

Evaluación de la prueba hemostática “tiempo de coagulación” realizada en recipientes de vidrio y plástico en caninos.

Assessment of hemostatic test “clotting time” made in glass and plastic containers in dogs.

Javier Green¹ MV, MSc; Nataly Psijas MV; Carolina Ríos² MV, MSc.

Recibido: 24 de Mayo de 2013.

Aprobado: 06 de Junio de 2013.

Resumen

La evaluación de la integridad del sistema hemostático comprende una serie de pruebas. Dentro de estas, se incluyen el Tiempo de Coagulación (TC) como prueba rápida de campo y el Tiempo de Tromboplastina Parcial activado (TTPa), ambas destinadas al análisis de las vías intrínseca y común de la hemostasis.

Para este estudio, se seleccionaron 25 perros sanos, sin distinción de raza ni sexo, enteros o castrados, con edades de 1 a 6 años y con un TTPa normal. A cada uno de ellos se les extrajo una muestra de sangre para realizar el TC en tres recipientes distintos: tubo de vidrio, tubo de plástico y jeringa. Los valores obtenidos demuestran tiempos promedio y desviación estándar para esta prueba de 7'54"± 54" en tubo de vidrio, 10'46"± 1'59" en tubo de plástico y 13'4"± 2'26" en jeringa, existiendo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los tiempos de coagulación en cada uno de los recipientes. También se determinó el coeficiente de correlación entre las variables TC y TTPa, observándose escasa correlación entre ellos.

Se concluyó que el tipo de recipiente utilizado para el TC es relevante, siendo el tubo de vidrio el más adecuado para su realización, presentando menor variabilidad respecto a la media y todos sus valores dentro de los intervalos de referencia descritos en la literatura. De acuerdo con estos resultados, la prueba rápida de campo TC no reemplaza a pruebas de laboratorio como el TTPa.

Palabras claves: Hemostasis, Tiempo de Coagulación, Tiempo de Tromboplastina Parcial activado, tubo de vidrio, tubo de plástico, jeringa.

(') minutos; (") segundos

Abstract

The complete assessment of the haemostatic system comprises a series of tests. Among these, Clotting Time (CT) and activated Partial Thromboplastin Time (aPTT) are included, both addressed to the analysis of the intrinsic and common pathways of hemostasis.

To carry out this study 25 dogs were selected, regardless of breed or sex, neutered or intact, aged between 1 and 6 years old. These animals went through an exhaustive clinical exam and complementary tests such as complete blood count (CBC), chemistry panel and activated Partial Thromboplastin Time were run to determine their health conditions. A blood sample was extracted from every dog to carry out the Clotting Time test in three different containers: glass tube, plastic tube and syringe. The obtained results show average times and standard deviation for this test of 7'54"± 54" in the glass tube, 10'46"± 1'59" in the plastic tube and 13'4"± 2'26" in the syringe. Also the correlation coefficient was determined between the variables CT and aPTT. The analysis of the results showed statistically significant differences ($p \leq 0,05$) between the clotting times in each of the containers. Besides, it showed the null or low correlation between Clotting Time and the activated Partial Thromboplastin Time. These results are also clinically important because the sort of container used to carry out this test is relevant, showing that the glass tube is the most suitable one, for it offered the lowest variability and all its values were found within the reference intervals.

Keywords: Hemostasis, Coagulation Time, activated Partial Thromboplastin Time, glass tube, plastic tube, syringe.

(') minutes; (") seconds

Introducción

El sistema hemostático se basa en un complicado equilibrio, muy regulado, entre la interacción de vasos sanguíneos, plaquetas y factores solubles implicados en la formación y disolución de coágulos sanguíneos,¹ y que tiene como principal función cohibir o detener una hemorragia.² Este sistema requiere que se desencadenen de manera simultánea diversos procesos o mecanismos: 1) Vasoconstricción local; 2) Reacciones de adhesión y agregación plaquetaria que terminan en la formación de un tapón hemostático primario; 3) Formación de un coágulo de fibrina y, finalmente, 4) Lisis de este último a través del mecanismo fibrinolítico.^{3,4}

Para explicar este sistema, se ha separado la hemostasia en las siguientes etapas: hemostasia primaria, que incluye la participación de los vasos sanguíneos y las plaquetas, además de otras sustancias plasmáticas;⁵ hemostasia secundaria, que corresponde al proceso en que se estabiliza a las plaquetas con una malla de fibrina,³ proceso que ha sido descrito como una “cascada”, dividiéndose en las vías intrínseca, extrínseca y común, en las cuales intervienen, en su mayoría, una serie de proteínas denominadas factores de coagulación.⁶

La vía intrínseca es considerada como el sistema el iniciador de la coagulación *in vivo*,⁶ a partir de la activación del Factor VII en presencia del Factor Tisular (FT) expresado sobre la superficie de las células del tejido dañado.⁷ Sin embargo, el efecto hemostático de la vía extrínseca es de corta duración debido a la presencia de inhibidores del complejo FT/VII.^{8,9}

La vía intrínseca comienza cuando la sangre entra en contacto con superficies de carga negativa, donde una serie de reacciones proteolíticas son iniciadas, resultando en la activación de los factores XII, XI, precalicreína y cininógeno de alto peso molecular (HMWK). Estos procesos, colectivamente, se denominan reacción de activación por contacto.¹⁰ En esta vía se incluye, además, la participación del factor IX y VIII.^{5,11}

Tanto la vía intrínseca como la extrínseca convergen en el factor X y, desde este nivel en adelante, los dos sistemas comparten una ruta o vía común, la que incluye a los factores X, V, II (protrombina), I (fibrinógeno).^{4,11}

La naturaleza propia de la coagulación sanguínea exige la existencia de mecanismos de control que limiten la propagación y extensión del coágulo de un modo incontrolado. Por ello,

el proceso de coagulación es regulado por dos mecanismos: eliminación de los factores de coagulación activados⁸ y la fibrinolisis.^{11,12}

Las pruebas comúnmente utilizadas para evaluar la integridad del sistema hemostático se dividen en aquellas capaces de evaluar la hemostasia primaria y otras encargadas de evaluar la coagulación propiamente tal.¹³ En el primer caso se incluyen el recuento de plaquetas y tiempo de sangría. En el segundo caso, se consideran el tiempo de coagulación (TC), tiempo de coagulación activado (TCA), tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) y el tiempo de trombina (TT).¹⁴

El TC, es el tiempo que transcurre entre la obtención de la sangre y su coagulación en un tubo de ensayo sin la presencia de aditivos. Esta prueba tiene por finalidad evaluar la vía intrínseca y común de la hemostasis.²

El mayor inconveniente de este ensayo es que puede verse influenciado por variados factores externos, como la forma de extracción de la sangre, el tamaño y superficie del tubo a utilizar en la prueba, la temperatura de incubación, entre otros.¹⁵ Se debe tener cuidado de no traumatizar la vena durante la obtención de la muestra y es esencial que la aguja sea insertada al interior de la vena de manera inmediata para evitar la inclusión de tromboplastina tisular liberada desde el endotelio vascular.¹¹

El TC corresponde a una modificación al método de Lee-White, que mide el tiempo de coagulación utilizando tres pequeños tubos, en los cuales se deposita la sangre y se mantienen a 37° C; cada treinta segundos se evalúa el primer tubo hasta que se forme un coágulo, luego se continua con el segundo y, al coagular la sangre del tercer tubo, se registra el tiempo.² Este tiempo puede presentar variaciones dependiendo si se realiza en un tubo de vidrio o de plástico. Esta prueba también puede realizarse en un capilar, quebrándolo cada cierto tiempo hasta que los fragmentos queden unidos.² En caninos, la coagulación demora entre 3 a 13 minutos.^{2,15}

En general, en la práctica clínica se priorizan pruebas con rápidos resultados y de bajo costo, por lo que es frecuente la utilización del TC y tiempo de sangría como métodos de evaluación de la hemostasia en pacientes quirúrgicos o también como acercamiento diagnóstico en aquellos pacientes que presentan signología clínica asociada a una alteración de la coagulación. Dado lo anterior y producto de que en las clínicas veterinarias existe acceso a diferentes tubos o recipientes para realizar el TC, es que se decidió determinar el efecto de estos materiales sobre la prueba.

¹ Hospital Clínico Veterinario, Universidad Santo Tomás. Camino a Catemito 1830, San Bernardo, Santiago.

² Universidad Santo Tomás, Av. Mendoza 120, Los Ángeles.

El objetivo principal de este estudio correspondió a evaluar los tiempos de la prueba hemostática tiempo de coagulación realizada en recipientes de distintos materiales, en perros clínicamente sanos.

La hipótesis estableció que el tipo de material del recipiente donde se realiza el TC influye sobre los resultados.

Materiales y método

El presente estudio se llevó a cabo en el Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Santo Tomás, sede Catemito (Laboratorio de Patología Clínica), ubicado en la Región Metropolitana, comuna de San Bernardo, Camino Catemito # 1830.

Se obtuvieron las muestras de sangre de 25 caninos clínicamente sanos, con un rango de edad entre uno y seis años, peso mayor a cinco kg, sin distinción de sexo ni raza.

El estado de salud se verificó a través de la anamnesis, examen físico y exámenes complementarios (hemograma, recuento de plaquetas, ALT, NUS, creatinina, albúmina y TTPa). El TTPa se determinó con el coagulómetro THROMBOTIMER (2 channel) BEHNK ELEKTRONIK®; descartándose a todo individuo con algún tipo de anormalidad en los parámetros anteriormente mencionados.

La venopunción para obtener la muestra de sangre para realizar los exámenes incluidos en la evaluación clínica de cada paciente, se realizó en una vena diferente a la utilizada en la extracción para la prueba tiempo de coagulación (TC).

Posterior a la depilación y desinfección de la zona, se procedió a la extracción de 3 ml de sangre desde la vena cefálica con jeringa de 5 ml y aguja 21G, teniéndose extremo cuidado de no traumatizar la vena durante la obtención de muestra, para no contaminar la sangre con tromboplastina tisular (factor que forma parte de la vía extrínseca de la coagulación). Para ello, fue esencial la inserción de la aguja al interior de la vena de forma exacta e inmediata.

Desde el momento en que la sangre ingresó a la jeringa, se empezó a contabilizar el tiempo con un cronómetro.

Rápidamente, se depositó 1 ml de sangre en el tubo de vidrio, 1 ml en el tubo de plástico, quedando 1 ml de sangre al interior de la misma jeringa (5ml) con la que se tomó la muestra. Los tres recipientes utilizados eran del mismo diámetro. Inmediatamente, los tres recipientes fueron colocados a baño maría a una temperatura constante de 37 ° C, en posición vertical.

Para evitar el ingreso de agua al interior de la jeringa, se le colocó a esta última una llave de tres pasos cerrada; tanto al tubo de vidrio como al de plástico se les puso una tapa de goma en su extremo superior. Todo esto, con el fin de mantener las mismas condiciones en los tres recipientes.

Mediante la inclinación de cada recipiente fuera del agua (los tres de forma simultánea), por un tiempo no mayor a 15 segundos, se observó y registró el momento en que se formó un coágulo de sangre visible. Este proceso se realizó a partir de los 3 minutos de obtenida la muestra y se repitió cada 30 segundos desde ese momento.

Los valores obtenidos en este estudio fueron expresados en minutos y segundos.

Los resultados obtenidos en el TC, en cada uno de los recipientes, fueron expresados en términos de promedios, rangos (min-máx) y desviación estándar. Los resultados fueron analizados con ANDEVA de modelo lineal general y la diferencia entre los promedios se determinó mediante la Prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Además, se realizó una correlación entre la prueba TTPa y los tiempos de coagulación registrados en cada recipiente.

Resultados

Los tiempos obtenidos de la prueba TC realizada en 25 perros clínicamente sanos y con un TTPa en rango normal se describen a continuación.

- Recipiente de vidrio: Todos los valores obtenidos de la prueba tiempo de coagulación, realizados en un tubo de vidrio se encontraron dentro de los rangos normales descritos por Stockham y Scott en 2008, con un tiempo promedio de siete min 54 seg (7'54") y una desviación estándar de 54 seg (54"), un tiempo mínimo de 6 min 30 seg (6'30") y un tiempo máximo de 10 min (10') (Tabla 1).

- Recipiente de plástico: De los 25 perros testeados, 3 de ellos obtuvieron un tiempo de coagulación mayor al rango máximo descrito por Stockham y Scott (2008). Es decir, el 12% de la muestra estudiada se escapa de los valores señalados como normales para esta prueba. El tiempo promedio de la prueba realizada en un tubo de plástico fue de 10 min 46 seg (10'46"), con una desviación estándar de 1 min 59 seg (1'59"), un tiempo mínimo de 8 min (8') y un tiempo máximo de 15 min 30 seg (15'30") (Tabla 1).

- Recipiente "jeringa": En este recipiente es donde se presentaron los tiempos de coagulación más prolongados y variables. Se obtuvieron 14 valores

por sobre los 13 minutos, es decir, un 56% del total de la muestra. De estos 14 valores, sólo dos de ellos también presentaron un tiempo de coagulación en el tubo de plástico por sobre el rango normal para la especie. El tiempo promedio obtenido de la prueba tiempo de coagulación en jeringa fue de 13 min cuatro seg (13'4"), con una desviación estándar de dos min 26 seg (2'26"), un tiempo mínimo de ocho min 30 seg (8'30") y un tiempo máximo de 18 min (18') (Tabla 1).

Es importante destacar que el intervalo de referencia para la prueba tiempo de coagulación en caninos varía entre tres a 13 minutos.¹⁵

Al comparar los resultados del TC en los tres diferentes tipos de recipiente, existieron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre ellos. Se observó el menor tiempo promedio en tubo de vidrio mientras que en la jeringa fue más prolongado, situando en valores intermedios al tubo plástico (Gráfico 1).

Al correlacionar las variables TC en los distintos recipientes (vidrio, plástico y jeringa) y el TTPa se obtuvo una escasa o nula asociación entre ellos (Tabla 2).

Discusión

En este estudio se observó que todas las muestras de sangre coagularon dentro de los diferentes tipos de recipiente, en ausencia de anticoagulante (tubo de vidrio, tubo de plástico y jeringa plástica), lo que se explica por la activación ciertos factores de la coagulación denominados

"factores de activación por contacto", que corresponden al Factor XII, precalcireína y al cininógeno de alto peso molecular (HMWK), proteínas que forman parte de la vía intrínseca de la hemostasis.¹ La activación de estos factores ocurre espontáneamente tras el contacto de éstos con una superficie de carga negativa.¹⁶ El fenómeno de autoactivación del Factor XII frente a estas superficies, permite la realización de pruebas hemostáticas como el tiempo de coagulación (TC) y el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa).¹²

Los estudios demuestran que los focos de cargas negativas son los determinantes críticos de las superficies activas naturales y artificiales. Mientras más negativa sea la carga de la superficie que tome contacto con estos factores, mayor será la rapidez con que la sangre coagule, ya que a mayor carga negativa, mayor es la cantidad de FXIIa y calcireína generada a partir del Factor XII y precalcireína respectivamente.¹⁶ La activación del Factor XI a partir de estas proteínas, induce una serie de reacciones proteolíticas, que *in vitro* resultan en la generación de trombina, con la subsiguiente formación de un coágulo de fibrina.¹²

Al comparar los diferentes tipos de recipiente utilizados en este estudio, se puede destacar que el tubo de vidrio presentó un TC promedio menor a los recipientes plásticos ($p \leq 0,05$) y con una desviación estándar también menor. Esto se explicaría en base a lo mencionado anteriormente, porque el tubo de vidrio proporciona una superficie de contacto con una carga negativa más fuerte en comparación al plástico.¹⁶

Tabla 1: Tiempos de Coagulación obtenidos en recipientes de distinto material, expresados en Promedio, Desviación estándar, Coeficiente de variación y rangos mínimos y máximos.

RECIPIENTE	n	\bar{x}	D.S	CV	Min- Máx
TUBO DE VIDRIO	25	7' 54"	a	54"	11,5%
TUBO DE PLÁSTICO	25	10' 46"	b	1' 59"	18,5%
JERINGA	25	13' 4"	c	2' 26"	18,7%

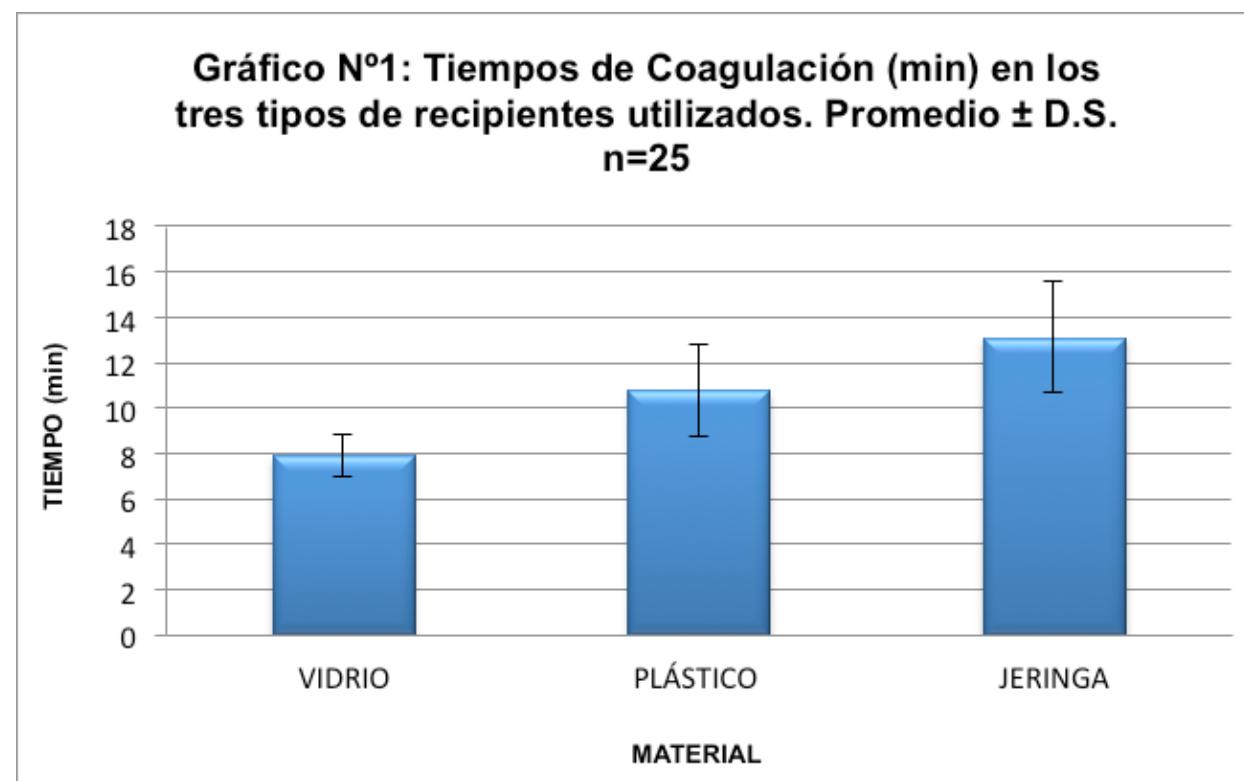
Letras distintas para la misma columna indica diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$).

(') minuto; (") segundo.

Tabla 2: Correlaciones entre TTPa y los distintos tiempos de coagulación obtenidos en el recipiente de vidrio, plástico y jeringa

	TC recipiente vidrio	TC recipiente plástico	TC "jeringa"
Coef. De correlación (r)	0,36	0,08	0,19

(TC) Tiempo de Coagulación



La razón que explica que tanto el tubo de plástico como la jeringa muestren tiempos de coagulación distintos ($p \leq 0,05$), a pesar de estar constituidos por el mismo material (polipropileno), no pudo ser determinada con exactitud. La única diferencia conocida entre ambos recipientes es que la jeringa fue sometida a un proceso de esterilización con óxido de etileno durante la fase de fabricación, en cambio, el tubo de plástico no fue esterilizado bajo ningún método.

El bajo costo y la rapidez en la obtención del resultado son las mayores virtudes que presenta el TC. Pese a que posee una sensibilidad menor al de otras pruebas diagnósticas, en aquellos casos donde no es posible acceder a éstas, o bien como parte del examen pre-quirúrgico de un paciente, se le considera una herramienta útil. Esta prueba de campo generalmente es realizada por el clínico en una jeringa hipodérmica, la misma que se utiliza para la extracción de la muestra de sangre, debido a que es uno de los elementos más accesibles y comunes de encontrar en cualquier clínica veterinaria.

Las diferencias entre los valores obtenidos de los tres recipientes poseen significancia estadística, lo que se traduce en una implicancia clínica, ya que el estudio dejó en evidencia el alargamiento de los tiempos de coagulación al realizar la prueba en una jeringa, no así en un

tubo de vidrio, lo que puede llevar al médico veterinario a un diagnóstico erróneo. Y en este punto, es importante destacar que en el caso de tubo de vidrio, todos los individuos presentaron tiempo de coagulación dentro de los rangos de referencia utilizados para esta prueba, lo que no ocurrió en los recipientes plásticos, siendo más dramático en el caso de la jeringa. Se demuestra entonces que el recipiente más indicado para llevar a cabo la prueba de TC en caninos es el tubo de vidrio, siendo el único recipiente que obtuvo valores dentro de los rangos normales en el total de las muestras testeadas, además de presentar la menor variabilidad con respecto a la media.

En relación a la escasa o nula correlación existente entre el TC y el TTPa, podría deberse a que ambas pruebas, a pesar de proporcionar información sobre las mismas vías de la coagulación, presentan diferencias en cuanto a su sensibilidad, requerimientos y procedimientos para su realización. Destacando que el TC posee una sensibilidad menor, dado que requiere que la pérdida de actividad del o los factores supere el 90% para prolongarse,¹⁷ en cambio, el tiempo de tromboplastina parcial activado sólo se alarga cuando la actividad de los factores es inferior del 30 a 35% de lo normal.¹ Además, el tiempo de coagulación puede verse influenciado por un número plaquetario disminuido.¹⁷ Esto hace que no sean pruebas excluyentes y debe ser el médico veterinario quien decida la aplicabilidad de cada

una de ellas, en cada caso en particular.

Conclusiones

Los valores obtenidos en cada uno de los recipientes mostraron diferencias estadísticas, lo que indica que el tipo de material del recipiente utilizado influye en la determinación del tiempo de coagulación. Siendo el tubo de vidrio, el recipiente más indicado para realizar esta prueba, ya que presentó la menor variabilidad con respecto a la media, en comparación con los otros recipientes.

Existe una escasa o nula correlación entre la prueba tiempo de coagulación y el tiempo de tromboplastina parcial activado, por lo tanto, la prueba de campo no puede sustituir a la de laboratorio.

Referencias bibliográficas

- Topper M, Welles E. Hemostasia. En: Latimer K, Mahaffey E, Prasse KW. Duncan & Prasse's patología clínica veterinaria. 4a. ed. Multimédica. España; 2006: 121-166.
- Rudolph W. Hemostasis. En: Rudolph W y Wilhelm G. Manual de hematología clínica veterinaria. Universidad de Chile. Santiago, Chile; 2002: 59-71.
- Quintana M, Cabestrero D, García de Lorenzo y Mateos A. Coagulación y hemorragia en el paciente crítico: patrón, pruebas diagnósticas y etiología. Medicina Intensiva; 2003, 27(9): 605-614.
- Guyton A; Hall J. Hemostasia y coagulación de la sangre. En su: Tratado de fisiología médica. 11a ed. Elsevier. Madrid, España; 2006: 457-467.
- España F, Estellés A. Mecanismos moleculares de la coagulación sanguínea y fibrinólisis. Métodos de exploración. En: García- Conde J, San Miguel J, Sierra J. Hematología. Aran. Madrid, España; 2003: 335-351.
- Ettinger S, Feldman E. 2002. Tratado de medicina interna veterinaria: enfermedades del perro y el gato. 6a. ed. Elsevier. Madrid, España; 2002.
- Chu A, Whan Z, Raicu M, Beydoun S, Ramos N. Protamine inhibits tissue factor-initiated extrinsic coagulation. British Journal Haematology; 2001, 115: 392-399.
- Feldman B, Zinkl J, Jain N. 2000. Schalm's veterinary hematology. 5a. ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins USA; 2000.
- Tobu M, Ma Q, Iqbal O, Schultz C, Jeske W, Hoppnesteadt D, Fareed J. Comparative tissue factor pathway inhibitor release potential of heparins. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis; 2005, 11(1): 37-47.
- Gailani D, Renne T. The intrinsic pathway of coagulation:
- a target for treating thromboembolic disease?. Journal Thrombosis and Haemostasis; 2007, 5: 1106-1112.
- Jain N. Coagulation and its disorders. En su: Essentials of veterinary hematology. Pennsylvania, Lea & Febiger. USA; 1993: 82-104.
- Schmaier A, Thornburg C, Pipe S. Coagulation and Fibrinolysis. En: McPherson, R., Pincus, M. Henry's: clinical diagnosis and management by laboratory methods. 21a. ed. Philadelphia, Saunders Elsevier. USA; 2007: 729-746.
- Gentry P, Burgess H, Wood D. Hemostasis. En: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Clinical biochemistry of domestic animals. 6a. ed. Elsevier. USA; 2008: 287-330.
- Vives J, Aguilar J. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. 3a ed. Masson. Barcelona, España; 2006.
- Stockham S; Scott M. 2008. Fundamentals of veterinary clinical pathology. 2a. ed. Blackwell Publishing. Iowa, USA; 2008.
- Smith S. Overview of Hemostasis. En: Weiss D, Wardrop K. Schalm's veterinary hematology. 6a. ed. Wiley-Blackwell. Iowa, USA; 2010: 635-653.
- Smith J, Day T, Machin, A. Diagnosing bleeding disorders. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian; 2005, 2:828-843.