

Estandarización del control de calidad en el laboratorio de hemostasia

Standardization of quality control in the haemostasis laboratory

Dra. Olga Silvia Pantaleón Bernal, Lic. María Eugenia Triana Mantilla, Dra. Cs. Milagros Tomasa García Mesa

Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular (INACV). La Habana. Cuba

RESUMEN

Introducción: el control de calidad es indispensable en los laboratorios clínicos para ofrecer resultados confiables.

Objetivos: establecer las bases para estandarizar el control de calidad del laboratorio de hemostasia.

Métodos: se evaluó una mezcla de plasma normal obtenida del banco de sangre provincial de La Habana. Al plasma (líquido, congelado y descongelado) se le midió pH, tiempo de protrombina y de tromboplastina parcial activado. Fue almacenado a 20° C, descongelado, filtrado y liofilizado. A este último, se le midió pH y las mismas variables cada cuatro meses durante un año. En una segunda etapa, al plasma normal preparado y liofilizado, se le hizo repetibilidad y reproducibilidad, y se determinó el tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activado, dosificación de fibrinógeno, tiempo de trombina y dosificación de factor VII, que también fueron determinados en un plasma normal comercial. Se compararon los valores promedios de cada indicador en ambos plasmas. Se realizó una evaluación del plasma por tres laboratorios externos y se determinaron los valores de referencia local para cada ensayo.

Resultados: el plasma mantuvo los valores de pH y actividad coagulante adecuados durante un año. La evaluación externa corroboró que los valores hallados estaban dentro del intervalo de referencia del plasma estudiado. Los valores de referencia locales resultaron similares a los informados por los fabricantes de los reactivos.

Conclusiones: el plasma evaluado tiene estabilidad y repetibilidad, por lo que puede ser utilizado para control de calidad. Los valores de referencia locales para cada indicador garantizan la confiabilidad de los resultados.

Palabras clave: control de la calidad, plasma control, hemostasia, coagulación sanguínea.

ABSTRACT

Introduction: quality control is indispensable in clinical laboratories to offer reliable results.

Objective: to establish the bases to standardize quality control in the haemostasis laboratory.

Methods: a normal plasma mixture obtained from the Provincial Blood Bank of Havana was evaluated. PH, prothrombin time, and activated plasma thromboplastin time were measured to plasma (liquid, frozen and defrosted). It was stored at -20° C, defrosted, strained and lyophilized. To this last one, the pH and the same variables were measured every four months for a year. At a second stage, re-taking and reproducibility was made to the prepared and lyophilized normal plasma and prothrombin time, activated plasma thromboplastin time, fibrinogen dosage, prothrombin time and dosage of VII factor were determined which were also determined in a commercial normal plasma. The average values of each indicator were compared in both plasmas. An evaluation of the plasma was conducted by three external laboratories and local reference values were determined for each trial.

Results: plasma maintained the adequate coagulant activity and pH values for a year. An external evaluation corroborated that the findings in the values were within the reference intervals of the plasma under study. Local reference values were similar to the ones informed by the manufacturers of the reagents.

Conclusions: the evaluated plasma has stability and repeatability so it can be used in quality control. The local reference values for each indicator guarantee the reliability of the results.

Key words: Quality control, control plasma, haemostasis, blood coagulation.

INTRODUCCIÓN

Las determinaciones que se realizan en el laboratorio de hemostasia orientan y fundamentan un diagnóstico clínico apropiado de las enfermedades hemorrágicas y trombóticas, identifican los defectos que las producen, y a su vez establecen las pautas para realizar un control adecuado de la terapia antitrombótica.

El control de las variables que intervienen en la eficacia de las pruebas de hemostasia, se basa en tener en cuenta las variables que participan en el momento en que se efectúa el procedimiento técnico de las determinaciones. Esto forma parte del control

de calidad que se debe llevar a cabo en todos los laboratorios, los cuales asumen un elevado compromiso al tener en sus manos acciones de gran importancia.

Los nuevos analizadores, además del mantenimiento de las pruebas clásicas para el estudio de la coagulación, han hecho necesaria la aplicación de medidas de control de la calidad analítica de forma habitual. Se deben llevar a cabo controles internos mediante determinaciones diarias de los diferentes indicadores con plasma control de concentración normal y patológica y valorar mensualmente el coeficiente de variación inter-día. Aparte de este control interno, los laboratorios deberán participar en uno o más programas externos de garantía de la calidad, de ámbito local, nacional o internacional.¹

El objetivo del control de calidad interno es asegurar el cumplimiento de todos los procedimientos establecidos para el trabajo del laboratorio y el monitoreo de la precisión de los métodos con el propósito de detectar y corregir cualquier error. Este control incluye una serie de exámenes variados y acciones reglamentadas cuando se trata de implantar lo establecido en las buenas prácticas de laboratorio. Además, incluye el monitoreo diario de los procedimientos analíticos mediante los plasmas controles, la construcción de las curvas de control y la evaluación de la dispersión de los resultados obtenidos.^{2,3}

El control externo de la calidad está constituido por diferentes procedimientos que realizan los laboratorios de referencia para la evaluación de otros laboratorios especializados. Se trata de procesar muestras de material control proporcionada por un agente externo, según la rutina del laboratorio. Además, permite comparar el funcionamiento de diferentes equipos y métodos para un mismo análisis y evalúa su confiabilidad.^{4,5}

En general, el estudio de la hemostasia en Cuba ha adolecido de falta de recursos, y aparejado con esto, los laboratorios especializados en realizar sus técnicas, han carecido de una adecuada estandarización de su control de calidad. No es hasta hoy que se han situado en algunos centros el equipamiento y los reactivos necesarios para realizar, con tecnología de punta, los estudios mínimos de coagulación y su control. Esto permite, además de una mejoría notable en la calidad de los resultados ofrecidos por el laboratorio, la homologación de los mismos. Por esta razón, resulta el momento idóneo para trabajar en el control de calidad de dichas determinaciones para mejorar el grado de fidelidad y precisión intra e interlaboratorios, inclusive con la incorporación de aquellos donde la tecnología aún no resulte de avanzada.

El Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular (INACV) cuenta con un laboratorio de hemostasia encaminado fundamentalmente al apoyo del diagnóstico de estados hipercoagulables presentes en las enfermedades vasculares periféricas, así como al control del tratamiento antitrombótico; por lo que se pretende con el presente trabajo es establecer las bases para estandarizar el control de calidad de dichos estudios, aún al tener en cuenta la posibilidad de no poder contar con materiales controles comerciales por el elevado costo que conlleva su obtención.

MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental, prospectivo, y aplicado, donde se evaluó una mezcla de plasma normal obtenida del banco de sangre provincial en La Habana. Para su procesamiento se asumieron los requisitos vigentes emitidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la recolección, procesamiento y calidad de un *pool* de plasma.⁶

El plasma fue homogenizado en el laboratorio y distribuido en tubos plásticos para su uso. Se realizaron mediciones de pH, y como medida de su actividad coagulante, se efectuaron determinaciones de tiempo de protrombina (TP), para lo cual se utilizó el reactivo *Neoplastine Plus*, y de tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), con el juego de reactivos *CK-Prest*, ambos comercializados por la firma francesa *Diagnostica Stago*; para medir los tiempos de coagulación se utilizó como lector de punto final el coagulómetro electromecánico STart 4, comercializado por la misma firma, y posteriormente fue almacenado en alícuotas a 20° C durante un mes hasta su uso. Después de descongelado se filtró para su homogenización y se realizaron la mismas mediciones para comprobar su estabilidad.

El plasma fue liofilizado y almacenado a -20° C durante un mes. Para su uso, el material liofilizado fue reconstituido con agua destilada hasta 1 mL, y se dejó en reposo durante 30 min previo a ser utilizado. Se repitió el mismo proceder cada cuatro meses durante un período de un año y se realizaron iguales mediciones.

Se utilizó la prueba t de Student para muestras pareadas para comparar los valores promedios de los diferentes parámetros obtenidos del plasma control preparado líquido y liofilizado, un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para comparar los resultados obtenidos según el período de conservación del plasma control (1, 4, 8, y 12 meses).

En una segunda etapa, al plasma normal preparado y liofilizado se le determinó la precisión en serie (repetibilidad) y la precisión de día a día (reproducibilidad). La realización de las pruebas de repetibilidad se llevó a cabo repitiendo cada ensayo por 10 veces consecutivas utilizando muestras del pool del plasma control normal liofilizado, en condiciones idénticas, utilizando el coagulómetro. Como medida de precisión se calcularon los coeficientes de variación (CV) para cada magnitud medida.

Se calculó el valor promedio y el rango de valores en el cual se debían mover cada uno de los indicadores a controlar: tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), dosificación de fibrinógeno, (Fgno), tiempo de trombina (TT) y dosificación de factor VII (FVII), utilizando el plasma preparado y un plasma normal comercial (comercializado por la firma francesa *Diagnostica Stago* y específico para el control de calidad interno cuando se utiliza el coagulómetro STart 4). Se compararon los valores promedios de cada parámetro con ambos plasmas mediante una prueba t de Student para muestras pareadas.

Para la realización de las pruebas de reproducibilidad, las muestras de plasma control se procesaron una cada día, durante 20 días por duplicado. Se calculó la media y la desviación estándar para los plasmas controles y se determinó como indicador de precisión el coeficiente de variación (CV).

A tres laboratorios que realizan pruebas de hemostasia, se enviaron tres viales con muestras del plasma normal preparado liofilizado con el objetivo de valorar su calidad fuera del laboratorio de evaluación.⁷ Las muestras se utilizaron para realizar la prueba del tiempo de protrombina, por ser una de las pruebas de más frecuente petición en

los laboratorios de hemostasia debido a su utilidad en el diagnóstico de los defectos de la vía extrínseca de la coagulación y para el control del tratamiento anticoagulante oral;⁸⁻¹⁰ se procesaron por duplicado siguiendo las normas establecidas de rutina en cada centro y se utilizó como resultado final la media de dichos duplicados.

Se establecieron los valores de referencia locales para cada ensayo utilizando el coagulómetro. Se realizó la determinación de cada indicador en 63 individuos supuestamente sanos con edades entre 18 y 70 años, que no estuvieran ingiriendo medicamentos que pudieran afectar el mecanismo de la coagulación.

RESULTADOS

No se encontraron diferencias apreciables entre los valores de pH, TP y TTPa del plasma líquido y los valores de estas mediciones obtenidos después de su descongelación. Se alcanzaron resultados similares en los valores obtenidos posteriormente al proceso de liofilización y conservación realizado cada 4 meses durante un año ([tabla 1](#)).

Al comparar los resultados promedios obtenidos en el plasma control normal liofilizado preparado con su homólogo comercial, no se encontraron diferencias significativas, con la excepción del TT para el que se encontró una $p = 0,004$ a pesar de que los valores eran muy similares ([tabla 2](#)).

Se comprobó que el coeficiente de variación, que es un indicador de precisión, resultó menor de 5 % para todas las pruebas ([tabla 3](#)).

Se pudo constatar que los valores obtenidos de la medición del TP, en los tres laboratorios externos, eran superiores al obtenido por el laboratorio del INACV, pero en todos los casos, los valores se encontraban dentro del intervalo de referencia hallado para el plasma en estudio ([tabla 4](#)).

Se ofrecen los indicadores hemostáticos que se miden más frecuentemente en el laboratorio del INACV, encontrados en una muestra de personas supuestamente sanas ([tabla 5](#)).

DISCUSIÓN

El plasma control normal procesado y evaluado para su uso en el control de calidad interno del laboratorio de hemostasia del INACV, se mantuvo estable por un período de un año ya que sus características cumplen con los requerimientos planteados por el *Deutsches Institut für Normung*,¹¹ que plantea que un plasma es estable si el tiempo de coagulación de dos muestras del mismo, realizadas al menos en un intervalo de 14 días no excede más de un 20% de la media de las determinaciones y su pH después de descongelación o reconstitución no excede de 7,8. En el presente estudio, todas las determinaciones realizadas de pH se mantuvieron alrededor de 7,0 y los tiempos de

coagulación se mantuvieron similares, por lo que se consideró que la preparación tuvo una buena estabilidad en el tiempo aún después de liofilizado y conservado a -20° C.

No se encontraron diferencias significativas entre los resultados promedios obtenidos con el plasma control evaluado y los obtenidos con su homólogo comercial. Sin embargo, aunque se hubieran encontrado diferencias, este resultado carece de importancia práctica en contraposición con lo que sucede con los materiales calibradores. Las características fundamentales de los plasmas controles deben ser la estabilidad y la repetibilidad. Los plasmas controles, sean comerciales o preparados deben ser límpidos, libre de hemólisis, y debidamente filtrados para mantener su estabilidad en el tiempo y asegurar que se incorporen al control diario replicas idénticas de una muestra.¹²

El coeficiente de variación (CV), cuyo valor aceptable difiere para cada indicador controlado y depende de que el método utilizado para su medición sea manual o automático con lectura mecánica u óptica. De forma general, el CV para los coagulómetros mecánicos se considera aceptable hasta el 5 % para las pruebas de coagulación fundamentales del laboratorio de hemostasia (TP y TTPa) y se admite que sea por debajo del 10 % para el resto de las determinaciones (determinación de fibrinógeno, dosificación de factores).^{12,13} En la prueba de repetibilidad, los CV para todos los procedimientos fueron menores que el 5 %.

En la prueba de reproducibilidad del plasma se confirmó también que los resultados fueron precisos ya que el indicador se mantuvo en todos los casos con valores por debajo de los recomendados.

De la valoración de la calidad del plasma normal preparado liofilizado realizado por laboratorios externos a través del TP, se puede inferir que la evaluación fue apropiada y que la calidad del trabajo desarrollado por el laboratorio del INACV fue satisfactoria. Esto indica que el plasma obtenido puede utilizarse con un alto nivel de confiabilidad para realizar el control de calidad interno mediante la construcción de las cartas de control de calidad.

No obstante, por razones de bioseguridad, las autoridades reguladoras internacionales y en Cuba el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), han prohibido el uso de mezclas de plasma o suero de origen humano como controladores preparados en los laboratorios, debido a las grandes epidemias e infecciones de estos tiempos. Es por esta razón que se preparó el plasma control a partir de plasma obtenido en el banco de sangre, el cual es analizado con las correspondientes pruebas para excluir la presencia de hepatitis B y C y el virus del HIV. Sin embargo, hay que tener presente que ninguno de estos análisis puede garantizar de forma absoluta la ausencia de agentes infecciosos, por lo que, al igual que se recomienda para las preparaciones comerciales, es necesaria la manipulación del mismo con las debidas precauciones.

Los valores de referencia locales calculados para cada indicador hemostático resultaron ser muy similares a los informados por el fabricante de los juegos de reactivos empleados para su determinación. Estos valores fueron hallados bajo las condiciones habituales de trabajo del laboratorio con la finalidad de elevar la confiabilidad de los resultados, facilitar su interpretación y de esta forma evitar el error médico.¹⁴

El plasma evaluado presentó estabilidad y repetibilidad, por lo que el laboratorio de hemostasia del INACV está en condiciones de estandarizar un sistema de control de la calidad que garantice bajo cualquier circunstancia la calidad en sus resultados y su mejor interpretación al contar con los valores de referencia locales para cada indicador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ruiz de Chávez AA, Núñez E, Muñoz B, Majluf A. El control de la calidad en el laboratorio de coagulación. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2008;46:339-48.
2. Dati F. Quality management and standardization programs in Hemostaseology. JIFCC. 1996;8:111-6.
3. Favaloro EJ, Lippi G, Adcock DM. Preanalytical and postanalytical variables: the leading causes of diagnostic error in hemostasis? Semin Thromb Hemost. 2008;34:612-34.
4. Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Emerging technologies and quality assurance: the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme perspective. Semin Thromb Hemost. 2007;33:243-9.
5. Spannagl M, Dick A, Reinauer H. External quality assessment schemes in coagulation in Germany: between regulatory bodies and patient outcome. Semin Thromb Hemost. 2007;33:259-64
6. World Health Organization technical report. Requirements for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy. Ser N° 687. Geneva: WHO; 1983.
7. Cruz Rodríguez C. Implementación del sistema de evaluación externa de la calidad de los laboratorios clínicos del segundo y tercer nivel de atención [tesis]. La Habana: Universidad de Ciencias Médicas de La Habana; 2011 [citado 12 Nov 2012]. Disponible en: <http://tesis.repo.sld.cu/352/>
8. Pantaleón O, Triana ME, Aldama A, Garrido MJ, Alonso M, Sánchez T. Estandarización del laboratorio para la creación de una unidad de control del tratamiento con anticoagulantes orales. Rev Cubana Angiología Cir Vasc. 2010 [citado 12 Nov 2012];11(1):34-42. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/ang/vol11_01_10/ang05110.htm
9. Pantaleón O, Triana ME, Garrido MJ, Alonso M, Sánchez T. Estado actual en Cuba del control del tratamiento con Anticoagulantes Orales. Rev Cubana Angiol Cir Vasc. 2011 [citado 12 Nov 2012];12(1). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/ang/vol12_01_11/ang05111.htm
10. Pantaleón O, Triana ME. Control del tratamiento anticoagulante oral mediante el uso de sangre capilar. Rev Cubana Angiol Cir Vascular. 2012 [citado 12 Nov 2012];13(2). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/ang/vol13_2_12/ang12212.htm

11. Deutsches Institut für Normung. Gerinnungsanalytik: Referenzplasma, Begriffe, Anordnungen, Herstellung. Berlin: Benth Verlag GmbH; 1979.
12. Díaz Concepción Alina. Aspectos del aseguramiento de la calidad en los laboratorios de Hemostasia. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 2002 [citado 12 Nov 2012];18(2). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol18_2_02/hih01202.htm
13. Morejón M. El laboratorio clínico y los conceptos asociados a la calidad en Cuba. La Habana: Comité Técnico de Normalización de Laboratorios Clínicos y Diagnosticadores; 2004 [citado 12 Nov 2012]. Disponible en: <http://www.ifcc.org/ria/div/vol2/morejon.pdf>
14. Ramos Domínguez BN. Métodos estadísticos y control de calidad moderno. En: Cruz Valdés L. editor. Control de calidad de la atención de salud. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2011[citado 12 Nov 2012]:102-23. Disponible en: http://bvs.sld.cu/libros/control_decalidadde laatencion_desalud/indice_h.htm

Recibido: 15 de febrero de 2013.

Aprobado: 28 de marzo de 2013.

Olga Silvia Pantaleón Bernal. Instituto Nacional de Angiología y Cirugía Vascular.
Calzada del Cerro 1551 esq. a Domínguez. El Cerro 12000. La Habana. Cuba. Dirección
electrónica: opantal@infomed.sld.cu