barta SK. *Am J Hematol*. 2019 May;94(5):604-616.

Follicular lymphoma. Carbone A, Roulland S, Gloghini A, Younes A, von Keudell G, López-Guillermo A, Fitzgibbon J. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Dec 12;5(1):83

Genetic Aspects of Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms. Palomo L, Acha P, Solé F. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 27;13(9):2120.

Haase D, Germsing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; 110(0006-4971; 13):4385-4395

Should IGHV status and FISH testing be performed in all CLL patients at diagnosis? A systematic review and meta-analysis. Parikh SA, Strati P, Tsang M, West CP, Shanafelt TD. *Blood*. 2016 Apr 7;127(14):1752-60.

Sole F, Luno E, Sanzo C, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005; 90(1592-8721; 9):1168-1178.

Steensma DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility: a paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. J Mol Diagn 2006; 8(4):397-411.

Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2017.

T-cell lymphoblastic lymphoma and leukemia: different diseases from a common premalignant progenitor? Kroeze E, Loeffen JLC, Poort VM, Meijerink JPP. Blood Adv. 2020 Jul 28;4(14):3466-3473.

Teerenhovi L, Knuutila S, Ekblom M, et al. A method for simultaneous study of the karyotype, morphology, and immunologic phenotype of mitotic cells in hematologic malignancies. Blood 1984;64(5):1116-22.

West AH, Godley LA, Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations. Ann N Y Acad Sci. 2014; 1310:111-118.

Hibridación in situ fluorescente (FISH)

INFORMACIÓN CLÍNICA

Las anomalías cromosómicas son frecuentes en distintas neoplasias hematolinfoides. El estudio de anomalías numéricas o estructurales es fundamental para el correcto diagnóstico, pronóstico y seguimiento de distintas enfermedades hematológicas como la leucemia linfocítica crónica, la leucemia mieloide crónica, leucemias agudas, neoplasias mieloides, linfomas o mielomas múltiples. La utilidad clínica en cada una de estas enfermedades excede el propósito de esta biblioteca de pruebas

UTILIDAD CLÍNICA

Asistir en el diagnóstico y clasificación de enfermedades hematolinfoides. Evaluación pronóstica en enfermedades hematolinfoides. Monitorización de la eficacia del tratamiento. Monitorización de pacientes en remisión.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

La técnica de FISH permite detectar y localizar secuencias específicas de ácidos nucleicos sobre preparaciones cromosómicas, extensiones celulares y cortes de tejido.

Se realizará separación de la población de células plasmáticas en el estudio citogenético de las gammapatías.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No aplica

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Médula ósea con anticoagulante (Heparina NA). (Contenedor): Tubo de tapón verde para Citogenética

Pieza de adenopatía (Tejido-Biopsia) (Contenedor): Contenedor estéril.

Células plasmáticas separadas en gradiente de densidad a partir de la muestra de médula ósea en mielomas y amiloidosis. (Contenedor): tubo de tapón verde para Citogenética.

Sangre con anticoagulante (Heparina NA). (Contenedor): Tubo de tapón verde para Citogenética

Punción aspiración con aguja fina con anticoagulante (Heparina NA). (Contenedor): Tubo de tapón verde para Citogenética

Líquido cefalorraquídeo con anticoagulante (Heparina NA). (Contenedor): Tubo de tapón verde para Citogenética

Otros líquidos biológicos con anticoagulante (Heparina NA). (Contenedor): Tubo de tapón verde para Citogenética

Otras muestras pueden ser aceptables a partir de los estudios del laboratorio y/o tras discusión con el laboratorio.

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

Informe de resultados interpretativo

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Por parte de los facultativos de Citogenética Hematológica. Se emitirá un informe con las sondas utilizadas y un comentario interpretativo a éste.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Citogenética Hematológica: 30 días desde la recepción de la muestra en el laboratorio

Para casos urgentes donde el tratamiento del paciente dependa del resultado: 10 días.

BIBLIOGRAFÍA

Algara P, Mateo MS, Sánchez-Beato M, et al. Analysis of the IgV (H) somatic mutations in splenic marginal zone lymphoma defines a group of unmutated cases with frequent 7q deletion and adverse clinical course. *Blood* 2002; 99(4):1299-304.

Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23(26):6306-15.

Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, et al. Double-hit B-cell lymphomas. *Blood* 2011; 117(8): 2319-31.

Available prognostic models for risk stratification of diffuse large B cell lymphoma patients: a systematic review. Jelacic J, Larsen TS, Maksimovic M, Trajkovic G. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019 Jan;133:1-16.

Bejar R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2014; 99:956-964.

Cytogenetic complexity in chronic lymphocytic leukemia: definitions, associations, and clinical impact. Baliakas P et al. ERIC, the European Research Initiative on CLL. *Blood*. 2019 Mar 14;133(11):1205-1216.

Cytogenetics in the genomic era. Granada I, Palomo L, Ruiz-Xivillé N, Mallo M, Solé F. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2020 Sep;33(3):101196.

Cytogenetics of Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Review of the Current Knowledge. Quessada J, Cuccuini W, Saultier P, Loosveld M, Harrison CJ, Lafage-Pochitaloff M. *Genes (Basel)*. 2021 Jun 17;12(6):924.

Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. Liu Y, Barta SK. *Am J Hematol*. 2019 May;94(5):604-616.

Follicular lymphoma. Carbone A, Roulland S, Gloghini A, Younes A, von Keudell G, López-Guillermo A, Fitzgibbon J. *Nat Rev Dis Primers*. 2019 Dec 12;5(1):83

Genetic Aspects of Myelodysplastic/Myeloproliferative Neoplasms. Palomo L, Acha P, Solé F. *Cancers (Basel)*. 2021 Apr 27;13(9):2120.

Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 2007; 110(0006-4971; 13):4385-4395

Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2012; 122:3407-3415.

Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. Rajkumar SV. *Am J Hematol*. 2020 May;95(5):548-567.

Myelodysplastic syndromes: 2021 update on diagnosis, risk stratification and management. García-Manero G, Chien KS, Montalban-Bravo G. *Am J Hematol*. 2020 Nov;95(11):1399-1420.

PLZF-RAR α , NPM1-RAR α , and Other Acute Promyelocytic Leukemia Variants: The PETHEMA Registry Experience and Systematic Literature Review. Marta Sobas et al. *Cancers (Basel)*. 2020 May 21;12(5):1313.

Should IGHV status and FISH testing be performed in all CLL patients at diagnosis? A systematic review and meta-analysis. Parikh SA, Strati P, Tsang M, West CP, Shanafelt TD. *Blood*. 2016 Apr 7;127(14):1752-60.

Sole F, Luno E, Sanzo C, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2005; 90(1592-8721; 9):1168-1178.

Steensma DP. JAK2 V617F in myeloid disorders: molecular diagnostic techniques and their clinical utility: a paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. *J Mol Diagn* 2006;8(4):397-411. quiz 526.

Swerdlow SH, Campo E, Lee Harris N, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2017.

T-cell lymphoblastic lymphoma and leukemia: different diseases from a common premalignant progenitor? Kroeze E, Loeffen JLC, Poort VM, Meijerink JPP. *Blood Adv*. 2020 Jul 28;4(14):3466-3473.

Teerenhovi L, Knuutila S, Ekblom M, et al. A method for simultaneous study of the karyotype, morphology, and immunologic phenotype of mitotic cells in hematologic malignancies. *Blood* 1984;64(5):1116-22.

West AH, Godley LA, Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations. *Ann N Y Acad Sci*. 2014; 1310:111-118.

Wolff DJ, Bagg A, Cooley LD, et al. Guidance for fluorescence in situ hybridization testing in hematologic disorders. J Mol Diagn 2007; 9(2):134-43.

Microarrays de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP arrays)

INFORMACIÓN CLÍNICA

El desarrollo de la tecnología y la informática ha facilitado la creación de plataformas que permiten el análisis de todo el genoma a una alta resolución, estas plataformas son los microarrays. Los microarrays genómicos de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) hibridan en matrices sólidas que contienen SNP que pueden cubrir gran parte del genoma, lo que permite detectar cambios genéticos de hasta 15 kb. El análisis de microarrays es un proceso automatizado y sus resultados pueden ser más objetivos y sistemáticos que los análisis de cariotipo o FISH. Este análisis tiene una alta resolución para anomalías desequilibradas (ganancias y pérdidas) que pueden escapar a la detección por cariotipo e incluso FISH. Una ventaja adicional de las plataformas de SNP array es su capacidad para detectar la pérdida de heterocigosidad sin alteración en el número de copias (CN-LOH). Además, la determinación de la diferenciación alélica en los arrays de SNP también permite detectar el tipo de ploidía.

UTILIDAD CLÍNICA

Asistir en el diagnóstico y clasificación de enfermedades hematolinfoides. Evaluación pronóstica en enfermedades hematolinfoides.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El procedimiento técnico de los microarrays dependerá de las especificaciones de la plataforma y se deberán seguir estrictamente las instrucciones y recomendaciones del fabricante. En nuestro caso (SNP array) se trata de una hibridación del ADN de la muestra directamente sobre las sondas del microarray. En un primer momento se realiza una PCR, en este proceso el DNA se digiere mediante enzimas de restricción, seguidamente unos adaptadores específicos que reconocen estos fragmentos generados se ligan al DNA y por último se amplifican estos fragmentos. A continuación, el producto de la PCR se purifica y se fragmenta. Estos fragmentos de DNA se marcan homogéneamente y se hibridan sobre el microarray. Finalmente, tras los lavados, se procede al escaneado y análisis de las imágenes obtenidas.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No aplica

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Médula ósea con anticoagulante (Heparina/EDTA). (Contenedor): Tubo de tapón verde/morado para Citogenética.

Pieza de adenopatía (Tejido-Biopsia) (Contenedor): Contenedor estéril.

Sangre con anticoagulante (Heparina/EDTA). (Contenedor): Tubo de tapón verde/morado para Citogenética.

Otras muestras pueden ser aceptables a partir de los estudios del laboratorio y/o tras discusión con el laboratorio.

VALORES DE REFERENCIA

Informe de resultados interpretativo

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Por parte de los facultativos de Citogenética Hematológica. Se emitirá un informe con la tecnología utilizada, limitaciones del estudio y un comentario interpretativo.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Citogenética Hematológica: 60 días desde la recepción de la muestra en el laboratorio

BIBLIOGRAFÍA

Espinete B, Blanco ML, Costa D, Cuatrecasas E, Ruiz-Xivillé N et al. Análisis citogenómicos aplicados a neoplasias hematológicas. 2021. ISBN: 978-84-09-29357-5.

Safavi S, Hansson M, Karlsson K, Biloglav A, Johansson B, Paulsson K. Novel gene targets detected by genomic profiling in a consecutive series of 126 adults with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015 Jan;100(1):55-61. PMID:25261097.

Puiggros A, Puigdecane E, Salido M, Ferrer A, Abella E, Gimeno E, et al. Genomic arrays in chronic lymphocytic leukemia routine clinical practice: ¿are we ready to substitute conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization techniques? *Leuk Lymphoma*. 2013 May;54(5):986-95. PMID: 22994157.

Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, Gouraud W, Charbonnel C, Harousseau JL, et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2009 Sep 20;27(27):4585-90. PMID: 19687334.

Zaliova M, Stuchly J, Winkowska L, Musilova A, Fiser K, Slamova M, et al. Genomic landscape of pediatric B-other acute lymphoblastic leukemia in a consecutive European cohort. *Haematologica*. 2019 Jul;104(7):1396-406. PMID: 30630978.

Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1534-42. PMID: 17954704.

Leeksa AC, Baliakas P, Moysiadis T, Puiggros A, Plevova K, van der Kevie-Kersemaekers AM, et al. Genomic arrays identify high-risk chronic lymphocytic leukemia with genomic complexity: a multi-center study. *Haematologica*. 2020 Jan23;haematol.2019.239947. Epub ahead of print. PMID: 31974198.

Cooley LD, Lebo M, Li MM, Slovak ML, Wolff DJ; Working Group of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee. American College of Medical Genetics and Genomics technical standards and guidelines: microarray analysis for chromosome abnormalities in neoplastic disorders. *Genet Med*. 2013 Jun;15(6):484-94. PMID: 23619274.

Schoumans J, Suela J, Hastings R, Muehlematter D, Rack K, van den Berg E, et al. Guidelines for genomic array analysis in acquired haematological neoplastic disorders. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016 May;55(5):480-91. PMID: 26774012.

Real Decreto 1093/2010, de 3 de septiembre, por el que se aprueba el conjunto mínimo de datos de los informes clínicos en el Sistema Nacional de Salud. BOE A-2010-14199 [Internet]. 2010 [cited 2020 Sep 13]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2010/BOE-A-2010-14199-consolidado.pdf>.

ISO 15189:2012. Medical laboratories — Requirements for quality and competence [Internet]. 2012 [cited 2020 Sep 13]. Available from: <https://www.iso.org/standard/56115.html>.

Bruford EA, Braschi B, Denny P, Jones TEM, Seal RL, Tweedie S. Guidelines for human gene nomenclature. *Nat Genet*. 2020 Aug;52(8):754-8. PMID: 32747822.

Cluzeau T, Moreilhon C, Mounier N, Karsenti JM, Gastaud L, Garnier G, et al. Total genomic alteration as measured by SNP-array-based molecular karyotyping is predictive of overall survival in a cohort of MDS or AML patients treated with azacitidine. *Blood Cancer J*. 2013 Nov 1;3(11):e155. PMID: 24185502.

Arenillas L, Mallo M, Ramos F, Guinta K, Barragán E, Lumbreras E, et al. Single nucleotide polymorphism array karyotyping: a diagnostic and prognostic tool in myelodysplastic syndromes with unsuccessful conventional cytogenetic testing. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 Dec;52(12):1167-77. PMID: 24123380.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. (eds.). *WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th ed. Lyon: IARC; 2017.

Gravells A. *Principles and Practices of Quality Assurance: A guide for internal and external quality assurers in the FE and Skills Sector*. London: Learning Matters - SAGE Publications; 2016.

Mahler Zneimer S. *Cytogenetic Laboratory Management: Chromosomal, FISH and Microarray-Based Best Practices and Procedures*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2017.

Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. BOE-A-2018-16673 [Internet]. 2019 [cited 2020 Sep 13]. Available from: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2018/BOE-A-2018-16673-consolidado.pdf>.

Estudio de secuenciación masiva en neoplasias hematológicas (NGS)

INFORMACIÓN CLÍNICA

En los últimos 15 años, los estudios de secuenciación masiva han permitido adentrarnos en el conocimiento de la patogenia de las diferentes enfermedades hematológicas. En el caso de la patología mieloide crónica (síndromes mielodisplásicos, neoplasias mieloproliferativas), la tecnología se ha desarrollado de forma plena, estando ya incluida en los índices pronósticos internacionales, y en las recomendaciones clínicas de las guías nacionales e internacionales de estas patologías.

Sucede lo mismo en la aplicación de la NGS a otras neoplasias hematológicas, como la leucemia aguda mieloide y la leucemia aguda linfoblástica. En estas enfermedades es imprescindible la utilización de esta tecnología para poder cumplir con las recomendaciones de las guías internacionales y locales para la clasificación de las enfermedades y la individualización terapéutica. En el caso de los síndromes linfoproliferativos, la NGS también se ha implementado en las herramientas diagnósticas y se espera que en los próximos años se desarrolle al nivel que lo ha hecho en las anteriores patologías.

UTILIDAD CLÍNICA

Asistir en el diagnóstico y clasificación de enfermedades hematolinfoides. Evaluación pronóstica y optimización terapéutica en neoplasias hematológicas.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

El estudio de secuenciación masiva se basa en la creación de librerías (fragmentos de ADN resultado de la amplificación dirigida de las diferentes muestras de ADN de partida) para después “capturar” estos fragmentos mediante su hibridación con las sondas que representan los fragmentos de todos los genes que se desean analizar. En un tercer paso, esos fragmentos seleccionados se “leen” mediante la reacción de secuenciación, y finalmente los resultados informáticos de estas lecturas se procesan para su interpretación.

Los genes incluidos en el momento actual (abril 2024) en el laboratorio de Citogenética hematológica son: ABL1, ANKRD26, ASXL1, ASXL2, ATM, ATRX, BCOR, BCORL1, BRAF, BRCC3, CALR, CBL, CBLB, CBLC,

CCND2, CDKN2A, CEBPA, CHEK2, CREBBP, CSF3R, CSMD1, CSNK1A1, CTCF, CUX1, DDX41, DHX15, DNMT3A, ELANE, ETNK1, ETV6, EZH2, FANCA, FANCL, FLT3, GATA1, GATA2, GNAS, GNB1, HNRNPK, HRAS, IDH1, IDH2, IKZF1, JAK1, JAK2, JAK3, KDM6A, KIT, KMT2A, KMT2D, KRAS, LUC7L2, MECOM, MET, MPL, MYC, NF1, NOTCH1, NOTCH2, NPM1, NRAS, PAX5, PDGFRA, PHF6, PIGA, PML, PPM1D, PTPN11, RAD21, RAF1, RB1, RBBP6, RPS19, RTEL1, RUNX1, SAMD9, SAMD9L, SBDS, SETBP1, SF3B1, SH2B3, SMC1A, SMC3, SOS1, SRP72, SRSF2, STAG1, STAG2, STAT3, STAT5B, TERC, TET, TET2, TP53, U2AF1, WT1, ZBTB7A, ZRSR2

Esta combinación de genes es dinámica y se irá actualizando conforme a la evolución científica.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No aplica

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Médula ósea con anticoagulante (Heparina/EDTA). (Contenedor): Tubo de tapón verde/morado para Citogenética.

Pieza de adenopatía (Tejido-Biopsia) (Contenedor): Contenedor estéril.

Sangre con anticoagulante (Heparina/EDTA). (Contenedor): Tubo de tapón verde/morado para Citogenética.

Otras muestras pueden ser aceptables a partir de los estudios del laboratorio y/o tras discusión con el laboratorio.

VALORES DE REFERENCIA

Informe de resultados interpretativo

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Por parte de los facultativos de Citogenética Hematológica. Se emitirá un informe con la tecnología utilizada, limitaciones del estudio y un comentario interpretativo.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de NGS Hematología: 60 días desde la recepción de la muestra en el laboratorio

BIBLIOGRAFÍA

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016

Kennedy JA, Ebert BL. Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. J Clin Oncol. 2017

Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. Leukemia. 2014

Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. N Engl J Med. 2011

Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. Blood. 2013

Elena C, Galli A, Such E, et al. Integrating clinical features and genetic lesions in the risk assessment of patients with chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2016;128(10):1408-1417.

Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011

Kennedy JA, Ebert BL. Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome. *J Clin Oncol*. 2017

Arber et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022

Khoury JD, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*

AREA DE CITOMETRÍA DE FLUJO HEMATOLÓGICA

Determinación de precursores

DETERMINACIÓN DE CÉLULAS PRECURSORAS

INFORMACIÓN CLÍNICA

El proceso de formación de las células sanguíneas depende de una población minoritaria de células indiferenciadas y quiescentes localizadas en la médula ósea en condiciones normales. Aunque existen varias clases de precursores hematopoyéticos con un potencial variable de autorrenovación y que son capaces de generar todos los linajes hematopoyéticos tanto a corto como a largo plazo y proporcionar de forma constante un aporte de células sanguíneas maduras a lo largo de la vida del individuo. Un subgrupo de estas células están enriquecidas en precursores y expresan distintos antígenos de membrana como el CD34, que no se expresa en células maduras mediante una técnica de citometría de flujo. La detección y cuantificación de células precursoras realizada mediante citometría de flujo multidimensional es el método preferido para asegurar la cantidad necesaria de células hemopoyéticas necesarias para asegurar el adecuado injerto en productos destinados a trasplante hemopoyético. Esto requiere de la aplicación de unos procedimientos normalizados de trabajo que aseguren la reproducibilidad y replicabilidad de las técnicas entre operadores y entre laboratorios.

UTILIDAD CLÍNICA

Detectar y cuantificar las células precursoras CD34 en sangre periférica y productos destinados al trasplante de progenitores hemopoyéticos.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Inmunofenotipo mediante citometría de flujo multidimensional.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No aplica

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de tapón morado para Citometría de Flujo.

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

Sangre total sin estimular	<0.05% de todos los leucocitos (< 2 células por microlitro)
Médula ósea	0,5-2% de todas las células
Sangre de cordón umbilical	2,5% (25 por microlitro)

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La cuantificación de células CD34+ por citometría de flujo es actualmente el método más empleado para evaluar el potencial de injerto de un producto destinado a trasplante de progenitores hemopoyéticos obtenido de médula ósea, sangre periférica o sangre de cordón umbilical. El objetivo de la colecta es obtener un número de células precursoras CD34+ que garanticen un injerto hemopoyético adecuado

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Citometría de Flujo Hematológica: 180 minutos desde la recepción de la muestra en el laboratorio.

En el caso de asociarse a otras determinaciones (Cuantificación de linfocitos o estudios de enfermedad residual), se emitirá un informe provisional.

BIBLIOGRAFÍA

Sutherland DR, Keeney M, Gratama JW. Enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. CurrProtocCytom. 2003Aug.; Chapter6: Unit6.4.

Inmunofenotipo diagnóstico

PRUEBAS RELACIONADAS

Las muestras que se remitan para estudio de inmunofenotipo para diagnóstico mediante citometría de flujo se agrupan en función del origen de la muestra en las siguientes:

INMUNOFENOTIPO PARA DIAGNÓSTICO EN SANGRE PERIFÉRICA

INMUNOFENOTIPO PARA DIAGNÓSTICO EN MÉDULA ÓSEA

INMUNOFENOTIPO PARA DIAGNÓSTICO EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

INMUNOFENOTIPO PARA DIAGNÓSTICO EN LÍQUIDO PLEURAL

INMUNOFENOTIPO PARA DIAGNÓSTICO EN LÍQUIDO ASCÍTICO

INMUNOFENOTIPO PARA DIAGNÓSTICO EN PUNCIÓN ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA

INMUNOFENOTIPO PARA DIAGNÓSTICO EN ADENOPATÍA

INMUNOFENOTIPO PARA DIAGNÓSTICO EN OTROS LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

DETERMINACIÓN DE PLASMABLASTOS EN SANGRE PERIFÉRICA

INFORMACIÓN CLÍNICA

En las muestras en las que se sospeche una neoplasia hematolinfóide o algunas neoplasias de células pequeñas y redondas, el estudio por citometría de flujo puede establecer u orientar el diagnóstico de entidades específicas, identificar dianas terapéuticas y/o marcadores pronósticos.

La citometría de flujo ayuda al diagnóstico ya que es capaz de identificar patrones de expresión de proteínas a nivel de células individuales y correlacionar estos datos con los patrones de tejido normal/reactivo o tumoral. De esta forma es posible el diagnóstico de las distintas neoplasias hematolinfóides mediante el uso de paneles de anticuerpos monoclonales específicos bajo un estricto control de procedimientos de optimización de las combinaciones de anticuerpos monoclonales, manejo de muestras, set-up del citómetro e indicación clínica. Actualmente, el grupo de trabajo EuroFlow, que comprende 10 laboratorios de probado prestigio internacional, ha publicado sus recomendaciones, las cuales se siguen de forma estricta en nuestro laboratorio. Adicionalmente, se dispone de paneles desarrollados en el laboratorio para aquellas situaciones que no están recogidas dentro del consorcio EuroFlow, como neoplasias de células pequeñas redondas.

La selección de paneles para el estudio de las muestras corre a cargo de los facultativos del laboratorio, en base a la información clínica disponible, los estudios previos o simultáneos que presente el paciente y la información obtenida de los tubos de screening. Como norma general, las muestras serán sometidas a

uno o varios de los paneles de screening en función de la indicación y podrán ser completados en función de los resultados.

Los paneles de screening en el momento actual son:

Screening de neoplasias linfoides maduras (LST, Lymphoid screening tube): Para el estudio de muestras sospechosas de linfoma no Hodgkin o síndromes linfoproliferativos.

Screening de neoplasias de células precursoras (ALOT, Acute LeukemiaOrientationTube): Para screening de neoplasias de células precursoras

Screening de discrasias de células plasmáticas (PCD, Plasma Cell Dyscrasia): Se realizará el estudio en las muestras de pacientes con uno o varios de los siguientes datos clínico/biológicos:

- Células plasmáticas circulantes
- Infiltración medular por células plasmáticas
- Componente monoclonal
- Lesiones líticas
- Sospecha de plasmocitoma

En los casos en los que se estudie un componente monoclonal IgM, el estudio con este protocolo aislado resulta insuficiente, por lo que debe de acompañarse necesariamente con el estudio para descartar linfoma

En todos los casos que se detecte una población patológica, se completará el estudio siguiendo el SOP del grupo EuroFlow y los protocolos internos del laboratorio.

Este protocolo NO es aplicable en aquellas muestras provenientes de pacientes con un diagnóstico correcto y completo de neoplasia hematolinfoide (p.ej. Estudios de enfermedad residual/enfermedad diseminada), salvo que se trate de descartar una segunda neoplasia hematolinfoide.

UTILIDAD CLÍNICA

Diagnóstico, pronóstico y generación de dianas terapéuticas en sospechas de enfermedades hematolinfoides.

Generación de aberrancias susceptibles de ser monitorizadas en los estudios de enfermedad residual

Predicción de alteraciones genéticas o moleculares en neoplasias hematolinfoides.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Inmunofenotipo mediante citometría de flujo multidimensional.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No aplica

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de tapón morado para Citometría de Flujo.

Médula ósea con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de tapón morado para Citometría de Flujo.

Punción aspiración con aguja fina con anticoagulante (EDTA K3) (Contenedor): Tubo de tapón morado para citometría de flujo con estabilizante celular.

Pieza de adenopatía (Tejido-Biopsia) (Contenedor): Contenedor estéril.

Líquido cefalorraquídeo con anticoagulante (EDTA K3) (Contenedor): Tubo de tapón morado para citometría de flujo con estabilizante celular.

Otros líquidos biológicos con anticoagulante (EDTA K3) (Contenedor): Tubo de tapón morado para citometría de flujo con estabilizante celular.

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

Informe de resultados interpretativo

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del inmunofenotipaje dependerán de la combinación de reactivos utilizados y de las poblaciones que han sido identificadas. Si se siguen los pasos definidos con anterioridad, pueden

identificarse de forma inequívoca poblaciones discretas de células neoplásicas y las distintas poblaciones leucocitarias normales en o las muestras. La interpretación de los resultados corre a cargo de los facultativos del laboratorio, que emitirán un informe de los resultados de los paneles estudiados y su interpretación clínica.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Citometría de Flujo Hematológica: siete días laborables desde la recepción de la muestra en el laboratorio. Si se requiere preinforme, puede ser emitido en un día desde la recepción de muestra (contactar previamente con el laboratorio)

BIBLIOGRAFÍA

Van Dongen JJM, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, Van Der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012 May 3.

Cossarizza, A., Chang, H., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W.W., Akdis, M., Allez, M., Nogueira Almeida, L., et al. (2019). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol. In press*, 1–528.

Davis BH, Holden JT, Bene MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. *Cytometry*. 2007; 72 Suppl 1: S5–13.

Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry*. 2001. p. 23–7.

Ferreira-Facio, C. S., Milito, C., Botafogo, V., Fontana, M., Thiago, L. S., Oliveira, E.,...Costa, E. S. (2013). Contribution of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotyping to the Diagnostic Screening and Classification of Pediatric Cancer. *PLoS ONE*, 8(3), e55534.

Quirós Caso, C et al. Flow cytometry immunophenotyping can identify and characterize solid tumour cells in clinical samples: a preliminary study. *Iberian Society for Cytometry*. 2019.

Inmunofenotipo para enfermedad residual

PRUEBAS RELACIONADAS

Las muestras que se remitan para estudio de inmunofenotipo para enfermedad residual deben de proceder de pacientes con un diagnóstico correcto y completo, bien mediante citometría de flujo o bien mediante otra técnica. Se agrupan en función del origen de la muestra en las siguientes:

INMUNOFENOTIPO PARA ENFERMEDAD RESIDUAL EN SANGRE PERIFÉRICA

INMUNOFENOTIPO PARA ENFERMEDAD RESIDUAL EN MÉDULA ÓSEA

INMUNOFENOTIPO PARA ENFERMEDAD RESIDUAL EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

INMUNOFENOTIPO PARA ENFERMEDAD RESIDUAL EN LÍQUIDO PLEURAL

INMUNOFENOTIPO PARA ENFERMEDAD RESIDUAL EN LÍQUIDO ASCÍTICO

INMUNOFENOTIPO PARA ENFERMEDAD RESIDUAL EN PUNCIÓN ASPIRACIÓN CON AGUJA FINA

INMUNOFENOTIPO PARA ENFERMEDAD RESIDUAL EN ADENOPATÍA

INMUNOFENOTIPO PARA ENFERMEDAD RESIDUAL EN OTROS LÍQUIDOS BIOLÓGICOS

INFORMACIÓN CLÍNICA

Este protocolo solo es aplicable en aquellas muestras provenientes de pacientes con un diagnóstico correcto y completo de neoplasia hematolinfoide (p.ej. Estudios de enfermedad residual/enfermedad diseminada).

La citometría de flujo ayuda al diagnóstico ya que es capaz de identificar patrones de expresión de proteínas a nivel de células individuales y correlacionar estos datos con los patrones de tejido normal/reactivo o tumoral. De esta forma es posible el seguimiento de la enfermedad residual mediante estudios que identifiquen las células tumorales en base al perfil inmunofenotípico del diagnóstico, bien del propio paciente o bien en función del fenotipo característico de la enfermedad.

UTILIDAD CLÍNICA

Evaluación de la eficacia del tratamiento

Seguimiento de pacientes en remisión

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Inmunofenotipo mediante citometría de flujo multidimensional.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No aplica

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de tapón morado para Citometría de Flujo.

Médula ósea con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de tapón morado para Citometría de Flujo.

Punción aspiración con aguja fina con anticoagulante (EDTA K3) (Contenedor): Tubo de tapón morado para citometría de flujo con estabilizante celular.

Pieza de adenopatía (Tejido-Biopsia) (Contenedor): Contenedor estéril.

Líquido cefalorraquídeo con anticoagulante (EDTA K3) (Contenedor): Tubo de tapón morado para citometría de flujo con estabilizante celular.

Otros líquidos biológicos con anticoagulante (EDTA K3) (Contenedor): Tubo de tapón morado para citometría de flujo con estabilizante celular.

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

Informe de resultados interpretativo

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del inmunofenotipaje dependerán de la combinación de reactivos utilizados y de las poblaciones que han de ser estudiadas. Si se siguen los pasos definidos con anterioridad, pueden identificarse de forma inequívoca poblaciones discretas de células neoplásicas y las distintas poblaciones leucocitarias normales en las muestras con una sensibilidad entre una célula por mil y una célula por cien mil o incluso inferiores, dependiendo de la calidad de la muestra.

La interpretación del resultado corre a cargo de los facultativos del laboratorio de Citometría de Flujo. Se realizará un informe interpretativo de la exploración.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Citometría de Flujo Hematológica: siete días laborable desde la recepción de la muestra en el laboratorio

BIBLIOGRAFÍA

Van Dongen JJM, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, Van Der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012 May 3.

Cossarizza, A., Chang, H., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W.W., Akdis, M., Allez, M., Nogueira Almeida, L., et al. (2019). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol. In press*, 1–528.

Davis BH, Holden JT, Bene MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. *Cytometry*. 2007;72 Suppl 1: S5–13.

Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry*. 2001. p. 23–7.

Test HPN

INFORMACIÓN CLÍNICA

La Hemoglobinuria paroxística nocturna (HPN) es una enfermedad clonal adquirida de la célula stem hematopoyética por mutación somática del gen PIG-A (glucosilfosfatidilinositolglicano transferasa A) localizado en el cromosoma X. Esta mutación supone la pérdida parcial o total de síntesis de la proteína GPI (glucosilfosfatidilinositol) y con ella el déficit total o parcial de expresión de aquellas moléculas ancladas a la membrana celular a su través (CD24, CD14, CD16, CD55, CD59, CD66b, CD157 entre otras). La clínica de la forma clásica incluye anemia hemolítica de predominio intravascular (debido al déficit de CD55 y CD59 en hematíes), trombosis e insuficiencia medular. Además, pequeños clones de células carentes de moléculas ancladas a través de GPI pueden detectarse también en pacientes diagnosticados de aplasia medular y síndromes mielodisplásicos de bajo riesgo, produciendo o no clínica de hemólisis asociada a la clínica de fallo medular. La demostración del déficit de proteínas ancladas a membrana a través de GPI por citometría de flujo multiparamétrica (CFM) es actualmente la técnica de elección para el diagnóstico de HPN. Se utilizan anticuerpos monoclonales fluorescentes dirigidos contra antígenos de membrana anclados a través de GPI. La emisión de fluorescencia por dichos anticuerpos sobre la membrana celular informa de la normal expresión de dichos antígenos, así como el déficit parcial o total de fluorescencia identifica a aquellas células con carencia de expresión de GPI (células HPN). Estas células carentes de estos antígenos son comúnmente llamadas "clones de células HPN".

UTILIDAD CLÍNICA

Esta prueba está indicada en casos de anemia hemolítica no inmune (test de Coombs negativo), hemoglobinuria no explicada por otra causa, citopenias centrales no explicadas tras un estudio correcto, trombosis con citopenias o datos de hemólisis asociados, estudio de trombofilia en pacientes en los que se haya descartado causas frecuentes (poco rentable), pacientes con aplasia medular o síndromes mielodisplásicos de bajo grado, ferropenia refractaria sin causa subyacente (poco rentable) y en pacientes con fracaso renal agudo con signos de hemólisis sin evidencia de esquistocitos. Además, está indicada como seguimiento en pacientes ya diagnosticados de HPN clásica, subclínica o asociada a fallo medular y especialmente en aquellos en tratamiento con Eculizumab.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Inmunofenotipo mediante citometría de flujo multidimensional.

El análisis de los leucocitos para la detección de poblaciones HPN es el mejor método disponible para evaluar correctamente el tamaño del clon. Los linfocitos, debido a su larga vida media y la expresión variable de distintas proteínas GPI no constituyen una población adecuada; mientras que los monocitos

y los neutrófilos son poblaciones idóneas dado su número, la correlación entre el tamaño de clon entre ellas y que pueden ser fácilmente evaluados en paralelo. El estudio en leucocitos es la técnica de elección para detectar clones HPN tanto en estudios de baja y alta sensibilidad y para el seguimiento de pacientes con clon HPN en un método que utilice FLAER (Fluorescente Aerolysin y otra proteína anclada por GPI como CD157, que permite análisis simultáneo en monocitos y granulocitos neutrófilos), junto con antígenos que permiten identificar inequívocamente las poblaciones maduras de monocitos y neutrófilos. Con esta estrategia, se pueden realizar estudios de alta sensibilidad (0.01% de células HPN en la muestra)

Los eritrocitos serán marcados mediante inmunofluorescencia directa y adquiridos en modo logarítmico. Para el análisis en hematíes, el antígeno recomendado para estudio es CD59 (MIRL), cuya pérdida explica en parte la fisiopatología de la HPN clásica. Para su identificación generalmente es sencillo utilizar dot-plots de Forward Scatter versus SideScatter, aunque pueden utilizarse otros antígenos específicos de hematíes, como CD235a, para redefinir la población en estudios de alta sensibilidad. El análisis de hematíes se debe de realizar cuando se demuestre un clon HPN en los leucocitos. No se recomienda como método único de screening de baja sensibilidad ya que la hemólisis y las transfusiones pueden provocar un tamaño menor del clon que con otras técnicas.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

Este test se debe de solicitar siempre junto con parámetros de hemólisis (Reticulocitos, LDH, Bilirrubina y Haptoglobina), por lo que se aplican los requerimientos del paciente para estas pruebas.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de tapón morado para Citometría de Flujo.

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

El límite de detección mínimo aceptado es de 0.01% células HPN sobre el total de la población analizada. La especificidad de esta técnica es del 100% utilizando un nivel de sensibilidad del 0.01% del total de células estudiadas. En los pacientes sin clon HPN circulante el 100% de las células y hematíes presentarán expresión de proteínas GPI.

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las técnicas para el diagnóstico de HPN como el test de Ham o el de la Sucrosa se ha abandonado ya que quieren un mínimo de un 5% de hematíes totalmente carentes de expresión de moléculas asociadas a GPI (hematíes HPN tipo III) o un 20% de hematíes parcialmente deficientes (hematíes HPN tipo II) para resultar concluyentes. Los test basados en tarjetas de gel tienen la misma resolución. Por CFM, utilizando un anticuerpo monoclonal (Ac) se pueden detectar 2-3% de células HPN que aumenta un 0.01% si se utilizan tres o más Ac. Con técnicas de alta resolución se puede detectar hasta un 0,003% de granulocitos HPN y un 0,005% de hematíes HPN en muestras de donantes sanos, por lo que valores superiores son considerados como significativos.

Como concepto general se acepta que para el rastreo de clones HPN en sospecha de HPN clásica bastaría una sensibilidad del 1%, sin embargo, niveles de sensibilidad del 0.01% son necesarios para el diagnóstico de HPN subclínica o asociada a síndrome de fallo medular.

La interpretación del resultado corre a cargo de los facultativos del laboratorio de Citometría de Flujo del Servicio de Hematología. Se realizará un informe interpretativo de la exploración.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Citometría de Flujo Hematológica: siete días laborables desde la recepción de la muestra en el laboratorio

BIBLIOGRAFÍA

Richards SJ, Hillmen P. Immunophenotypic analysis of PNH cells. CurrProtocCytom. 2002 May; Chapter6: Unit6.11.

Hernández-Campo PM, Almeida J, Orfao A. [Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria.]. 2008 Nov 8; 131(16):617–30.

Villegas, A., Arrizabalaga, B., Bonanad, S., Colado, E., Gaya, A., González, A., ... Grupo de Trabajo de HPN de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia. (2016). [Spanish consensus statement for diagnosis and treatment of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria]. MedicinaClínica, 146(6), 278.e1–7.

Borowitz MJ, Craig FE, Diguseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. Cytometry. 2010 Jul 1;78(4):211–30.

Sutherland, D. R., Illingworth, A., Keeney, M., & Richards, S. J. (2015). High-Sensitivity Detection of PNH Red Blood Cells, Red Cell Precursors, and White Blood Cells. CurrProtocCytom, 72(April), 6.37.1–6.37.29.

Test Esferocitosis

INFORMACIÓN CLÍNICA

La esferocitosis hereditaria (EH) es la anemia hemolítica debida a un defecto de membrana más frecuente en nuestro medio. Se manifiesta como anemia hemolítica en la que, existe un defecto en la unión de la malla de espectrina a la membrana. Las mutaciones que causan esferocitosis hereditaria, al contrario de las que causan eliptocitosis, ocurren en las interacciones verticales. Esto lleva a la inestabilidad de la membrana del hematíe con la consiguiente reducción de la superficie de éste, resultando un secuestro selectivo por el bazo y menor vida media eritrocitaria. La incidencia aproximada es 0,5-1 caso por mil habitantes, presentándose de forma autosómica dominante en aproximadamente el 75% de los casos. El resto de los casos o bien son mutaciones de novo o bien formas autosómico recesivas.

La severidad clínica varía desde la forma asintomática hasta la hemólisis severa. La forma leve puede ser difícil de identificar ya que los datos de hemólisis pueden ser poco aparentes. La presencia de esferocitos y reticulocitosis sugiere el diagnóstico. No puede descartarse un estado de portador a pesar de no observar esferocitos y presentar índices hematimétricos y reticulocitos normales. Es importante considerar otros diagnósticos diferenciales en el caso de hemólisis crónica y morfología atípica como anemiasdiseritropoyéticas congénitas o anemias hemofílicas inmunes coombs negativas. Hasta un 30% de pacientes no presentan esplenomegalia y solo un 50-60% de pacientes presentan anemia o ictericia. Hasta el 50% de los casos (sobre todo en las formas más graves) presentan un antecedente de ictericia neonatal. En torno al 30% de los pacientes, se desarrolla una colelitiasis.

Los pacientes con EH, debido a la inestabilidad de su membrana plasmática o directamente por mutaciones que afecten a la proteína Banda 3, presentan una menor cantidad de proteína Banda 3 en la membrana plasmática. La Eosin-5 maleamida (EMA) es una sustancia que se une estequímicamente a Banda 3 y emite fluorescencia.

UTILIDAD CLÍNICA

El test de esferocitosis (EMA binding test) permite la detección del defecto de Banda 3 en hasta el 95% de los pacientes con EH. Este test es además útil en el diagnóstico diferencial ya que el EMA binding es normal en otras anemias hemofílicas salvo la anemia disritropoyética congénita tipo II (CDA tipo II), la ovalocitosis del sudeste asiático, criohidocitosis y algunos casos de drepanocitosis.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Inmunofenotipo mediante citometría de flujo multidimensional.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

Este test se debe de solicitar siempre junto con parámetros de hemólisis (Reticulocitos, LDH, Bilirrubina y Haptoglobina), por lo que se aplican los requerimientos del paciente para estas pruebas.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de tapón morado para Citometría de Flujo.

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

Los pacientes con diagnóstico de EH presentan una menor cantidad de unión de EMA comparado con los hematíes normales, típicamente con una ratio inferior a 0,895 comparado con hematíes de control obtenidos de sujetos sanos.

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El EMA binding será normal (ratio 0,8-1,2) comparado con hematíes de donantes sanos en pacientes con anemia por cualquier otro motivo salvo una EH y una CDA tipo II

La interpretación del resultado corre a cargo de los facultativos del laboratorio de Citometría de Flujo del Servicio de Hematología. Se realizará un informe interpretativo de la exploración.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Citometría de Flujo Hematológica: Tiempo de respuesta: siete días laborables desde la recepción de la muestra en el laboratorio

BIBLIOGRAFÍA

Mariani M, Barcellini W, Vercellati C, Marcello AP, Fermo E, Pedotti P, et al. Clinical and hematologic features of 300 patients affected by hereditary spherocytosis grouped according to the type of the membrane protein defect. *Haematologica*. 2008 Sep 1;93(9):1310–7.

King MJ, Behrens J, Rogers C, Flynn C, Greenwood D, Chambers K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. *Br J Haematol*. 2000 Dec; 111(3):924–33.

Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, Marcello AP, Porretti L, Cortelezzi A, et al. Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics. *Haematologica*. 2012 Apr 5; 97(4):516–23.

Detección de Hemorragia Feto-Materna

INFORMACIÓN CLÍNICA

La hemorragia feto-materna (HFM) se refiere a la entrada de sangre fetal hacia la circulación materna, antes o durante el parto. La HFM antenatal es una condición patológica con un amplio espectro de variabilidad clínica. La HFM puede desencadenar cuadros de anemia con consecuencias devastadoras para el feto, que incluyen daño neurológico, muerte fetal o muerte neonatal. Además, volúmenes menores de sangrado pueden desencadenar la sensibilización materna a antígenos leucocitarios, eritrocitarios o plaquetarios que podrá resultar en citopenias en el feto o neonato. La HFM se presenta con frecuencia sin un factor precipitante evidente. El reconocimiento del cuadro, si logra hacerse, solo puede llevarse a cabo después de que ha ocurrido una lesión.

UTILIDAD CLÍNICA

Son indicaciones de estudio de hemorragia fetomaterna en nuestro medio:

Pérdida fetal

Anemia fetal / neonatal

Madres D negativas que dan a luz un niño D positivo (para valorar la cantidad de hemoglobina anti-D) ya que la dosis de inmunoglobulina anti-D administrada (1500UI) cubriría hasta 12-15ml hematíes fetales, o su equivalente 24-30mL de sangre fetal.

Control post-tratamiento con inmunoglobulina anti-D en Madres D negativas que dan a luz un niño D positivo.

No son indicaciones de estudio de hemorragia fetomaterna en nuestro medio:

Madres D positivas.

Madres aloinmunizadas.

Eventos potencialmente aloinmunizadores (Amniocentesis, biopsia de vellosidades coriónicas, traumatismos...).

Dolor abdominal grave en mujeres en tercer trimestre, ya que existen métodos más eficaces de detectar abruptioplacentae.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Mediante citometría de flujo se cuantifica el número de células fetales presentes midiendo la intensidad de fluorescencia de anticuerpos monoclonales que se ligan específicamente a la HbF. Se ha demostrado que la intensidad de la fluorescencia de células que contienen HbF fetal es mayor que la de las células que contienen HbF de adulto. La técnica mide adicionalmente el tamaño de los eritrocitos mediante dispersión de luz frontal, permitiendo la distinción de las células fetales de las adultas de acuerdo a su mayor volumen celular medio. Adicionalmente se incluyen anticuerpos contra antígenos adicionales de superficie de eritrocitos, tales como anhidrasa carbónica II, diferencialmente expresada en eritrocitos adultos, en comparación con eritrocitos fetales, lo que aumenta la especificidad de la técnica.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

Se obtendrán las muestras en horario de mañana en días laborables en un tubo con EDTA K3 (Tubo de hemograma) según el procedimiento de venopunción habitual del centro en las 72 horas siguientes a la sospecha de hemorragia fetomaterna.

Si por algún motivo, la muestra no pudiese ser obtenida en horario de mañana, es correcto extraerla y almacenarla en nevera en las unidades clínicas para enviarla en horario laborable para los laboratorios de rutina.

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de tapón morado para Citometría de Flujo.

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

Pueden identificarse de forma inequívoca hematíes fetales con una sensibilidad de una célula por 100.000 en estudios de alta sensibilidad (0,001%), aunque en un embarazo normal, HFM de hasta 2mL son frecuentes, por lo que se establece como límite superior de la normalidad.

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Valores de hemorragia fetomaterna superiores a 2mL deberán de ser comunicados al médico peticionario

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Citometría de Flujo Hematológica: tres días laborables desde la recepción de la muestra en el laboratorio. En caso de que la muestra sea por Anemia fetal o neonatal, un día laborable desde la recepción de la muestra.

BIBLIOGRAFÍA

Wylie BJ, D'Alton ME. Fetomaternal hemorrhage. Obstet Gynecol. 2010 May;115(5):1039–1051.

Duckett JR, Constantine G. The Kleihauer technique: an accurate method of quantifying fetomaternal haemorrhage? Br J ObstetGynaecol. 1997 jul.;104(7):845–846.

Kennedy GA, Shaw R, Just S, Bryson G, Battistutta F, Rowell J, et al. Quantification of feto-maternal haemorrhage (FMH) by flow cytometry: anti-fetal haemoglobin labelling potentially underestimates massive FMH in comparison to labelling with anti-D. TransfusMed. 2003 Jan.; 13(1):25–34.

Estudio de proteínas de membrana plaquetarias

INFORMACIÓN CLÍNICA

Las plaquetas, al igual que otras células, presentan una expresión diferencial de proteínas, tanto en su citoplasma como en su superficie celular. La detección y cuantificación de una serie de proteínas es de utilidad en el estudio de trombopatías y trombocitopenias familiares como las siguientes glicoproteínas e integrinas.

Cluster of differentiation	Nombre de la glicoproteína	Nombre de la integrina
CD41	GPIIb	Alpha 2b
CD42a	GPIX	
CD42b	GPIb-alpha	
CD49b	GPIa	Alpha 2
CD61	GPIIIa	Beta 3
	GPVI	

Estas proteínas están presentes en virtualmente el 100% de las plaquetas de donantes sanos y sus niveles se ven disminuidos en las siguientes situaciones:

- CD41 (GPIIb) y CD61 (GPIIIa): Tromboastenia de Glanzmann
- CD42a (GPIX) y CD42b (GPIb-alpha): Síndrome de Bernard-Soulier
- GPVI y/o CD49d: déficit de receptores de colágeno

Se está evaluando en este momento el uso de CD62P, CD62L y CD9 para un control de calidad interno del tubo.

UTILIDAD CLÍNICA

Detectar y cuantificar las proteínas plaquetarias para el diagnóstico de defectos en las glicoproteínas plaquetarias

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Inmunofenotipo mediante citometría de flujo multidimensional.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No aplica

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de tapón morado para Citometría de Flujo. (NOTA: Se está valorando el uso de ACD como anticoagulante para esta indicación)

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

Sangre total sin estimular

Expresión similar a un pool de 6 controles sanos

Médula ósea

No aplica

Sangre de cordón umbilical

Expresión similar a un pool de 6 controles sanos

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación de los resultados se realiza por los facultativos del laboratorio y deberá de hacerse en conjunción con los estudios funcionales del laboratorio de trombosis-hemostasia, los estudios genéticos y los estudios ultraestructurales para un diagnóstico correcto y completo de las trombopatías y trombopenias familiares. En los casos positivos, se solicitará al clínico un estudio familiar ampliado.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Citometría de Flujo Hematológica: 7 días desde la recepción de la muestra en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

Béné, M. C. et al. Flow cytometry in hematological nonmalignant disorders. Int. J. Lab. Hematol. 38, 5–16 (2016).

Cossarizza, A., Chang, H., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W.W., Akdis, M., Allez, M., Nogueira Almeida, L., et al. (2019). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol. In press*, 1–528.

Sánchez-Guiu, I. et al. Functional and molecular characterization of inherited platelet disorders in the Iberian Peninsula: results from a collaborative study. *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 213 (2014).

Pham, A. & Wang, J. Bernard-Soulier syndrome: An inherited platelet disorder. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 131, 1834–1836 (2007).

Linden, M. D. et al. Application of flow cytometry to platelet disorders. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 30, 501–511 (2004).

Detección y cuantificación de plasmablastos en sangre periférica

INFORMACIÓN CLÍNICA

La enfermedad relacionada con IgG4 (IgG4-RD) es una enfermedad mediada por el sistema inmune que lleva a la destrucción tisular y disfunción orgánica. La enfermedad puede afectar a cualquier localización anatómica, aunque los sitios más frecuentemente afectados son el páncreas, las glándulas salivales, anexos orbitarios, adenopatías y el retroperitoneo. La IgG4-RD se diagnostica habitualmente en individuos de edad media y tiene cierto predominio por el sexo masculino. En esta enfermedad, los plasmablastos en sangre periférica están consistentemente aumentados en las fases de actividad. Los plasmablastos se definen como células con un perfil inmunológico CD19+d CD20+d/- CD38+ CD27+. Estos plasmablastos se pueden detectar en otras enfermedades autoinflamatorias como el lupus sistémico eritematoso, la artritis reumatoide o la enfermedad inflamatoria intestinal. La detección de plasmablastos circulantes en número elevado en mieloma múltiple se asocia a mal pronóstico, aunque para esta entidad el test recomendado es el estudio de enfermedad residual

UTILIDAD CLÍNICA

Detectar y cuantificar los plasmablastos circulantes como método de detección y seguimiento de enfermedades autoinflamatorias

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Inmunofenotipo mediante citometría de flujo multidimensional.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No aplica

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de tapón morado para Citometría de Flujo.

Se debe de realizar hemograma a la muestra de forma simultánea.

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

0-0.6 plasmablastos por microlitro en controles sanos

Médula ósea

No aplica

Sangre de cordón umbilical

No aplica

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La cuantificación de plasmablastos aumentados sobre el valor normal (>0,6 por microlitro) ocurre en las fases de actividad de la enfermedad, incluso en aquellos pacientes con niveles normales de IgG4.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Citometría de Flujo Hematológica: 7 días desde la recepción de la muestra en el laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

Wallace ZS, Mattoo H, Carruthers M, et al. Ann Rheum Dis 2015;74:190–195.

Luke Y.C. Chen, Andre Mattman, Michael A. Seidman, Mollie N. Carruthers. Haematologica Mar 2019, 104 (3) 444-455; DOI: 10.3324/haematol.2018.205526

Screening de Síndrome Hemofagocítico

INFORMACIÓN CLÍNICA

El síndrome hemofagocítico (Hemofagocytic Lymphohistiocytosis, HLH) es una enfermedad rara pero potencialmente mortal que se caracteriza por una disregulación inmunológica caracterizada por signos y síntomas de una inflamación extrema y descontrolada. (Campo and Berliner, 2015) A lo largo de las últimas dos décadas se ha hecho claro que se trata de una enfermedad que afecta tanto a población pediátrica como adulta. Aunque en ambos casos se observan alteraciones en las células NK y células T citotóxicas y también en los macrófagos. Si las alteraciones son de base genética, el caso se clasificará como FHLH (familiar HLH) o primario. (Degar, 2015)

Por otro lado, si el HLH emerge en el contexto de una infección (por ejemplo, por EBV), una enfermedad autoinmune (síndrome de activación macrofágica, MAS) o una neoplasia, se considerará secundario salvo que se demuestre una alteración genética. (Filipovich and Chandrakasan, 2015). La presentación clínica no difiere en población adulta o pediátrica, con una enfermedad aguda o subaguda con afectación progresiva de distintos órganos, por lo que puede simular una serie de enfermedades como:

- Sepsis grave/ síndrome de disfunción multiorgánica.
- Fallo hepático.
- Púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), Síndrome hemolítico urémico (SUH) y otras microangiopatías trombóticas. (Especialmente secundaria a quinina).
- Encefalitis.
- Síndrome linfoproliferativo autoinmune.
- DRESS.
- Enfermedad de Kawasaki.
- Linfoma T subcutáneo paniculitis-like.
-

En infecciones sistémicas o sepsis grave la fiebre, citopenias y afectación hepática son frecuentes. Tanto la sepsis como la HLH pueden presentar inflamación, coagulopatía y alteraciones en los perfiles de

citocinas. La ferritina suele elevarse más y de forma más aguda en la HLH. Sin embargo, las similitudes en la expresión clínica entre la sepsis y el HLH no necesariamente se traducen en una fisiopatología común. Mediante estudios funcionales e inmunofenotípicos se demuestran alteraciones diferentes en la sepsis y el HLH. (Filipovich and Chandrakasan, 2015; Chaturvedi et al., 2021) Sin embargo, la demostración de actividad citotóxica o la determinación de citocinas en suero son laboriosas y presentan un tiempo hasta resultado largo. (Chiang et al., 2019) Por este motivo, se han desarrollado herramientas que permiten establecer una probabilidad de HLH como el HScore, (Fardet et al., 2014) aunque generalmente están encaminadas a diferenciar un HLH primario de un secundario.

Debido a la disfunción inmunológica, en los pacientes con HLH primario (y probablemente en el secundario a EBV) existe una expansión de una subpoblación de células T efectoras con función citotóxica altamente activadas con expresión fuerte de CD38 y HLADR. (Chaturvedi et al., 2021)

UTILIDAD CLÍNICA

Dado que la identificación correcta de los casos de HLH primario y su diferenciación de los casos secundarios tiene implicaciones pronósticas y terapéuticas importantes, se ha diseñado un panel de anticuerpos que permite identificar la población de células efectoras altamente activadas típicas del HLH, por lo que puede ser cuantificado en la rutina, en un tiempo inferior a 24h y asistir en el manejo clínico de los pacientes con sospecha de HLH ofreciendo un screening rápido y eficaz para aquellos casos que deben de ser estudiados más profundamente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Inmunofenotipo mediante citometría de flujo multidimensional.

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No aplica

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de tapón morado para Citometría de Flujo.

Se debe de realizar hemograma a la muestra de forma simultánea.

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

<7% de células T HLADR++ CD38+++ dentro del compartimento de células T CD4- CD8+

VALORES CRÍTICOS

>7% de células T HLADR++ CD38+++ dentro del compartimento de células T CD4- CD8+

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El punto de corte de un 7% de células activadas CD38++ HLADR+ dentro del compartimento de células T CD4-CD8+ permite diferenciar los pacientes con HLH de la sepsis con un valor predictivo positivo del 96% y un valor predictivo negativo del 100%. En los pacientes con HLH secundario se pueden observar alteraciones inmunológicas similares en algunos casos, (Shamriz et al., 2021) aunque el perfil inmunológico global parece más bien inflamatorio y muy similar al observado en sepsis grave. (Ammann et al., 2017; Carvelli et al., 2020)

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Citometría de FlujoHematológica: 1 día desde la recepción de la muestraenellaboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

Ammann, S., Lehmborg, K., zur Stadt, U., Janka, G., Rensing-Ehl, A., Klemann, C., Heeg, M., Bode, S., Fuchs, I., and Ehl, S. (2017). Primary and secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis have different patterns of T-cell activation, differentiation and repertoire. *European journal of immunology* 47, 364-373. <https://doi.org/10.1002/eji.201646686>.

Campo, M., and Berliner, N. (2015). Hemophagocytic Lymphohistiocytosis in Adults. *Hematology/oncology clinics of North America* 29, 915-925. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2015.06.009>.

Carvelli, J., Piperoglou, C., Farnarier, C., Vely, F., Mazodier, K., Audonnet, S., Nitschke, P., Bole-Feysot, C., Boucekine, M., and Cambon, A., et al. (2020). Functional and genetic testing in adults with HLH reveals an inflammatory profile rather than a cytotoxicity defect. *15280020* 136, 542-552. <https://doi.org/10.1182/blood.2019003664>.

Chaturvedi, V., Marsh, R.A., Zoref-Lorenz, A., Owsley, E., Chaturvedi, V., Nguyen, T.C., Goldman, J.R., Henry, M.M., Greenberg, J.N., and Ladisch, S., et al. (2021). T-cell activation profiles distinguish

hemophagocytic lymphohistiocytosis and early sepsis. Blood 137, 2337-2346. <https://doi.org/10.1182/blood.2020009499>.

Chiang, S.C.C., Bleesing, J.J., and Marsh, R.A. (2019). Current Flow Cytometric Assays for the Screening and Diagnosis of Primary HLH. Frontiers in immunology 10, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01740>.

Degar, B. (2015). Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. Hematology/oncology clinics of North America 29, 903-913. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2015.06.008>.

Fardet, L., Galicier, L., Lambotte, O., Marzac, C., Aumont, C., Chahwan, D., Coppo, P., and Hejblum, G. (2014). Development and validation of the HScore, a score for the diagnosis of reactive hemophagocytic syndrome. Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.) 66, 2613-2620. <https://doi.org/10.1002/art.38690>.

Filipovich, A.H., and Chandrakasan, S. (2015). Pathogenesis of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. Hematology/Oncology Clinics of NA 29, 895-902. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2015.06.007>.

Shamriz, O., Kumar, D., Shim, J., Briones, M., Quarmyne, M.-O., Chonat, S., Lucas, L., Edington, H., White, M.H., and Mahajan, A., et al. (2021). T Cell-Epstein-Barr Virus-Associated Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (HLH) Occurs in Non-Asians and Is Associated with a T Cell Activation State that Is Comparable to Primary HLH. Journal of Clinical Immunology. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01073-9>.

Inmunofenotipo para micosis fungoides/Síndrome de Sézary

PRUEBAS RELACIONADAS

HEMOGRAMA BÁSICO

INFORMACIÓN CLÍNICA

La presencia de leucemización es frecuente en MF y constante en SS e incluso puede anteceder las manifestaciones cutáneas clásicas.(Mangold et al., 2017; Scarisbrick et al., 2018; Trautinger et al., 2017). Históricamente, las células de MF/SS se han identificado mediante citología en extensiones de sangre periférica y contadas manualmente, sin embargo, esta metodología presenta falta sensibilidad y especificidad y una reproducibilidad cuestionable.(Scarisbrick et al., 2001; Vonderheid et al., 2006) Otras técnicas como detección de reordenamiento de célula T por biología molecular deben de tomarse con cautela, dado que se pueden detectar clones T no relacionados en pacientes mayores o con linfocitosis por otras causas incluyendo dermatosis benignas.(Delfau-Larue et al., 2000) A pesar de esto, la detección de un clon similar en sangre periférica y en la pieza de biopsia cutánea donde se ha documentado la MF/SS puede ser útil para establecer afectación cutánea.

La citometría de flujo es una técnica multiparamétrica que mide propiedades de células o partículas individuales (eventos) como la dispersión de luz o la fluorescencia intrínseca o extrínseca (mediante moléculas fluorescentes unidas o no a anticuerpos) (Cossarizza et al., 2019) La capacidad de proporcionar datos correlacionados a partir de un análisis de elementos individuales, única en esta técnica, permite identificar poblaciones diferentes dentro de una misma muestra, por lo que es especialmente útil para detectar y cuantificar las células T aberrantes en MF/SS tanto en muestras de sangre periférica como en otros tejidos.(Horna et al., 2020; Lyapichev et al., 2020; Scarisbrick et al., 2018). De hecho, actualmente se puede considerar como el método de elección para la detección de leucemización, independientemente de la cantidad.(Olsen et al., 2007; Scarisbrick et al., 2018; Trautinger et al., 2017). Las principales características de las distintas técnicas se resumen en la tabla 1.

	Citología	MFC/NGF	PCR
Tiempo hasta resultados	Muy Bajo (Horas)	Bajo (Horas-Días)	Largo (días-semanas)
Sensibilidad	+	+++	++
Especificidad	+	+++	++
Linealidad de los resultados	Muy limitada (porcentuales)	Sí (Concentración absoluta y relativa)	No (ratios de expresión)
Reproducibilidad	-/+	++	++
Identifica clonalidad	No	Sí	Sí
Información adicional de la célula tumoral	Tamaño	Perfil fenotípico	No
Información de resto de células	Sí, limitada	Sí, completa	No
Coste por prueba	Bajo	Bajo	Bajo-intermedio

Tabla 1: Comparación de las distintas tecnologías para la detección de células de MF/SS.

Actualmente la EORTC incluye la determinación de células de MF/SS en sangre periférica tanto para el diagnóstico como para la evaluación de respuesta y seguimiento.(Scarisbrick et al., 2018; Trautinger et al., 2017) El estudio en médula ósea no está recomendado de forma rutinaria, ya que todos los pacientes con afectación en médula ósea presentan afectación en sangre periférica. La indicación de estudio admitida sería citopenias persistentes en pacientes bajo tratamiento para descartar otras patologías asociadas previo estudio en sangre periférica.

UTILIDAD CLÍNICA

Evaluación de la eficacia del tratamiento

Seguimiento de pacientes en remisión

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Inmunofenotipo mediante citometría de flujo multidimensional.

Este test está basado en la detección de las alteraciones inmunofenotípicas definitorias de MF/SS en la sangre periférica (como la pérdida de expresión de CD3, CD7 o CD26, siguiendo el documento técnico de la International ClinicalCytometrySociety), utilizando los clones recomendados, sin limitarlo a unos puntos de corte arbitrarios y con una adquisición de un número adecuado de células.(Horna et al., 2020; Lyapichev et al., 2020) Este estudio se complementa con la determinación de clonalidad sobre las poblaciones sospechosas mediante la detección de expresión o no de la isoforma Beta1 del TCRab. (Shi et al., 2019, 2020)

REQUERIMIENTOS DEL PACIENTE

No aplica

REQUISITOS DE LA MUESTRA

Sangre con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de tapón morado de 9mL para Citometría de Flujo.

Médula ósea con anticoagulante (EDTA K3). (Contenedor): Tubo de tapón morado para Citometría de Flujo.

Nota: La muestra debe ser enviada inmediatamente al laboratorio una vez extraída.

VALORES DE REFERENCIA

Informe de resultados interpretativo

VALORES CRÍTICOS

No aplica

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del inmunofenotipaje dependerán de la combinación de reactivos utilizados y de las poblaciones que han de ser estudiadas. Si se siguen los pasos definidos con anterioridad, pueden

identificarse de forma inequívoca poblaciones discretas de células neoplásicas y las distintas poblaciones leucocitarias normales en las muestras con una sensibilidad entre una célula por mil y una célula por cien mil o incluso inferiores, dependiendo de la calidad de la muestra.

La interpretación del resultado corre a cargo de los facultativos del laboratorio de Citometría de Flujo. Se realizará un informe interpretativo de la exploración.

TIEMPO DE RESPUESTA

Área de Citometría de Flujo Hematológica: siete días laborables desde la recepción de la muestra en el laboratorio

BIBLIOGRAFÍA

Van Dongen JJM, Lhermitte L, Bottcher S, Almeida J, Van Der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. 2012 May 3.

Davis BH, Holden JT, Bene MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, et al. 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. *Cytometry*. 2007;72 Suppl 1: S5–13.

Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. *Cytometry*. 2001. p. 23–7.

Cossarizza, A., Chang, H., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W.W., Akdis, M., Allez, M., Nogueira Almeida, L., et al. (2019). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol. In press*, 1–528.

Delfau-Larue, M.H., Laroche, L., Wechsler, J., Lepage, E., Lahet, C., Asso-Bonnet, M., Bagot, M., and Farcet, J.P. (2000). Diagnostic value of dominant T-cell clones in peripheral blood in 363 patients presenting consecutively with a clinical suspicion of cutaneous lymphoma. *Blood* 96, 2987–2992.

Horna, P., Wang, S.A., Wolniak, K.L., Psarra, K., Almeida, J., Illingworth, A.J., Johansson, U., Craig, F.E., and Torres, R. (2020). Flow cytometric evaluation of peripheral blood for suspected Sézary syndrome or mycosis fungoides: International guidelines for assay characteristics. *Cytom. Part B Clin. Cytom. cyto.b.21878*.

Lyapichev, K.A., Bah, I., Huen, A., Duvic, M., Routbort, M.J., Wang, W., Jorgensen, J.L., Medeiros, L.J., Vega, F., Craig, F.E., et al. (2020). Determination of immunophenotypic aberrancies provides better assessment of peripheral blood involvement by mycosis fungoides/Sézary syndrome than quantification of CD26– or CD7– CD4+ T-cells. *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* 1–9.

Mangold, A.R., Thompson, A.K., Davis, M.D., Saulite, I., Cozzio, A., Guenova, E., Hodak, E., Amitay-Laish, I., Pujol, R.M., Pittelkow, M.R., et al. (2017). Early clinical manifestations of Sézary syndrome: A multicenter retrospective cohort study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 77, 719–727.

Olsen, E., Vonderheid, E., and Pimpinelli, N. (2007). Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (. *Blood* 110, 1713–1723.

Scarisbrick, J.J., Whittaker, S., Evans, A. V., Fraser-Andrews, E.A., Child, F.J., Dean, A., and Russell-Jones, R. (2001). Prognostic significance of tumor burden in the blood of patients with erythrodermic primary cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 97, 624–630.

Scarisbrick, J.J., Hodak, E., Bagot, M., Stranzenbach, R., Stadler, R., Ortiz-Romero, P.L., Papadavid, E., Evison, F., Knobler, R., Quaglino, P., et al. (2018). Blood classification and blood response criteria in mycosis fungoides and Sézary syndrome using flow cytometry: recommendations from the EORTC cutaneous lymphoma task force. *Eur. J. Cancer* 93, 47–56.

Shi, M., Jevremovic, D., Otteson, G.E., Timm, M.M., Olteanu, H., and Horna, P. (2019). Single Antibody Detection of T-Cell Receptor $\alpha\beta$ Clonality by Flow Cytometry Rapidly Identifies Mature T-Cell Neoplasms and Monotypic Small CD8-Positive Subsets of Uncertain Significance. *Cytom. Part B - Clin. Cytom.*

Shi, M., Olteanu, H., Jevremovic, D., He, R., Viswanatha, D., Corley, H., and Horna, P. (2020). T-cell clones of uncertain significance are highly prevalent and show close resemblance to T-cell large granular lymphocytic leukemia. Implications for laboratory diagnostics. *Mod. Pathol.*

Trautinger, F., Eder, J., Assaf, C., Bagot, M., Cozzio, A., Dummer, R., Gniadecki, R., Klemke, C.D., Ortiz-Romero, P.L., Papadavid, E., et al. (2017). European Organisation for Research and Treatment of Cancer consensus recommendations for the treatment of mycosis fungoides/Sézary syndrome – Update 2017. *Eur. J. Cancer* 77, 57–74.

Vonderheid, E.C., Pena, J., and Nowell, P. (2006). Sézary cell counts in erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: Implications for prognosis and staging. *Leuk. Lymphoma* 47, 1841–1856.