

Microtécnicas en coagulación

Por los Dres.:

ERNESTO DE LA TORRE MONTEJO Y WILFREDO TORRES IRIBAR^(*)

Con la colaboración técnica de:

ANDRÉS CRUZ TIRADO^(***)

El diagnóstico y clasificación de las enfermedades hemorrágicas más frecuentes en pediatría requieren, desde el punto de vista de Laboratorio, a más de un personal técnico especialmente entrenado, técnicas, que por una parte, toman un tiempo considerable y por otra necesitan de una cantidad importante de sangre, no siempre fácilmente obtenible de una vena superficial en un niño pequeño. Estas dificultades han dado lugar al desarrollo de técnicas que a la vez que relativamente sencillas, sean lo suficientemente sensibles para hacer descartar un grupo importante de enfermedades hemorrágicas en poco tiempo y con escasa cantidad de sangre. El objeto de este trabajo es dar a conocer nuestra experiencia con las microtécnicas de *Lovric-Margolis*^{1,2} para tiempo de protrombina y de coagulación con kaolín, y la microtécnica de T.G.T. de *Hicks* y *Pitney*.^{3,4}

(*) Trabajo presentado en el XI Congreso Médico y VII Estomatológico Nacional, celebrado en la Habana, del 23 al 26 de febrero de 1966.

(**) Del Departamento de Hematología del Hospital Infantil "William Soler", Reparto Altahabana, Habana, Cuba.

(***) Técnico del Departamento de Hematología del Hospital Infantil "William Soler", Reparto Altahabana, Habana, Cuba.

Material y métodos:

Tiempo de coagulación con kaolín y tiempo de protrombina (*Microtécnicas Lovric-Margolis*).

Material:

1. Hoja de bisturí.
2. Pipeta de 0.2 cc. para microtécnica.
3. Tubos de ensayo 10 x 75, siliconizados y no siliconizados.
4. Baño de María.
5. Cronómetro.

Reactivos:

1. Citrato trisódico al 0.2%.
2. Suspensión de kaolín (5 mg. x ml. de Cl Na al 0.9%).
3. Cloruro de Ca 0.025 M en solución de Cl Na al 0.9%.
4. Cloruro de Ca 0.025M.
5. Tromboplastina.

Método: (Tiempo de protrombina)

—Se obtienen 0.2 ml. de sangre de una pequeña herida en un dedo de la mano o talón en el pie.

—Los 0.2 ml. de sangre obtenidos se depositan en un tubo siliconizado conteniendo 0.8 cc. de citrato trisódico al

0.2% aspirando varias veces y dejando que la pipeta escurra por alrededor de un minuto.

—El tiempo de protrombina se puede determinar en cualquier momento en las siguientes cinco horas:

En un tubo de 10 x 75 mm. no siliconizado, en baño de María a 37°C se mezclan 0.2 ml. del hemolisado, 0.1 ml. de tromboplastina y 0.1 m. de Cl_2 Ca al 0.025 M. El coágulo es pequeño, pero bien visible. El resultado se compara con las tablas adecuadas de acuerdo a la hemoglobina del paciente.

(Tiempo de coagulación con kaolín).

—Debe realizarse una vez que el hemolisado se ha incubado a la temperatura del cuarto por espacio de $\frac{1}{2}$ a 2 horas.

—En un tubo no siliconizado de 10 x 75 mm. y en baño de María a 37°C se mezclan 0.2 ml. del hemolisado con 0.1 ml. de la suspensión de kaolín, incubándose la mezcla por tres minutos y agitando ocasionalmente.

—A los tres minutos se añaden 0.1 ml. de Cl_2 Ca al 0.025 M. en solución salina, se arranca el cronómetro, anotándose el momento en que se produce el coágulo. El valor obtenido se compara con el valor normal que corresponde a la hemoglobina que tiene el paciente. Un defecto del sistema intrínseco debe sospecharse si el tiempo excede en 10 segundos o más al considerado normal.

—Debe siempre hacerse un control normal para asegurarse que todos los reactivos están trabajando bien.

T.G.T. (Hicks y Pitney).

—Se hace una pequeña punción con hoja de bisturí No. 11, obteniéndose 0.1 ml. de sangre en una micropipeta siliconizada.

La sangre se mezcla con 0.9 ml. de una solución buffer de citrato contenida en un tubo de centrifuga de polietileno o siliconizado.

—Se centrifuga a 3.000 R.P.M. durante 15 minutos y la porción sobrenadante se lleva a un tubo 13 x 100 (La porción sobrenadante representa una dilución del plasma al 1 x 20 aproximadamente). Se deja en el refrigerador durante 30 minutos.

En un tubo de ensayo en baño de María a 37°C se mezclan 0.5 ml. de la dilución del plasma del paciente, 0.5 ml. de cefalina (0.025%) y 0.5 ml. de Cl_2 Ca (0.0125 M), echando a andar el cronómetro.

—A los 3, 5 y 7 minutos 0.1 m. de la mezcla y 0.1 ml. de Cl_2 Ca (0.025 M) se añaden en secuencia a un tubo de ensayo conteniendo 0.1 m. de plasma-substrato, cronometrándose el momento de la formación del coágulo. Normalmente no debe haber un tiempo de más de 13 segundos en el tubo de los 7 minutos.

RESULTADOS

Se hicieron determinaciones en niños normales escogiendo inicialmente los casos que iban a ser intervenidos por patología banal respiratoria superior (adenoidectomía y / o amigdalectomía). Para casos de hemoglobina inferiores a 10 g. Se escogieron niños ingresados por diversas patologías en el Hospital. Los resultados fueron agrupados por valores de hemoglobina entre 6 y 14 g. y comparados con los valores obtenidos por los autores originales (ver Tabla 1). Se hicieron una serie de determinaciones en pacientes adultos que estaban recibiendo terapéutica anticoagulante. El resultado se comparó con la determinación del tiempo de protrombina según Quick (ver Tabla No. 2).

TABLA No. 1

*Valores promedios en grupos de pacientes normales.
Las cifras entre paréntesis indican los valores obtenidos por los
autores originales.*

Hemoglobina		Tiempo protrombina		Tiempo de coagulación	
GM	%	Segs.		Kaolín	Segs.
6		18.5		54	
7		19		57	
8		19.1	(17.5)	59	(57)
9		19		56.4	
10		19.5	(18.5)	56.6	(62)
11		21.2		56.1	
12		20.7	(20.5)	58	(65)
13		22.2		63	
14		21.2		59	
15			(24.5)		(73)

TABLA No. 2

*Tiempo de protrombina en pacientes con terapéutica anticoagulante.
Los asteriscos indican casos en las que la alteración del tiempo de
coagulación con kaolín evidenció un defecto del sistema intrínseco.*

T. DE P (Quick)		T. DE P (Lovric Margolis)	
Control	Paciente	Normal	Paciente
13 segs.	24 segs.	24.5 segs	*58 segs.
14 "	30 "	24.5 "	57 "
14 "	28 "	17.5 "	*36 "
14 "	17 "	18.5 "	23 "
13 "	18 "	20.5 "	*35 "
14 "	30 "	20.5 "	*54.5 "
13 "	32 "	22 "	*68 "
12 "	18 "	22 "	*30 "
12 segs.	20 segs.	24 segs	*32 segs.

A todos los casos que fueron estudiados por ser sospechosos de tener alguna diátesis hemorrágica se les realizaron en los últimos meses las pruebas convencionales y las microtécnicas, encontrándose una perfecta correlación entre ambos estudios. De acuerdo a lo señalado en la literatura¹ se encontró que los estados trombocitopénicos no afectaron ni el tiempo de coagulación con kaolín ni el T.G.T. de *Hicks y Pitney*.

En los tres casos que resumimos a continuación se evidencia la importancia de la microtécnica en circunstancias en las que no fue posible obtener la sangre requerida para las técnicas convencionales.

L.A.C.: Niño de tres años que con el único antecedente de hematoma frontal post-traumático a los 2½ años comienza a sangrar por los incisivos centrales superiores dos días antes de ser visto por nosotros. Al no ser posible obtener suficiente cantidad de sangre para todo el estudio deseado se completó con microtécnica.

Tiempo de sangramiento (*Duke*): 2 minutos.

Tiempo de coagulación (*Lee White*): 11.30 minutos.

Tiempo de coagulación con kaolín (*Lovric-Margolis*): 120 segs.

Normal: 65 segundos. + — 10.

Prueba del Lazo: Negativa.

Retracción de coágulo: Retráctil.

Conteo de Plaquetas (método de *Brecher*): 190,000 p.m.c.

Tiempo de Protrombina (*Quick*): Control: 12 segs. Paciente: 12 segs.

Tiempo de Protrombina: (*Lovric-Margolis*): 20 segs. Normal: 20 segs.

Protrombina residual (*Stefanini*): Control: 54 segs. Paciente: 14 segs.

T.G.T. (*Hicks y Pitney*):

Minutos	3	5	7
Control	41 segs.	22 segs.	13 segs.
Paciente	+50 "	+50 "	+50 "
P. B.C.	+50 "	32 "	15 "
S. C.	20 "	19 "	23 "

G.S.M.: Niño de dos meses de edad, con historia de hermano hemofílico por defecto de Factor VIII, es remitido al servicio porque la madre "ha sido informada" que el niño tiene una diátesis hemorrágica de distinta índole. No fue posible obtener sangre de vena superficial, por lo que se realizó estudio con microtécnica.

Tiempo de sangramiento (*Duke*): 2 minutos.

Tiempo de coagulación (*Lovric-Margolis*): 230-250 segundos.

Normal: 65 segundos + — 10.

Prueba del Lazo: ligeramente positiva.

Conteo de Plaquetas (método de *Brecher*): 288,000 p.m.c.

Tiempo de Protrombina (*Lovric-Margolis*): 18 segundos. Normal: 20.5 segundos.

T.G.T. (*Hicks y Pitney*):

Minutos	3	5	7
Control	11 segs.	11 segs.	12 segs.
Paciente	52 "	52 "	65 "

G.V.C.: Niño de seis meses con agenesia de vías biliares, intervenido quirúrgicamente por anastomosis de yeyuno a hígado. Transfundido masivamente durante la intervención. Pocas horas después de salir del Salón comenzó a sangrar por la sonda gástrica. Se realizó pequeño estudio de coagulación por microtécnica:

Conteo de Plaquetas (método de *Brecher*): 65,000 p.m.c.

Tiempo de Protrombina (*Lovric-Margolis*): 25 segundos.

Normal: 23 segundos + — 3 segundos.

Tiempo de coagulación con kaolín (*Lovric-Margolis*): 93 segundos.

Normal: 70 segundos + — 10 segundos.

T.G.T. (*Hicks y Pitney*):

Minutos	3	5	7
Control	45 segs.	25 segs.	13 segs.
Paciente	+50	„ +50	„ 24

Fue tratado con sangre y plasma fresco disminuyendo progresivamente el sangramiento en los días siguientes.

DISCUSION:

De las investigaciones necesarias para la clasificación de la mayor parte de los casos de síndromes hemorrágicos en pediatría, el tiempo de sangramiento y conteo de plaquetas necesarios para el diagnóstico de las diátesis vasculares y plaquetarias se puede hacer por sangre capilar. El diagnóstico de los defectos plasmáticos requiere técnicas laboriosas y cantidades importantes de sangre. Es aquí, donde las microtécnicas son de más utilidad, y si contamos con métodos para determinar los defectos del sistema intrínseco (tiempo de coagulación con kaolín, T.G.T. de *Hicks y Pitney*) y sistema extrínseco (tiempo de protrombina de *Lovric-Margolis*), un estudio bastante completo puede realizarse con sólo unas pocas décimas de cc. de sangre. Con discretas modificaciones pueden in-

tentarse la corrección del defecto encontrado con plasma, bario o suero viejo, permitiendo esto concretar aún más el diagnóstico. Ocasionalmente hemos tenido dificultad en este último aspecto no siendo la corrección obtenida lo suficientemente evidente como para permitarnos llegar a conclusiones definitivas. Desde el punto de vista de la sencillez y reproducibilidad entendemos que las técnicas de *Lovric-Margolis* pueden resultar de más utilidad en el Laboratorio Hematológico Pediátrico, aunque el *Hicks y Pitney* de técnica algo más elaborada puede resultar útil como complemento en caso de diagnóstico dudoso.

CONCLUSIONES Y RESUMEN:

Se reporta nuestra experiencia con las microtécnicas de coagulación de *Lovric-Margolis* y T.G.T. de *Hicks y Pitney*. Estos métodos fueron elaborados en casos normales y en diátesis hemorrágicas de distinta índole. En muchos casos se realizaron paralelamente las técnicas convencionales de coagulación.

Se encontró que las técnicas eran sencillas, sensibles, y por lo tanto, de gran utilidad en el diagnóstico de los síndromes hemorrágicos en pediatría.

Estas pruebas pueden usarse como método rápido y sensible de descarte en niños y en algunas circunstancias en adultos. Siempre que se estime oportuno debe intentarse la comprobación de sus resultados con las técnicas convencionales.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—*Margolis, J.*: Some experiences with a simplified micromethod for coagulation studies. *Brit. J. Haemat.* 7: 21, 1961.
- 2.—*Lovric, V. A. and Margolis, J.*: Rapid Screening Methods for Bleeding Disorders. A three year survey. *Thrombos. Diatesis. Haemorrh.* 11, 506, 1964.
- 3.—*Hicks, N. D. and Pitney, W. R.*: A rapid screening test for disorders of thromboplastin generation. *Brit. J. Haemat.* 3: 227, 1957.
- 4.—*Abildgaard, C. F., Conet, J. O., Johnson, H. and Schulman, I.*: Screening tests for disorders of thromboplastin formation. *Pediat. Clin. N. Amer.* 9: 819, 1962.