

# Preparación y estandarización de una Tromboplastina costarricense

DR. ALBERTO BARRANTES B.\*

DR. JORGE E. FONSECA G.\*

## Introducción

Bien conocida es la serie de problemas que conlleva la ejecución del Tiempo de Protrombina, haciendo de esta prueba de coagulación una de las que más interesa ha despertado dentro de la gente que se dedica a la coagulación,

Existen tres condiciones que son las responsables de las variaciones que puede tener esta prueba tanto en su ejecución como en su reporte, a) la tromboplastina, es el principal reactivo usado y al contrario de lo que se puede pensar no es un reactivo uniforme, b) la expresión de los resultados, existen en este momento hasta cinco formas de expresarlos, y c) la ejecución de la prueba, influenciada en toda su extensión por diferentes factores; de origen personal, y de reactivos, métodos y equipo.

Desde la década pasada se ha intentado en varias formas resolver estos problemas, llevando a cabo encuestas de control (9, 11, 12, 21), estandarización de las técnicas (4, 5, 6, 7, 13, 15, 19, 25), calibración de tromboplastinas (2) y estudios comparativos entre diferentes tromboplastinas (10, 16, 21, 22), lo que ha ayudado a obtener datos suficientes para observar la magnitud de los problemas y los inconvenientes que tiene la técnica en sí.

Es importante destacar la labor de L. Poller en Manchester, que ha logrado instaurar un Programa de Control de la Terapia con Anticoagulantes Orales en Gran Bretaña preparando una tromboplastina de referencia (17) —The Manchester Compa-

rative Reagent (MCR)—, de la cual se ha derivado la British Comparative Thromboplastin (BCT) preparada a partir de lotes de la MCR y certificada conforme al esquema del Grupo de Control de Anticoagulantes del Comité Británico para Estandards en Hematología (The British Committee for Standards in Haematology) (8).

La BCT ha servido además para llevar a cabo la estandarización de tromboplastinas en diferentes centros ingleses (1, 12), así como para la ejecución de diferentes encuestas internacionales para valorar las tromboplastinas y los métodos que usan los laboratorios de diferentes países.

Como nuestro laboratorio forma parte del Grupo Internacional de Estudio para el Control de Anticoagulantes (International Study Group for Anticoagulant Control) auspiciado por la OMS, con base a sus recomendaciones preparamos nuestra propia tromboplastina y es nuestro interés presentar los datos de estandarización de dicha tromboplastina, así como el estudio comparativo llevado a cabo con la BCT con plasmas normales y anormales.

## Material y métodos

*Tromboplastina.* Se preparó la tromboplastina a partir del cerebro humano de acuerdo con las recomendaciones del International Study Group for Anticoagulant Control (20):

Reactivo Fenol-salina, agua destilada 1.500 ml, NaCl 13.58 g, Fenol 7.5 g.

Obtener un cerebro humano dentro de las primeras 24-48 horas post-mortem. Des-

\* Laboratorio de Investigación Clínica, Hospital México — C.C.S.S.

cartar si hay congestión, olor poco usual o evidencia de absceso o tumor. Remover y descartar las meninges y el cerebelo bajo agua corriente, cortar tiras de 1-2 cm. de ancho. Remover al máximo los pequeños vasos, cortar piezas pequeñas. Homogenizar 2-3 minutos en una licuadora corriente y añadir fenol-salina precalentado a 45°C. Incubar a 37°C por 30 minutos, colocar en recipiente de vidrio y dejar por 24 horas a 4°C. Centrifugar. Remover el sobrenadante y la capa superior del sedimento en un volumen aproximado de 1/10 el volumen del sobrenadante. Guardar el sobrenadante a 45°C por dos semanas y luego probar la potencia que tiene la tromboplastina y estandarizarla.

#### Estandarización de la Tromboplastina

Se procedió a estandarizar la tromboplastina con los procedimientos sugeridos por el mismo Grupo, tomando como tromboplastina de referencia la British Comparative Thromboplastin suministrada por L. Poller del National Reference Laboratory for Anticoagulant Control Reagents Withington Hospital, Manchester England.

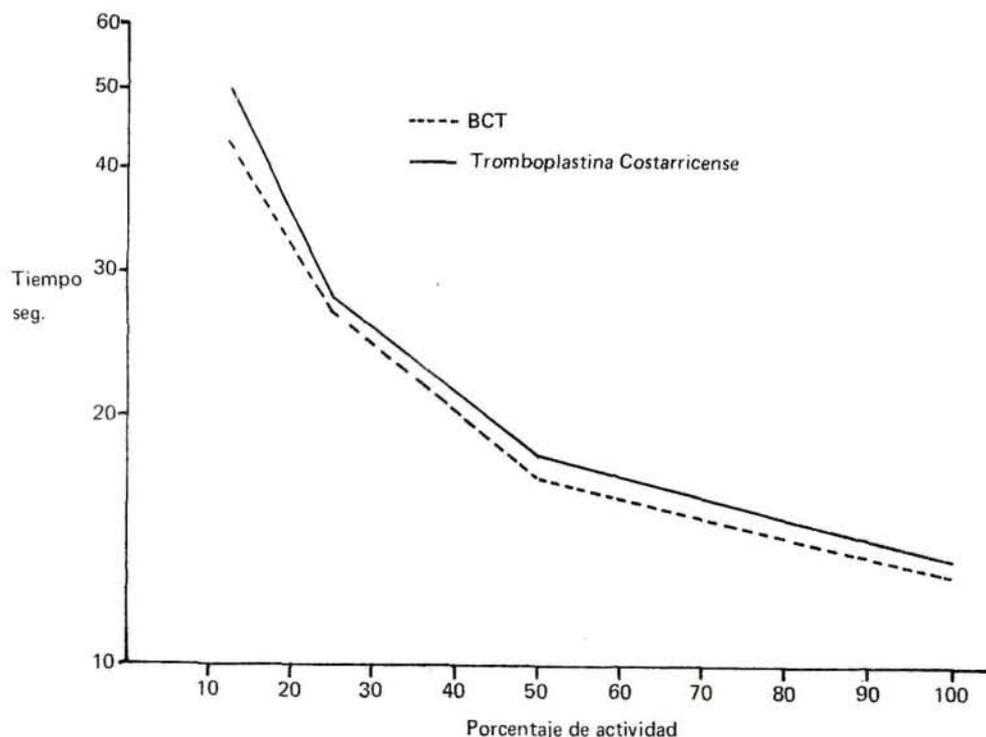
Se usó la técnica para el Tiempo de Protrombina descrita por Poller en 1970 (18), basada en la técnica de Quick (23), para la determinación de la prueba con cada tromboplastina tanto en plasmas normales como anormales.

Se determinó así mismo la Razón de Sensibilidad de nuestra Tromboplastina que es aquel valor que nos indica la sensibilidad a la deficiencia de factores, obtenida con base en una tromboplastina de referencia de sensibilidad conocida. Se usaron 10 plasmas, —1 normal y A anormales— basados en el método descrito por Loeliger *et al* en 1975 (14).

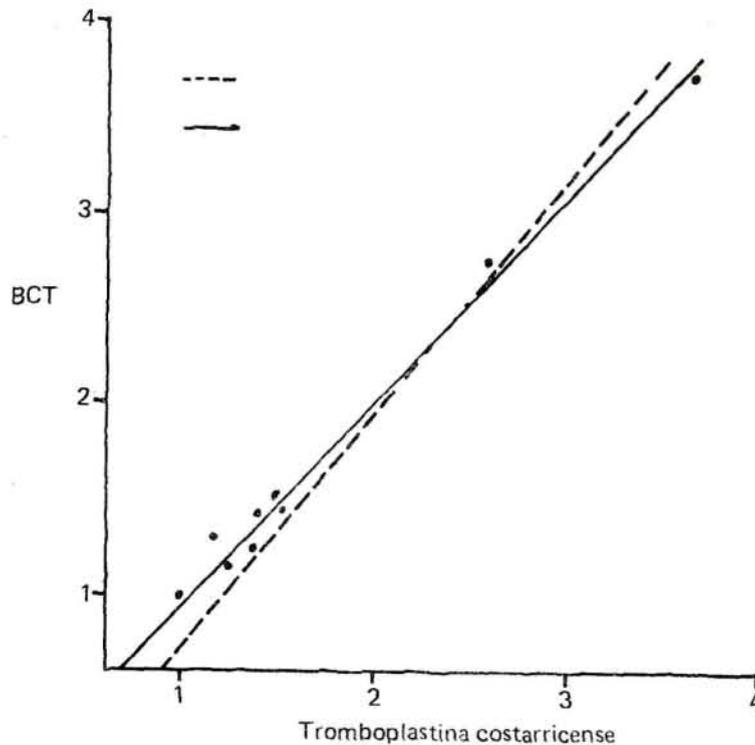
Por medio del método gráfico propuesto por Alderson *et al* en 1975 (1), se plotearon en un gráfico las razones obtenidas con ambas tromboplastinas para obtener una comparación visual de los resultados, usando la línea de mejor ajuste y la línea calculada.

Estas líneas son usadas para convertir valores obtenidos con nuestra tromboplastina en valores correspondientes en términos de la BCT.

Curvas de actividad de la BCT y la tromboplastina costarricense



Cálculo de la Razón de Sensibilidad  
de la tromboplastina costarricense



Uso de la Tromboplastina

Una vez estandarizada la tromboplastina y obtenida la Razón de sensibilidad de la misma, se procedió a probarla con 18 plasmas —2 normales y 16 anormales—, determinándose de Protrombina tanto con nuestra tromboplastina como con la BCT. Se calculó la Razón para cada muestra (Tiempo de Protrombina de la muestra/Tiempo de Protrombina del normal 100%) y el porcentaje de actividad tomándolo de una curva dosis-respuesta preparada con anterioridad (Gráfico I).

Se procedió a hacer el análisis estadístico de las variaciones y la prueba de "t" con los datos de razón y porcentaje obtenidos con ambas tromboplastinas (24).

Resultados

En el Gráfico I se ven las curvas dosis-respuesta obtenidas con ambas tromboplastinas. Se puede observar que la nuestra dio valores un poco más largos que la BCT

—1-2 segundos—, para las muestras estándar, pero la curva se localizó paralela a la de la BCT.

El Gráfico II muestra las curvas de correlación de las razones de ambas tromboplastinas, no encontrándose gran diferencia entre las razones de sensibilidad obtenidas con la curva de mejor ajuste (2.0) y con la curva calculada (2.04), tal como lo demostraron Alderson *et al* (1).

La Razón de Sensibilidad de la tromboplastina en estudio fue de 2.0 calculada con el método de Loeliger *et al* (14), tal como se ven en la Tabla I, en concordancia con los resultados del Gráfico II.

La Tabla II muestra los resultados del estudio comparativo de las razones de los 18 plasmas estudiadas. Los datos estadísticos indican una correlación bastante buena, con una t de 1.31 y una  $p > 0.1$ , lo que indica que no hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos con ambas tromboplastinas.

La Tabla III muestra lo mismo sólo que se usó en este caso el porcentaje de actividad dando una *t* de 1.41 con una *p* > 0.1, indicando que tampoco hay diferencia significativa entre los resultados obtenidos en porcentaje de actividad.

#### Discusión

Las pruebas de laboratorio son calificadas primeramente con base en su especificidad, sensibilidad, exactitud y precisión, quedando en un segundo plano de conve-

nencia la economía. Por lo tanto en lo que al Tiempo de Protrombina se refiere es de gran importancia contar con una prueba que nos ofrezca estas características, pero la situación se complica al no haber consenso sobre cual es el mejor método y tipo de tromboplastina que debe usarse, con el agravante de que cada casa comercial clama en el sentido de que su producto es el mejor.

Estando la prueba influenciada en toda su extensión por diferentes factores y como todas las alteraciones ocurren sistemáticamente es posible detectarlas y corregirlas adecuadamente. Como el número de variables es muy grande, la sistematización se torna extremadamente ardua si no se dispone de una orientación adecuada, por lo tanto es necesario la adopción de un plan rígido de estandarización y si es posible, de uno que permita correlacionar los resultados con una experiencia internacional (1).

Con el objeto de resolver en parte las dificultades de la prueba comenzamos en 1976 a preparar nuestra propia tromboplastina de acuerdo con el método propuesto por L. Poller (20), y con la posibilidad de poder usar la BCT, hemos logrado estandarizarla en una forma bastante adecuada al obtener una Razón de Sensibilidad de 2.0, lo cual la hace similar en sensibilidad a la BCT. Además los resultados comparativos con la BCT con diferentes plasmas son halagadores pues los estudios nos indican que no hay diferencias significativas entre los resultados, pues tanto con la razón como con el porcentaje de actividad la *p* fue mayor de 0.1 lo cual quiere decir que las diferencias que existen se deben exclusivamente al azar.

Basados en estos resultados hemos denominado a esta tromboplastina -Tromboplastina Costarricense de Referencia (TCR)-, para que sirva como referencia en el país para que los diferentes laboratorios puedan estandarizar sus métodos y tromboplastinas.

Contando con esta TCR se ha propuesto también un Programa de Control de Calidad para el Tiempo de Protrombina (3), que pretende subsanar los problemas existentes en el país con esta técnica, teniendo como objetivos principales la concientización del personal de laboratorio, establecimiento de un solo método en todo el país y uniformidad en la expresión de los resultados.

TABLA I  
DETERMINACION DE LA RAZON DE SENSIBILIDAD DE LA TROMBOPLASTINA COSTARRICENSE

Plasmas	BCT	Tromboplastina Costarricense
Normal	13 *	13.5
Anormales	19	21
	18	19
	16	16
	17	20
	18.5	19
	15.5	17
	20	20
	36	35.5
	48.5	50
Promedio normal	13	13.5
Promedio anormal	23.16	24.16
Razón anormal normal	1.78	1.78
Razón de sensibilidad	2	

\* Promedio de las lecturas en segundos.

$$\frac{1.78 + 1.78 - 2}{1.78 - 1} = 2.0$$

TABLA II  
COMPARACION DE LAS RAZONES DE  
LA B.C.T. Y LA TROMBOPLASTINA  
COSTARRICENSE EN 18 PLASMAS

Plasma	BCT	Tromboplastina Costarricense
1	1.0	1.0
2	1.08	1.07
3	2.66	2.92
4	3.75	3.69
5	1.33	1.34
6	2.16	2.65
7	2.25	2.57
8	1.50	1.53
9	4.75	4.15
10	1.91	2.00
11	3.75	3.46
12	1.37	1.50
13	1.33	1.46
14	2.75	2.61
15	2.75	2.65
16	2.33	2.30
17	1.75	1.96
18	1.50	1.50
	39.92	40.36
	2.21	2.24
Suma de los cuadrados Entre tromboplastinas 1 Gl.		0.010
Residual 34 Gl.		32.37
Variancia Entre tromboplastinas Residual		0.010 0.95
Razón de Variancias (F) P		0.01 0.1
Diferencia media		0.03
Error Estandar de la media		0.023
t		1.31
P		> 0.1

TABLA III  
COMPARACION DE LOS PORCENTAJES  
DE ACTIVIDAD DE LA B.C.T. Y LA  
TROMBOPLASTINA COSTARRICENSE  
EN 18 PLASMAS

Plasma	BCT	Tromboplastina Costarricense
1	100	100
2	86	88
3	17	20
4	10	18
5	58	66
6	23	24
7	21	25
8	42	50
9	12.5	14
10	28	37
11	10	18
12	48	52
13	57	56
14	16	24
15	16	24
16	21	20
17	34	27
18	43	52
Total	642.5	715
Promedio	35.69	39.72
Suma de los cuadrados Entre Tromboplastinas 1 Gl.		101.67
Residual 34 Gl		21027.52
Variancia Entre tromboplastinas Residual		101.67 618.45
Razón de Variancias (F) p		0.16 0.1
Diferencia media		3.36
Error Estandarde la media		2.37
t (17 Gl)		1.41
P		> 0.1

## BIBLIOGRAFIA

- 1.—ALDERSON, M.R., POLLER, L., THOMSON, JEAN, M.:  
Validity of the British system for anticoagulant control using the national reagent. *J. Clin. Path.* 23: 281, 1970.
- 2.—BANGHAM, D.R., BIGS, R., BROZOVIC, M., DENSON, K.W.E.:  
Calibration of five different thromboplastins, using fresh and freeze-dried plasma. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 20:228, 1973.
- 3.—BARRANTES, A.:  
Programa de Control de Calidad para el Tiempo de Protrombina. En prensa.
- 4.—BIGGS, R., DENSON, K.W.E.:  
Standardization of the one-stage prothrombin time for the control of anticoagulant therapy. *Brit. Med. J.* 1:84, 1967.
- 5.—BIGGS, R., BANGHAM, D.R.:  
Standardization of the one-stage prothrombin test for the control of anticoagulant therapy: availability and use of thromboplastin reference preparations. *Brit. Med. J.* 3:470, 1971.
- 6.—BIGGS, R., BANGHAM, D.R.:  
Letter to the Editors: Standardization of the one-stage prothrombin time test for the control of anticoagulant therapy. *Thrombos. diathes. haemorrh.* 27:203, 1971.
- 7.—DENSON, K.W.E.:  
International and national standardization of control of anticoagulant therapy in patients receiving coumarin and indanedione drugs using calibrated thromboplastin preparations. *J. Clin. Path.* 24: 460, 1971.
- 8.—HILLS, M., INGRAM, G.I.C.:  
Monitoring successive batches of British Comparative Thromboplastin. *Brit. J. Haemat.* 25: 445, 1973.
- 9.—KOEPEKE, J.A.:  
The 1969 survey of prothrombin time. *Am. J. Clin. Path.* 54: 502, 1970.
- 10.—KORSAN-BENGSTEN, K., JOHSEN, M., PEHRSSON, N.G.:  
Comparison between British Comparative Thromboplastin (BCT) and factor II-VII-X determination method (Simplastin A) based on fresh plasma samples from dicoumarol-treated patients. *Thrombos. Haemostas (Stuttg.)* 37: 98, 1971.
- 11.—LECK, I., THOMSON, JEAN, M., POLLER, L.:  
Quality control trials in the National Reference Thromboplastin scheme. *Brit. J. Haemat.* 25:453, 1973.
- 12.—LECK, I., GOWLAND, E., POLLER, L.:  
The variability of measurement of the prothrombin time ratio in the National Quality control trials: a Follow-up study. *Brit. J. Haemat.* 28:601, 1974.
- 13.—Loeliger, E.A., BOEKHOUT-MUSSERT, M.J., VAN HALEM-VISSER, L.P., HABBEMA, J.D.E., DE JONGE, H.:  
Reliability of laboratory test for the control of oral anticoagulation. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 32: 483, 1974.
- 14.—LOELIGER, E.A., HALEM-VISSER, L.P., VAN:  
Simplified thromboplastin calibration procedure designed for standardization of anticoagulant control. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 33: 172, 1975.
- 15.—MIALE, J.B., LAFOND, D.J.:  
Prothrombin time standardization. *Am. J. Clin. Path.* 52: 154, 1969.
- 16.—MIALE, J.B., KENT, J.W.:  
Performance characteristics of reference thromboplastins. *A. J. Clin. Path.* 60:453, 1973.
- 17.—POLLER, L.:  
A national standard for anticoagulant therapy. *The Manchester Comparative Reagent. Lancet.* 1:491. 1967.
- 18.—POLLER, L.:  
The British Comparative Thromboplastin. *Association of Clinical Pathologist, Broadsheet, No. 71, 1970.*
- 19.—POLLER, L.:  
The British National Thromboplastin. *Brit. J. Haemat.* 20:359, 1971.
- 20.—POLLER, L.:  
Preparation and standardization of human brain extract thromboplastin. *Comunicación personal.*
- 21.—POLLER, L., THOMSON, JEAN M.:  
The interpretation of prothrombin results. A national survey. *Brit. J. Haematol.* 16:31, 1969.
- 22.—POLLER, L., THOMSON, J.M., ALDERSON, M.R.:  
The British system for anticoagulant control and thrombotest. *J. Clin. Pathol.* 24: 143, 1971.
- 23.—QUICK, A.J., LEU, M.:  
Quantitative determination of prothrombin. *J. Biol. Chem.* 119:81, 1937.
- 24.—SMART, J.V.:  
Elementos de estadística médica. Editorial Marín S.A., Barcelona, 1972.
- 25.—ZUCKER, S., CATHEY, M.H., SOX, P.J., HALL, E.C.:  
Standardization of laboratory test for controlling anticoagulant therapy. *Am. J. Clin. Path.* 53: 348, 1970.