Automatizando el laboratorio de hemostasia

Dra Cristina Duboscq
Servicio de Hematologia
Hospital Britanico de Bs AS

Historia de la automatización

- En 1900 se observaba la formación de fibrina en slides
- En 1912 Koagulometer midio la coagulacion a temperatura controlada con un piston
- En 1923 aparece la nefelometría
- En 1939 Nygaard desarrolla un coagulómetro fotoeléctrico
- En 1970 comienzan la medida foto óptica

Mayo Foundation for Medical Education and Research 2001

El laboratorio de hemostasia hoy

- Diagnostico de coagulopatías
- Estudios basales de coagulación
- Estudios de trombofilia
- Control de anticoagulación

Control de anticoagulación con dicumarínicos

Sangrado crítico

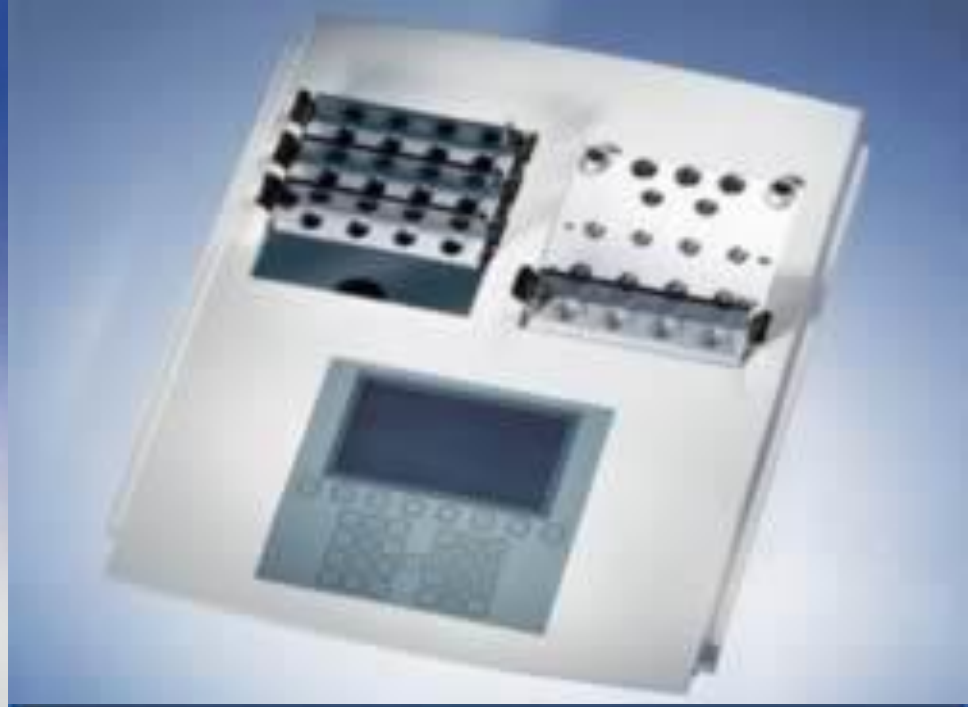
SEMIAUTOMATICOS

- Estandariza el punto final
- Pocas det día
- No aumenta la bioseguridad
- Punto final coagulable y algunas determinaciones cromogénicas e inmunológicas
- Costo Menor

AUTOMATICOS

- Mayor bioseguridad
- Mayor productividad
- Test coagulométricos
- Test inmunológicos
- Test colorimétricos
- < variabilidad interlaboratorio
- Código de barra para pacientes y reactivos
- Perforadores de tapa
- Conexión al LIS
- Altos costos

086.5
Thrombotrack



ACL TOP

ELITE PRO

ACL 7000

Destiny MAx

BCS XP Siemens

STA-Evolution

Desteny plus

Sysmex CA 1500

STA compact

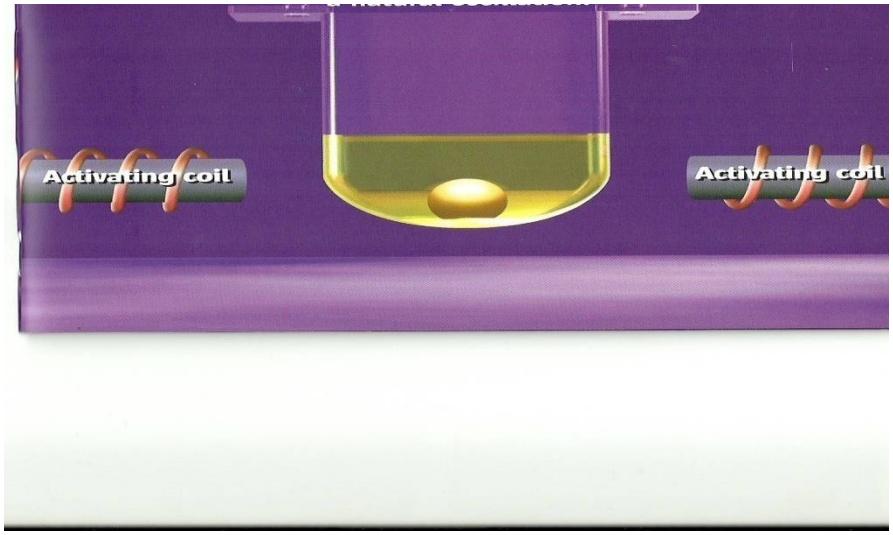
Coagulómetros
Métodos de detección del coagulo

- **Deteccción fotoóptica**
- **Detección nefelometríca**
- **Detección basada en la viscocidad**
- **Detección electromagnetica**

•Detección basada en la viscocidad

Viscocidad :es la resistencia del material a cambiar de forma

Se monitorea la formación del coagulo a través del cambio de amplitud del movimiento de una bolilla



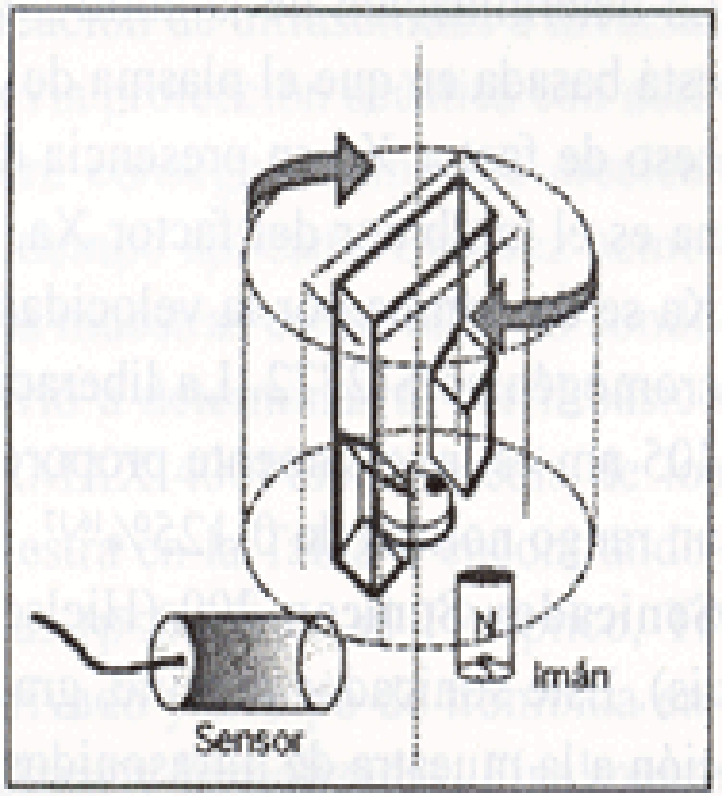
Al formarse el coagulo la viscocidad aumenta y la amplitud decrece

La ventaja de este sistema es que puede utilizarse cualquier tipo de muestras ictéricas , lipémicas etc.

Desventaja: dificil detección de los coagulos friables

Es el sistema utilizado por lo coagulómetros Diagnostica STAGO

Detección mecánica



Basado en el empleo de una cubeta de reacción especial con una bola de acero incorporada.

La bola se mantiene fija en una posición en la cubeta, gracias a la acción de un imán magnético.

Con la adición del reactivo, la cubeta empieza a rotar alrededor de su eje longitudinal, manteniéndose la bola en su sitio gracias al campo magnético.

La formación de fibrina, desplaza la bola de su posición original y este cambio de posición es registrado por un sensor que automáticamente registra el tiempo de formación del coágulo.

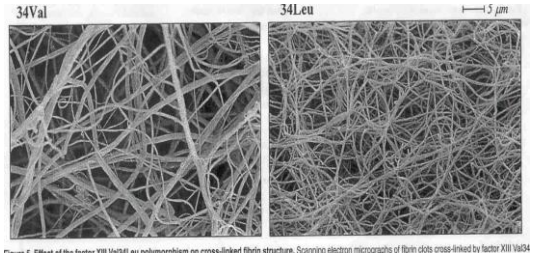
Estos equipos también hacen una detección óptica del coagulo .

Los coagulómetros de la firma Amelung. son los representantes de esta metodología

Detección fotoóptica

LUZ

FBG



Variación de la luz

Dispersión | **Absorción** | **Reflexión**

Medida de la señal

Transformación de la señal en un dato hemostático

Detecccción fotoóptica

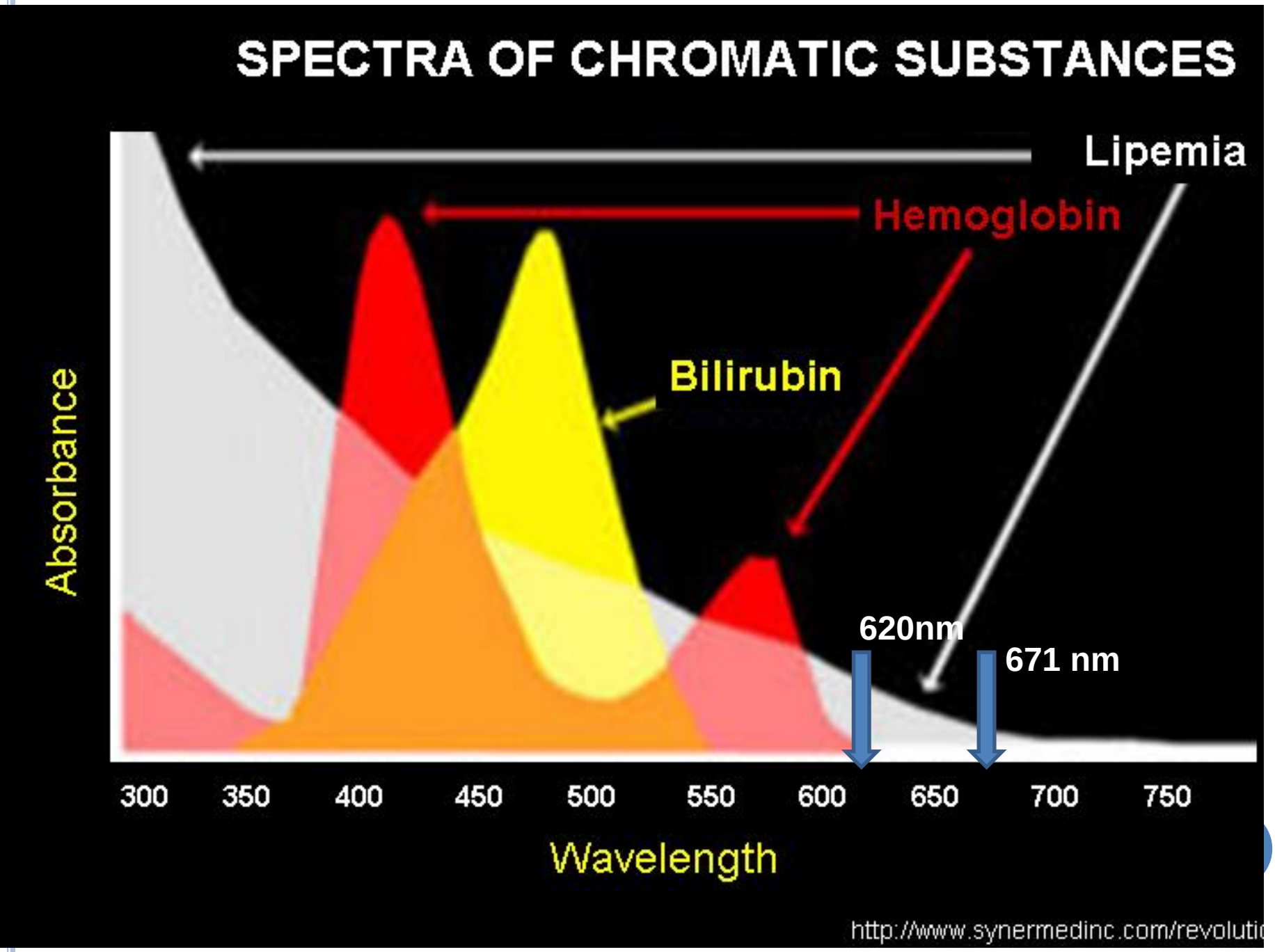
•Basada en el cambio de ABS que se observa al producirse la malla de fibrina.

• Cada coagulómetro utiliza un algoritmo diferente para calcular el punto final. Algunos definen el punto final cuando se alcanza el 50 % del cambio total de absorbancia, es decir el punto de inflexión de la curva. Este método depende fuertemente de la concentración de Fbg.

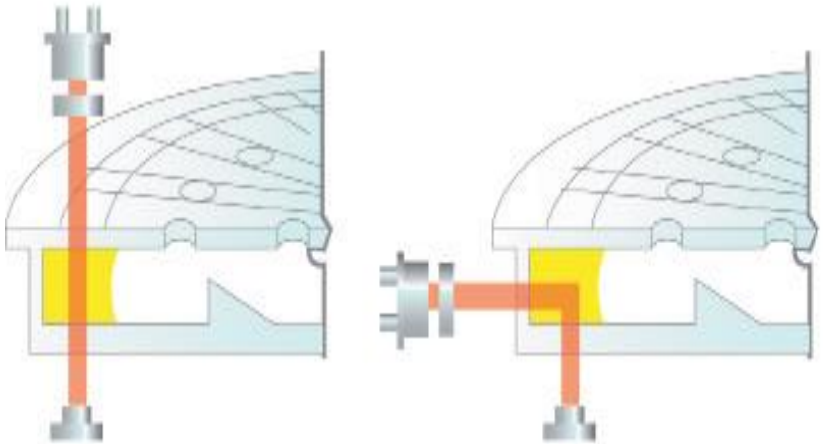
• Otros, en cambio, calculan cuanto tiempo tarda un cambio fijo de Absorbancia, por ej de 30 mA sobre la línea de base o utilizan derivadas matemáticas de la curva. Estos últimos detectan la formación del coagulo al comienzo y por lo tanto suelen dar tiempos cortos.

•Algunos de los coagulómetros con este sistema de detección tienen la posibilidad de realizar la determinación a una longitud de onda de 620 nm para evitar la interferencia con la bilirrubina.

•Los coagulómetros de la firma Siemmens (BCS, Sysmex CA, BFTII), parte de la firma IL (familia ACL TOP,) y de la firma Trinity Bitech (Coag Mate) y algún Amelung utilizan este tipo de detección.


SPECTRA OF CHROMATIC SUBSTANCES
Lipemia
Hemoglobin
Bilirubin
620nm
671 nm
Absorbance
300
350
400
450
500
550
600
650
700
750
Wavelength
http://www.synermedinc.com/revolutio

Detección nefelométrica

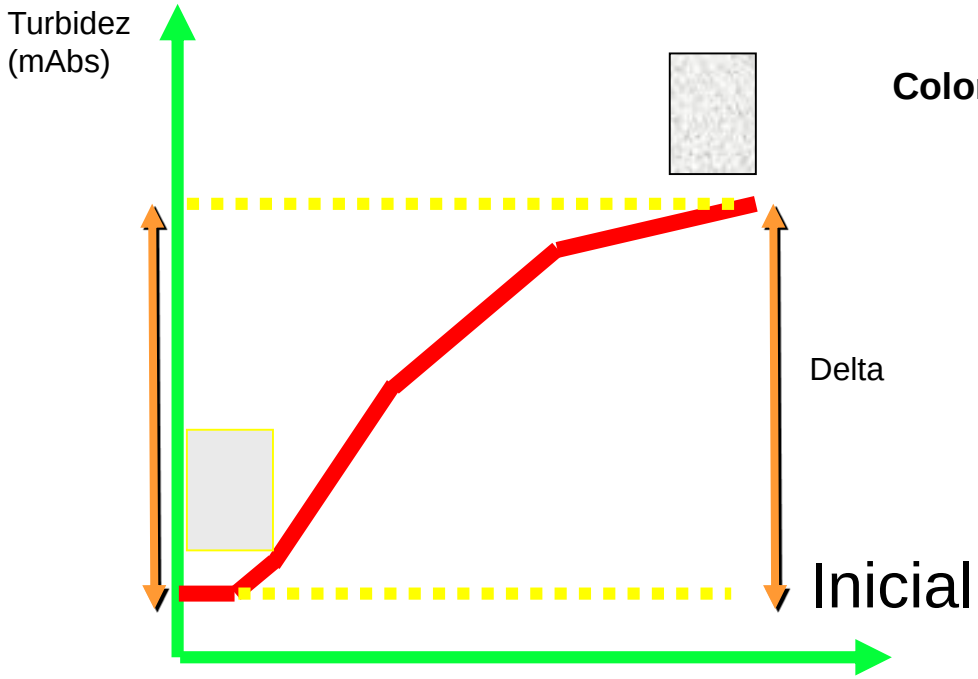


- El haz de luz de abajo pasa directamente a través de la muestra hacia al detector. Cuando se forma la malla de fibrina el haz de luz es desviado y puede ser detectado en un ángulo determinado de la posición original del haz.
- El cronometro se detiene cuando la cantidad de luz transmitida o dispersada llega a un nivel predeterminado.
- La diferencia entre la luz dispersada o transmitida antes y después de la formación del coagulo por lo general es proporcional a la cantidad de fibrina.

- Familia ACL y Elite Pro (IL)

Curva de Reacción Inmunoturbidimétrica

Utilizan filtros a 405 nm ,620 nm ,671nm

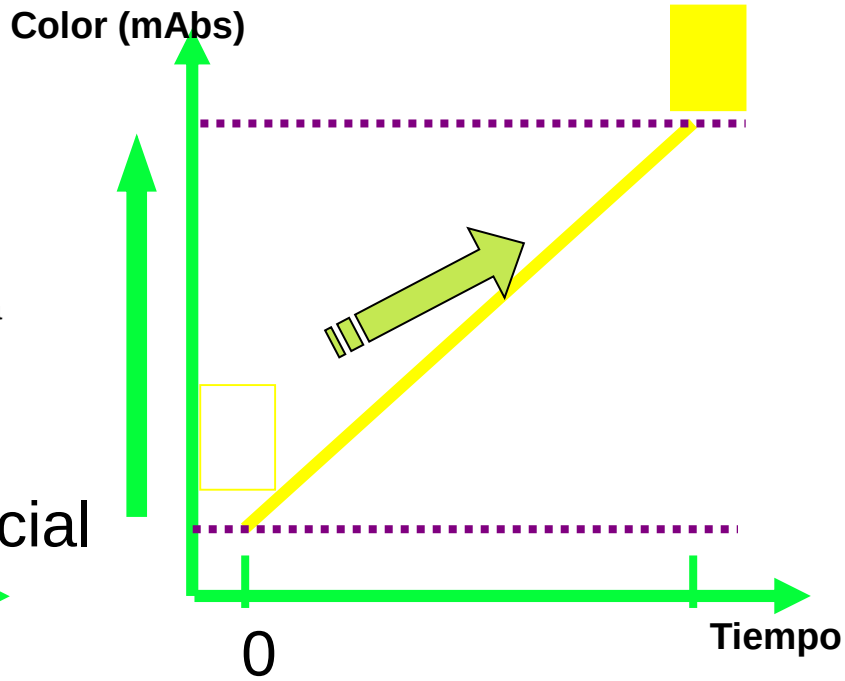


Medida de la turbidez inicial y de la turbidez final producida por la aglutinación de las partículas de latex

Curva de Reacción Cromogénica

Utilizan filtros a 405 nm.

Peptido-pNA $\xrightarrow{\text{ENZIMA}}$ **pNa**



Desarrollo de color despues de anadir el sustrato cromogénico de modo lineal

Detección óptica

$\overset{?}{=}$

DETECCIÓN MECÁNICA

Evaluation of a Fully Automated Centrifugal Analyzer for Performance of Hemostasis Tests

Compara ACL de IL vs Cog A mate

Table 1. Precision of PT, APTT, and Fibrinogen Determinations with Various Combinations of Instruments and Reagents

		CV, %					
		Within assay			Between assay		
Reagent	Instrument	Normal		Abnormal	Normal		Abnormal
PT							
MR	Coag A Mate	1.5		1.0	3.0		3.0
MR	ACL	1.2		0.9	1.9		2.8
RBT-IL	ACL	1.3		0.4	2.0		2.0
APTT		Normal	Hemophilic	Heparinized	Normal	Hemophilic	Heparinized
APTT-GD	Coag A Mate	1.6	0.8	1.8	2.1	4.0	2.3
APTT-GD	ACL	1.0	3.0	1.9	2.8	3.3	6.8
APTT-IL	ACL	1.3	3.5	1.7	2.6	2.4	5.4
Fibrinogen		Normal	Abnormal[a]	Abnormal[b]	Normal	Abnormal[a]	Abnormal[b]
Boehringer	Schnitger	3.2	6.0	3.1	4.3	7.5	8.2
RBT-IL	ACL	5.1	6.9	4.6	6.9	7.5	5.0

[a] Abnormal PT ratio and normal fibrinogen; [b] abnormal PT ratio and low fibrinogen.

CLIN. CHEM. 33/10, 1888-1 890 (1987)

Evaluation of the automated coagulation analyzer Sysmex CA-7000.

Sysmex CA-7000 óptico vs STAR compact

No significant interference could be demonstrated with hemolytic and icteric samples as demonstrated by results similar to those obtained using a mechanical clot detection-based analyzer (STAR).

The results of the different coagulation, chromogenic and immunologic assays obtained with the CA-7000 analyzer were well correlated with those obtained on the STAR analyzer (r in the range from 0.885 to 0.990).

Thromb Res. 2006;117(6):721-9. Epub 2005 Aug 10

Evaluation and performance characteristics of the automated coagulation analyzer ACL TOP.

ACL TOP óptico vs STA Compact detecc ion mecánica . Muestras controles de distintas marcas , plasma congelados normales y anormales (N=30 de cada)

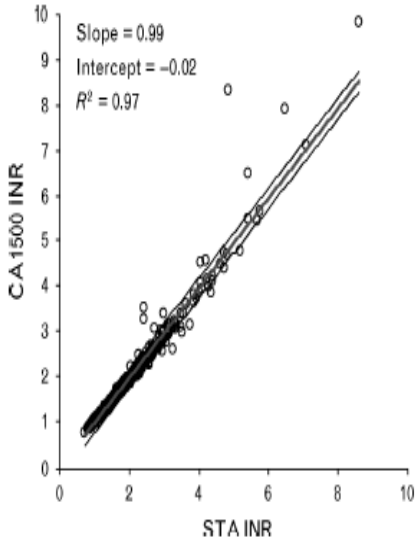
For clotting assays performed at 671 nm, no significant interference could be demonstrated with hemolytic, icteric and lipemic samples as demonstrated by results similar to those obtained using a mechanical clot-detection-based analyzer (STAR).

Thromb Res. 2007;120(5):733-43. Epub 2007

Comparison of optical and mechanical clot detection for routine coagulation testing in a large volume clinical laboratory

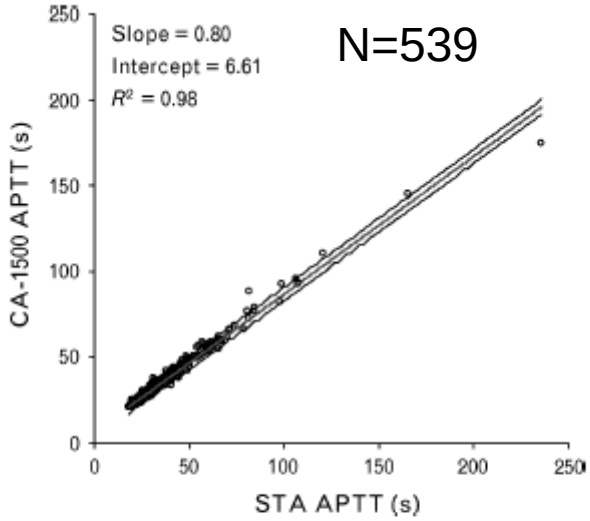
Compara Sysmex CA-1500 (dade Behringvs STA compact N=2057 muestras ptes

Fig. 1

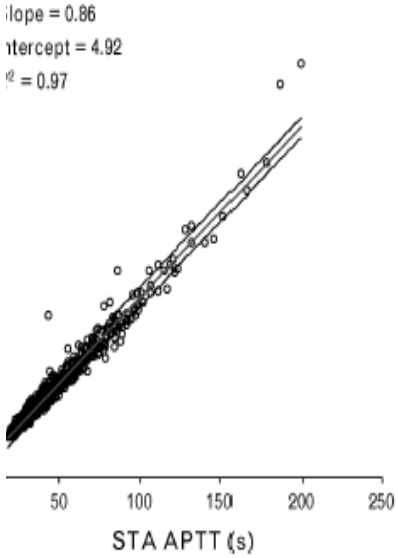


Correlation of international normalized ratio performed on STA and CA-1500 ($n = 2052$). The center line represents the regression line between the STA and CA-1500 assay results, whereas the outer line represent the boundaries of the 95% prediction interval. Although points lying outside the prediction interval can be considered outliers these points were included in the calculations as their effect on the fina results was negligible due to their locations and the large number of patient samples. INR, international normalized ratio.

Fig. 3



Correlation of activated partial thromboplastin time performed on turbid samples ($n = 539$). The center line represents the regression line between the STA and CA-1500 assay results, whereas the outer lines represent the boundaries of the 95% prediction interval. Although points outside the prediction interval can be considered outliers, these points were included in the calculations as their effect on the final results was negligible due to their locations and the large number of patient samples. APTT, activated partial thromboplastin time.



vated partial thromboplastin time performed on STA 2034). The center line represents the regression line and CA-1500 assay results, whereas the outer lines ndaries of the 95% prediction interval. Although prediction interval can be considered outliers, these points were included in the calculations as their effect on the final results was negligible due to their locations and the large number of patient samples. APTT, activated partial thromboplastin time.

Blood Coagulation and Fibrinolysis 2008, Vol 19 No 6

Optical and Mechanical Clot Detection Methodologies: A Comparison Study for Routine Coagulation Testing

MTXII foto óptico vs Amax 200 fotomecánico Trinity Biotech
N=424 muestras de pacientes

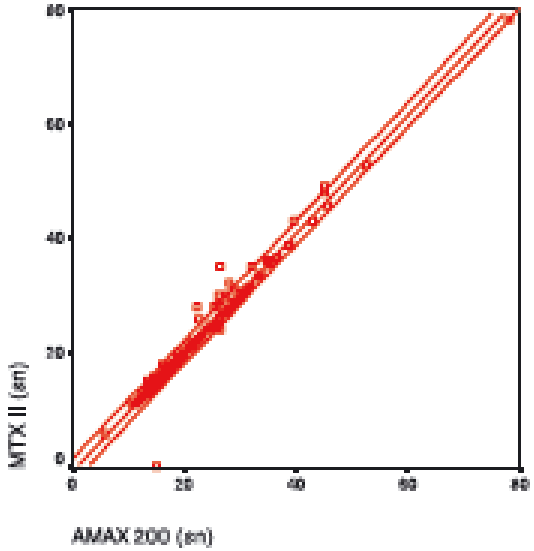


Fig. 1. Correlation of TrinaClot PT HTF performed on MTX II and AMAX 200 ($n = 420$).

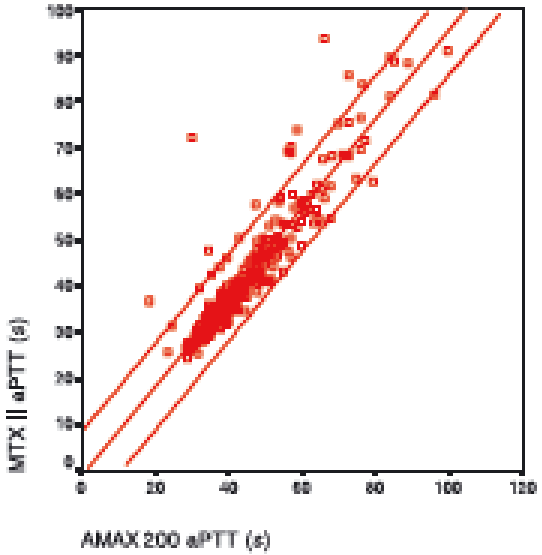


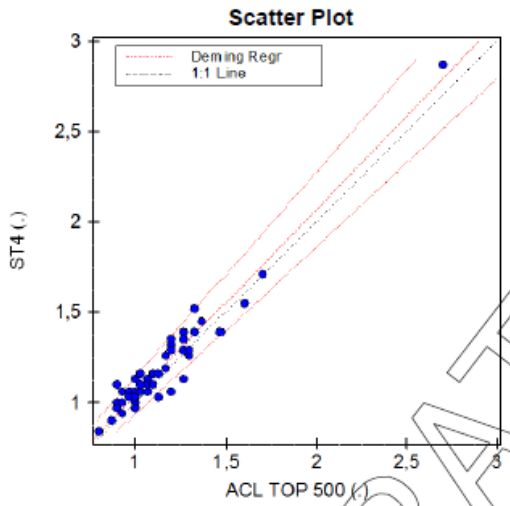
Fig. 2. Correlation of TrinaClot aPTT S performed on MTX II and AMAX 200 ($n = 407$).

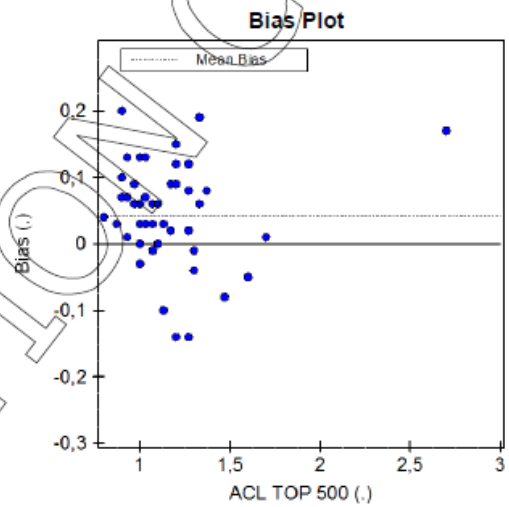
Para muestras lipemicas TP y APTT mantienen la buena correlación R > de 0.98

Journal of Clinical Laboratory Analysis 26: 125–129 (2012)

X Method ACL TOP 500 Y Method ST4

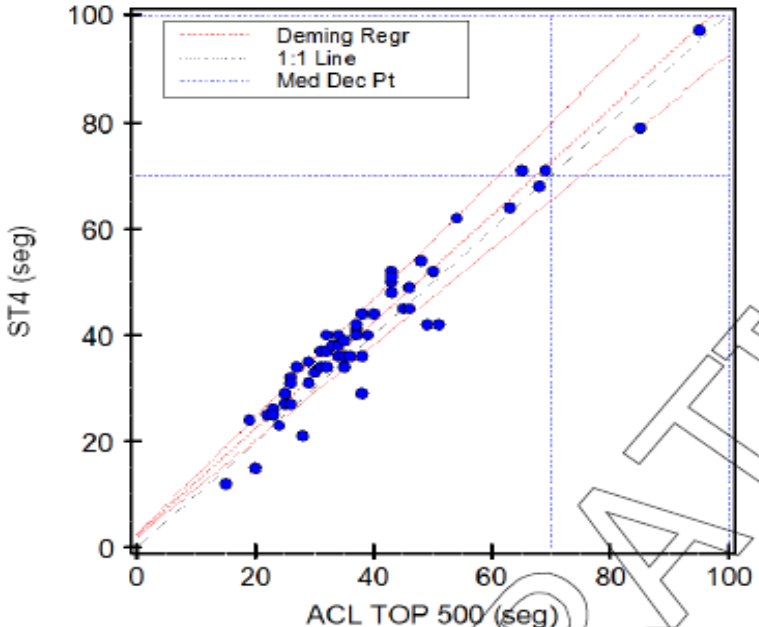
APTT SP N=163 R=0.97



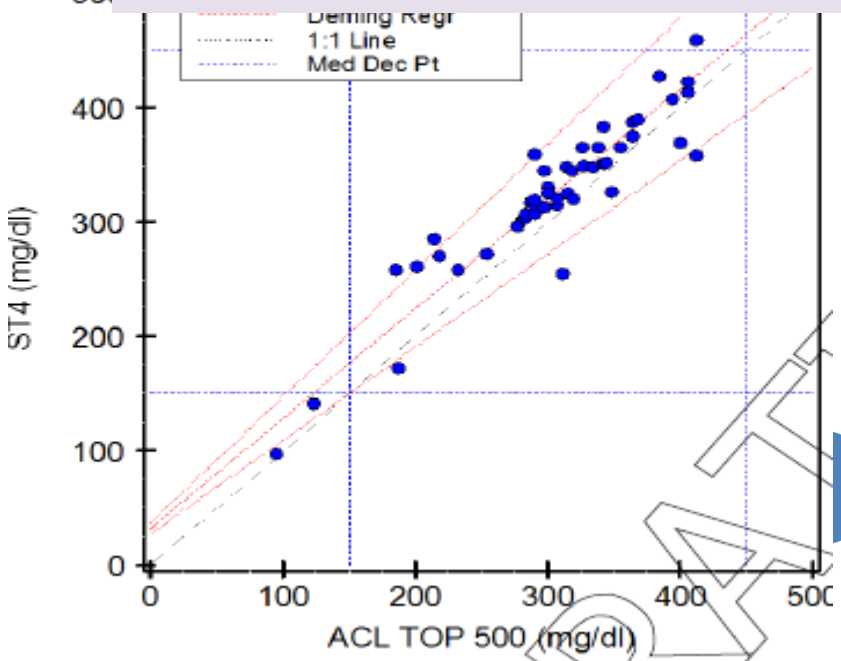


Comparación del ACL TOP(IL) vs ST4 (stago)

TP, N=163, R=0.96



FBG Clauss N= 96, R =0.93



ventajas y desventajas de los distintos sistemas de detección

- ✓ **Numerosos estudios han sugerido que los métodos ópticos y mecánicos son equivalentes en términos de correlación, precisión y reproducibilidad. Otros autores han encontrado que la detección mecánica era superior.**

- ✓ **Los defensores de los métodos ópticos remarcan la utilidad de poder ver la curva de reacción durante todo el proceso de formación de fibrina.**

- ✓ **Trabajos recientes han demostrado que en los coagulómetros de última generación existe una buena correlación entre el método óptico y mecánico aun en presencia de hemólisis y lipemia. Por lo tanto, si existe una diferencia entre un método de detección y el otro es desconocida hasta el momento.**

- ✓ **Es importante aclarar que existen errores en la detección del coagulo con ambos tipos de detección dependiendo de las características intrínsecas de la muestra.**
- ✓ **Si no se detecta el punto final con un método, se debe chequear la muestra con otro método de detección del coagulo o en forma manual.**

¿CÓMO ELEGIR UN COAGULÓMETRO?

- Cantidad de test /hs
- ¿Que tipo de muestras puede procesar?
- ¿Qué volumen de muestra utiliza?
- ¿qué volúmenes muertos utiliza?
- Si es abierto (permite incorporar reactivos de otros marcas o made in house)
- Capaz de procesar varios tipos de ensayos criogénico , inmunológicos y coagulables en una sola corrida
- Códigos de barra
- Sofware de control de calidad
- EL costo del equipo y de los elementos descartables que utiliza, calidad del servicio técnico, tamaño
- ¿El equipo se puede conectar al sistema informático del laboratorio?

¿Cómo evaluar un coagulometro?

- Recommendations for the evaluation of coagulometers
  Gardiner, Kitchen, Dauer, Kottke-Marchant & Adcock. (2006) Lab Hematol. 12(1):32-8

- Protocol for the Evaluation, Validation, and Implementation of Coagulometers.
  Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Approved guideline H57-A

Coagulómetros :Normas de calidad

- **La CLSI H57-A (protocol for the evaluation and implementation of coagulometers, 2008) es un protocolo de verificación/validación para fabricantes y usuarios.**

- **Verificación contra reactivos e instrumentos de referencia, elegidos de acuerdo a lo que se quiera certificar o acreditar. (Solo se valida contra la técnica manual el TP /RIN (WHO 1985).**

- **En general lo que se evalúa es el comportamiento del par sistema de detección/reactivo.**

- **El laboratorio debe fijarse si el fabricante realizo esta validación.**

- **Debe existir un responsable del mantenimiento de los equipos en cuanto a los ciclos de lavados, cambio de filtro, limpieza de óptica de acuerdo a lo aconsejado por el fabricante.**

- **Todos los datos deben constar en un registro con un detalle preciso de la frecuencia con que deben realizarse.**

POC PARA CONTROL DE RIN

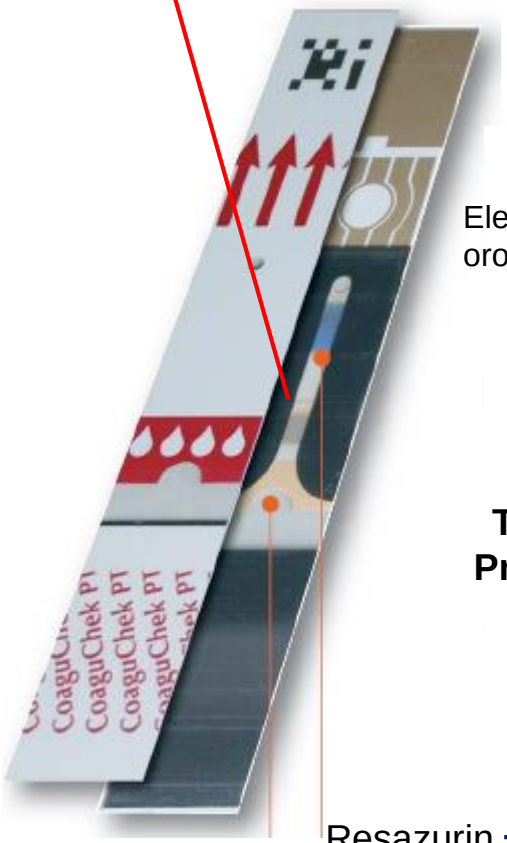
- Son dispositivos totalmente automáticos en el cual el reactivo está contenido en una tira.
- Muestra: sangre entera capilar o de punción venosa no citratada
-

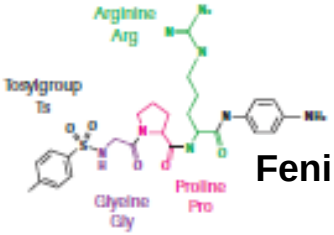
Principios de detección:

- Movimiento de partículas de metal en campo magnético
- Movimiento de sangre en un tubo capilar
- Medida de la impedancia por cambios electroquímicos
- Monitoreo de la trombina generada por un sustrato cromogénico
- Monitoreo de la trombina generada por una detección electroquímica

MEDICIÓN DEL INR EN SANGRE ENTERA
Fundamento del método

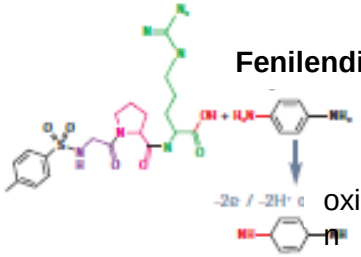
Tromboplastina recombinante humana (ISI: 1)





Fenilendiamina

Trombina



Fenilendiamina

Electrodos de oro

Tiempo de Protrombina

Señal electroquímica (Diferencia de potencial)

Señal electroquímica → Detección de tira dañada.

10 uL de sangre capilar

Resazurin a → Luz, humedad, temperatura. → Resorufina

- **El software convierte la señal observada en RIN mediante una formula establecida por el fabricante para hacer el resultado de test trazable con el método tradicional de la WHO.**
- **Esta calibración se logra midiendo la misma muestra con los POC y un sistema de detección /reactivo predefinido trazable con el método manual de la WHO. La ecuación de conversión se coloca en el software del equipo**

- **Se ha reportado entre un 10 y un 20 % de desacuerdo entre los valores de RIN por el método tradicional y los POC (similar a los CV de los PEE con las diferentes combinaciones reactivo/coagulómetro)**

- **Resultados en POC por encima de RIN > de 5.0 tienen menor exactitud, precisión y linealidad**

- **Hay diversos estudios que demuestran que el TTR mejora con la utilización del POC – TP**

- **No hay evidencia que demuestren menor o mayor eventos clínicos**

- **Recomendación de utilizar controles internos, participación en un control externo y registro en el LIS de los resultados obtenidos**

POCT 14 A ,CLSI 2004

GRACIAS POR SU ATENCIÓN