

VALORES DE REFERENCIA DE PARAMETROS DE HEMOSTASIA EN RECIEN NACIDOS SALUDABLES

MA Molina¹, M Ortega², M Ferreyra³, L Ortega⁴, N Guzmán⁵, V Milanesio⁶, S Ligorria⁷, C Moyano⁸,
L Ahumada⁹. Hospital Misericordia Nuevo Siglo

1. Bioquímica, especialista en Hemostasia, Servicio de Laboratorio
2. Bioquímica, postulante a la Especialidad de Hemostasia, Servicio de Laboratorio
3. Médica Neonatólogo
4. Bioquímica Especialista en Inmunología, Servicio de Laboratorio
5. Bioquímica, Servicio de Laboratorio
6. Técnica de Laboratorio, Servicio de Laboratorio
7. Bioquímica, Jefa del Servicio de Laboratorio
8. Bioquímica Especialista en Hematología, Servicio de Laboratorio, Hospital Misericordia
9. Medico Neonatólogo, Jefe del Servicio de Neonatología

SEDE: Servicio de Laboratorio, Servicio de Neonatología. Hospital Misericordia Nuevo Siglo.

Córdoba. Argentina.

Contacto: Ortega, María del mar. E-mail: mdmortega@hotmail.com Tel: 0351153210872

RESUMEN

INTRODUCCION: Los mecanismos de los sistemas que comprenden la hemostasia son procesos dinámicos que comienzan en el periodo fetal y evolucionan gradualmente a una estructura definitiva en el adulto. Existen importantes diferencias cuantitativas y cualitativas entre recién nacidos (RN) a término, niños y adultos. Conocer cómo son estos cambios en cada etapa del crecimiento permite una adecuada interpretación de las pruebas de coagulación. Para esto, es necesario contar con valores de referencia, adecuados para cada etapa del crecimiento y para el tipo de analizador y reactivo que se utilice. **OBJETIVO:** Establecer valores de referencia (VR) de distintas pruebas de Hemostasia para RN. **MATERIAL Y METODOS:** Se incluyeron una cohorte de 190 Recién nacidos a término (mayores a 36 semanas de gestación) saludables; con un tiempo de vida comprendido entre las 36 hrs hasta 72 hrs de nacidos. La extracción de la muestra se realizó por venopunción. Se determinaron pruebas globales de coagulación, APP%, KPTT, Fibrinógeno (FG), porcentaje de actividad de los factores II, V, VII, VIII, IX, X, XI utilizando reactivos STAGO y analizador STAGO STart (detección de punto final mecánico) y recuento de plaquetas (contador hematológico CELL-DYN RUBY (ABBOTT)). Se siguió el protocolo propuesto por la guía C28-A2 del CLSI. **RESULTADOS:** Los resultados se obtuvieron calculando los percentilos 2,5 th y 97,5 th. APP% (VR=13.2-20.2%) KPTT (VR= 31-52 Segundos) FG (VR= 231-320 mg%) **CONCLUSION:** En el grupo etario estudiado, donde los sistemas hemostáticos se encuentran en desarrollo, es importante que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia de acuerdo al sistema reactivo/analizador utilizado.

Palabras claves: recién nacidos (RN), hemostasia evolutiva, sistema hemostático, valores de referencia, factores de la coagulación, plaquetas.

INTRODUCCION

La Hemostasia es un proceso complejo en donde los sistemas procoagulantes y anticoagulantes están en un perfecto equilibrio para proteger al organismo del sangrado excesivo luego de la injuria de un vaso sanguíneo y al mismo tiempo, evitar la coagulación descontrolada.

En el sitio de lesión de la pared de un vaso sanguíneo, la adhesión, activación y agregación de las plaquetas tiene como fin la formación de un tapón plaquetario (hemostasia primaria). A continuación y como consecuencia de este proceso, se produce la activación de los factores de la coagulación que da como resultado final la formación de una malla de fibrina que estabiliza al tapón plaquetario formado (hemostasia secundaria). Los inhibidores fisiológicos de la coagulación limitan la respuesta procoagulante, y la activación de la fibrinólisis limita a su vez la extensión del coagulo de fibrina para mantener y/o restaurar la permeabilidad del vaso (1).

Estos mecanismos son procesos dinámicos que comienzan en el periodo fetal y evolucionan gradualmente a una estructura definitiva en el adulto. Existen importantes diferencias cuantitativas y cualitativas entre recién nacidos (RN) prematuros, recién nacidos a término, niños y adultos (2,3). En los últimos años se entendió que estos cambios relacionados con la edad son parte de la fisiología normal del desarrollo. A este concepto, se conoce en la actualidad como "Hemostasia Evolutiva"(4).

Conocer cómo son estos cambios en cada etapa del crecimiento permite una adecuada interpretación de las pruebas de coagulación, de lo contrario puede llevar a decisiones incorrectas como: repetir de manera innecesaria las determinaciones, citar nuevamente al paciente, cancelar cirugías, realizar técnicas adicionales, interconsultas con especialistas, etc., resultando en subdiagnósticos o sobrediagnósticos de trastornos de coagulación, con fuerte impacto en el paciente, la familia, el personal de salud y costos en el sistema de salud. Para esto, es necesario contar con valores de referencia (VR) para las pruebas de coagulación, adecuados para cada etapa del crecimiento y para el tipo de analizador y reactivo que se utilice (5). Esto tiene una implicancia crítica en el diagnóstico de enfermedades y monitoreo de terapias anticoagulantes. Muchos estudios han contribuido a caracterizar las diferencias relacionadas con la edad, estableciendo rangos para los distintos parámetros de las proteínas de la coagulación en distintas etapas del crecimiento (2,6,7). Sin embargo, se estima que pocos laboratorios en el mundo utilizan VR adecuados para la edad y su sistema reactivo/analizador. Los principales causas por lo que esto ocurre, se deben generalmente a la dificultad para obtener una muestra adecuada en esta población de pacientes, y obtener un número significativo de datos. Es por esto que, en la actualidad, hay escasa disponibilidad de valores de referencia de hemostasia para neonatos, y en su mayoría se basan sobre pequeñas poblaciones de pacientes (8).

En un comunicado publicado en el año 2012 (8), la Sociedad Internacional de Hemostasia y Trombosis recomienda que:

- Los laboratorios que procesan muestras pediátricas, deberían utilizar valores de referencia adecuados para la edad y para el sistema reactivo/analizador.
- En caso de no poder obtenerlos, deberán utilizarse, aquellos que fueron determinados bajo las mismas condiciones antes mencionadas por otro laboratorio.
- Los laboratorios que no pudieran disponer de valores de referencia adecuados para la edad y su sistema de trabajo, deberán considerar la posibilidad de derivar las muestras pediátricas a centros que sí dispongan de éstos.

En Argentina no contamos con trabajos locales que establezcan valores de referencia válidos para nuestra población de pacientes y sistema de trabajo. Considerando la amplia oferta de reactivos y analizadores disponibles en el mercado, creemos que es de suma importancia establecer nuestros propios valores para distintos parámetros de coagulación en una población de recién nacidos sanos, y de esta manera, brindar al personal médico las herramientas necesarias para un correcto diagnóstico de patologías vinculadas a la hemostasia.

OBJETIVO:

Determinar valores de referencia de distintas pruebas de Hemostasia para RN a término saludables, desde 36 hs hasta las 72 hs de vida, en el Servicio de Neonatología del Hospital Misericordia Nuevo Siglo, de la Provincia de Córdoba.

MATERIAL Y METODOS:

Se incluyeron una cohorte de 190 recién nacidos internados en la sala de internación conjunta Madre-Hijo del Hospital Misericordia Nuevo Siglo; estos pacientes fueron saludables, con una edad gestacional a término, alimentados desde el nacimiento, con un peso mayor a 2500gr, y un APGAR a los 5 min mayor a 7. Todos contaban con una dosis profiláctica de vitamina K (VK) intramuscular correspondiente al nacer. Además, se les solicitó a los padres un consentimiento informado firmado. Se excluyeron aquellos que hayan requerido internación en las primeras 48 hs. de vida, menores de 36 semanas de gestación, con sospecha de trastornos de la coagulación o antecedentes familiares de estos trastornos; también aquellos nacidos de madres con antecedentes de: preclampsia, diabetes gestacional, antecedentes de partos prematuros, antecedentes de feto muerto, trombofilia diagnosticada, púrpura trombocitopénica idiopática, trastornos hemorrágicos, obesidad, hipertensión (valores iguales o mayores a 140/90 mm Hg), desnutrición.

Las muestras se obtuvieron por venopunción. Para las determinaciones de hemostasia, se utilizó como anticoagulante citrato de sodio 3,2% en una dilución 1/10) llegando a un volumen final de 1 ml. Se realizó una doble centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos, y el plasma fue freezeado a -70°C ó -30°C, dependiendo de la disponibilidad, hasta su procesamiento cada 7 días. Se realizaron ensayos de tiempo de protrombina (TP) en segundos (Seg.), APP (%), KPTT (Seg), fibrinógeno (FG)% y porcentaje de actividad de factores (F), II, V, VII, VIII, IX, X, XI a cada una de las muestras. Se utilizó un coagulómetro semiautomatizado STA-art (Diagnostica Stago S.A.S, Asnières Sur Seine, Francia) que consta de un método de detección mecánico. Los reactivos utilizados fueron: STA-Neoplastin, STA- aPTT, STA-Fibrinogen, y STA-factor (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, Francia para Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania), y buffer de Owren, calcio 0,025M de preparación casera. Para las curvas de calibración, se utilizó un calibrador comercial STA-Unicall. Además para todas las determinaciones se procesó un control interno de pool casero y evaluado por cartas de control.

Para el recuento de plaquetas se tomó la muestra utilizando como anticoagulante EDTA-K y Na, dilución final 1/50 obteniendo un volumen final de 0,5 ml. El procesamiento fue siempre dentro de las 2 horas posteriores a la extracción. El recuento se realizó en contador hematológico automatizado (CELL-DYN RUBY (ABBOTT)) y se observó el frotis de sangre periférica al microscopio óptico contándose las plaquetas por método de Fonio.

Análisis estadístico: Se determinaron medidas de tendencia central (media y mediana) y medidas de dispersión (desviación estándar). Se utilizó el protocolo C28-A2 del *CLSI* para establecer/verificar valores de referencia (9). Las bases de datos se realizaron con la ayuda del programa Excel versión 2010. El *software* con el cual se realizó el análisis estadístico fue el programa MedCalc versión 10 (versión demo) año 2009. Se empleó la prueba de Dixon-Reed para chequear *outliers*. Para establecer el intervalo de referencia se utilizó el método no paramétrico, determinando el límite inferior y superior del intervalo con los percentilos 2,5 th y 97,5 th respectivamente.

RESULTADOS

En la Tabla I se muestran los datos demográficos de esta población. En la Tabla II se muestran los valores medios con su respectiva desviación estándar para APP%, KPTT (Seg), FG%, F (II, V, VII, VIII, IX, X, XI) y recuento de plaquetas.

TABLA I. Datos demográficos de la muestra estudiada

Cantidad de pacientes (n)	N=190
Sexo(M/F)	104/86
Peso (grs)	3400 (445) [#]
Semanas de gestación (semanas)	38 (1) [#]
Tiempo de vida (hs)	49 (10) [#]

Media (DS)

TABLA II

Parámetros	N	Media	Mediana
TP(seg)	190	15,7	15,4
APP%	190	71	72
KPTT(seg)	190	41	41
FG%	176	281	283
FII%	184	46	44
FV%	190	65	66
FVII%	190	59	55
FX%	190	39	40
FVIII%	190	79	74
FIX%	190	62	61
FXI%	190	54	50
Recuento de plaquetas	153	251	252

TABLA II: los N para algunos parámetros como FG(N=176), Factor II (N=184) y plaquetas (N=153) son menores a 190 por escasa muestra o falta de reactivo.

En la tabla III, se muestra los intervalos de referencias propuestos para RN saludables entre las 36-72 hs. de vida según establecido con los percentilos 2,5 th y 97,5 th.

TABLA III

Parámetro	Percentilo 2,5 th	Percentilo 97,5 th
TP(seg)	13,2	20,2
APP%	44	97
KPTT (seg)	31	52
FG%	231	320
FII%	20	77
FV%	25	104
FVII%	28	101
FX%	14	64
FVIII%	33	174
FIX%	28	106
FXI%	26	92
Recuento de plaquetas	154	361

DISCUSION

La coagulación en el RN es un proceso dinámico y en desarrollo que depende de la edad gestacional y postnatal. Requiere de la interacción del endotelio vascular, las plaquetas y los factores de coagulación, así, alteraciones a éstos tres niveles pueden desencadenar en trastornos tromboticos o hemorrágicos desde el período neonatal. Éstos pueden ser congénitos o, más frecuentemente, adquiridos, afectando tanto a la hemostasia primaria como a la hemostasia secundaria, a los sistemas fibrinolíticos o a los inhibidores de la coagulación (10,11). En la anamnesis de estos RN se incluye, la historia familiar de antecedentes hemorrágicos, enfermedades maternas y administración de fármacos que interfieran con la coagulación y tener constancia que la profilaxis con VK se ha realizado correctamente (11). Para este grupo de pacientes es obligado realizar un estudio de coagulación. Los niveles fisiológicamente bajos de los parámetros de coagulación deben evaluarse, siendo necesarios valores de referencia según edad gestacional y posnatal, adecuados para el sistema reactivo/analizador que se utilice (8,12).

En base a los resultados obtenidos, podemos observar que los valores medios de los porcentajes de actividad para los factores vitamina K dependiente y el FV de la vía extrínseca (FII (46%), FV (65%), FVII (59%), FX (39%)), rondan entre un 35- 60%, menor que en los valores promedios observados rutinariamente en los adultos sanos. En los neonatos esta actividad, se encuentran antigénicamente

y funcionalmente disminuidos debido a la edad gestacional (7) y con ello a la inmadurez hepática, (que repercute en la síntesis de factores y en el proceso de gama-carboxilación de aquellos vitamina K dependientes); a la flora intestinal inmadura (con una escasa microbiota capaz de sintetizar VK); escaso traspaso placentario de esta última, y por ende, insuficientes reservas de este cofactor en el neonato (11). Esta disminución fisiológica, aumenta paulatinamente hasta alcanzar valores similares al de los adultos luego de los 6 meses de vida (6,13). El TP y el APP% son pruebas globales de coagulación útiles como pruebas de pesquisa para evaluar esta vía. Los valores medios obtenidos en esta población se encuentran levemente prolongado en el caso de TP en segundos, con una media de (15,7 seg.) y un porcentaje levemente disminuido de APP% con una media de (71%) tal como se espera, al observar actividades disminuidas de los factores de la vía extrínseca. Resultados de estudios previos realizados para una población con características demográficas similares, y analizados con el mismo sistema reactivo/analizador; por los autores *Reverdiau- Moalic et al 1996* con una población (n= 60) (14) y por *Mitsakios et al 2008* un (n= 98) (15), exponen medias y límites comparables para dichos parámetros. La prueba del KPTT es una prueba que evalúa la vía intrínseca globalmente. De acuerdo a los resultados obtenidos, se observan tiempos (Segundos) levemente prolongados con una media de 41 seg. En los recién nacidos esta vía también se ve afectada por síntesis hepática disminuida de los factores, y de los quinínógenos de alto peso molecular y precalicreínas (2,5,6,13,12). Se evidencia además que el porcentaje de actividad obtenido para el factor IX (vitamina K dependiente) y del factor XI, muestran actividades con una media de 62% y 54% respectivamente, a diferencia de la literatura consultada, que muestra medias menores de entre 30% y el 50%. En cuanto al factor VIII, que mostro una media del 79%, se puede observar, tal como explican varios autores, una actividad sesgada hacia altas concentraciones, dado que el factor de Von Willebrand se ve incrementado los primeros días de vida y luego se estabiliza pasado los 3 meses del nacimiento (6,13,12). Para el fibrinógeno, una glicoproteína de síntesis hepática cuya concentración oscila entre 150 a 400 mg/dl en adultos, determinamos concentraciones similares a los valores de los adultos, con un límite inferior ligeramente aumentado y una media de 281 mg/dL. Resultados obtenidos por *Monagle, P. et al (12)*, muestra una media de 280 mg/dL en su trabajo publicado en el año 2006. Las diferencias en las desviaciones estándar y en algunas medias que encontramos con estos grupos de investigación consultados, podría deberse a la diferencia en la toma de muestra, ellos la obtienen de sangre de cordón umbilical, mientras que nosotros por punción venosa. Consideramos que esta última forma de extracción es más accesible al personal del laboratorio, menos dolorosa para el paciente, y se evita la contaminación con sangre materna. Por otra parte autores como *Andrew et al* en los años 1987(2), 1992 y *Attard et al* en el año 2013 (4) muestran la maduración del sistema hemostático determinando los valores antigénicos de los factores en recién nacidos de 30-36 semanas de gestación hasta los 6 meses de vida a diferencia de nuestro trabajo donde determinamos actividad porcentual. Consideramos de utilidad optar por evaluar la actividad porcentual de los factores ya que representa el nivel hemostático del mismo y no se limita solo a su síntesis. Esto es útil para el seguimiento de terapias anticoagulantes, terapias con hipotermia, traumas, sepsis, u otros déficit adquiridos donde la función de los factores de coagulación se ve alterada. Las plaquetas se sintetizan desde la semana 15 de gestación, llegando a valores del adulto en la semana 22 aproximadamente. En cuanto a su estructura, las glicoproteínas de superficie, están expresadas tanto en el prematuro como en el recién nacido (RN) a término, pero presentan una respuesta disminuida a algunos agonistas plaquetarios. Sus precursores Megacariocíticos en el RN son pequeños, citoplasmáticamente maduros y más sensibles a trombopoyetina (16). Se obtuvieron resultados de recuentos plaquetarios comparables con los trabajos publicados en los años 2015 y 2008 por los autores *Henry, E. et al (17)* y *Wiedmeier et al (18)*, este último realizado en una población de 34146 neonatos hasta los 3 días de vida, si bien el contador hematológico no es el mismo que el utilizado por el presente protocolo, ambos autores ratifican que el recuento de plaquetas en recién nacidos, es similar al de los adultos.

CONCLUSION

En este trabajo se expone la importancia de que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia para los parámetros de coagulación en recién nacidos saludables, ya que estos no pueden ser extrapolables a los de los adultos debido a las diferencias fisiológicas y cambios que ocurren a lo largo de la maduración de los sistemas hemostáticos. Además, debe ser tenido en cuenta el sistema reactivo/analizador que se utiliza debido a la gran variedad de composiciones de reactivos en el mercado y de los variados sistemas de detección de los analizadores. Considerando la dificultad que se presenta en algunos laboratorios para crear valores de referencia propios para grupos vulnerables como son los recién nacidos, se debe considerar la posibilidad de derivar las muestras pediátricas a laboratorios que sí dispongan de estos u optar por valores de referencia ya establecidos por otros laboratorios que utilicen el mismo sistema. Esta es la manera, con la que se debe interpretar correctamente los resultados en neonatología y/o en pediatría y evitar diagnósticos erróneos y terapéuticas inadecuadas que ponen en riesgo la vida de los pacientes e impactan en los costos de la salud.

REFERENCIAS

1. AK Chan, N Paredes. The coagulation system in humans. *Methods Mol Biol.* 2013; 992:3-12.
2. M Andrew, B Paes, R Milner, M Johnston, L Mitchell, DM Tollefsen and P Powers. Development of the human coagulation system in the full-term. *Blood.* 1987; 70 (1): 165-172.
3. S Revel-Vilk. The conundrum of neonatal coagulopathy. *Hematology Am SocHematolEduc Program.* 2012; 450-454.
4. C Attard, T Van Der Straaten, V Karlaftis, P Monagle and V Ignjatovic. Developmental hemostasis: age-specific differences in the levels of hemostatic proteins. *J Thrombosis and Haemostasis* 2013, 11:1850–1854.
5. Monagle P, Ignjatovic V, Savoia H. Haemostasis in neonates and childrens: Pitfalls and Dilemmas. *Blood Rev* 2010; 24: 63–8.
6. M Andrew, P Vegh, M Johnston, J Bowker, F Ofori and L Mitchell. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992; 80 (8):1998-2000.
7. G Lippi, GL Salvagno, S Rugolotto, GP Chiuffoni. EM Padovani, M franchini, GC Guidi. Routine coagulation test in newborn and young infants. *J Thromb Thrombolysis* 2007; 24:153-155
8. V Ignjatovic, G Kenet and P Monagle. Developmental hemostasis: recommendations for laboratories reporting pediatric samples. *J Thromb Haemost* 2012; 10 (2):298-300.
9. NCCLS. How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Second Edition. NCCLS document C28-A2 [ISBN 1-56238-406-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA 2000
10. B Gibson. Neonatal Haemostasis. Royal Hospital for Sick Children, Glasgow 1989
11. J M Guzmán Cabañas, E Gomez Guzmán, M D Martínez Jiménez, M D Ruiz González, M J Párraga Quiles. Trastornos de la coagulación en el recién nacido. 2008, de Asociación Española de Pediatría. Sitio web: www.aeped.es/protocolos/ última visita: 9 de marzo 2016
12. Monagle P, Barnes C, Ignjatovic V, Furmedge J, Newall F, Chan A, et al. developmental haemostasis. Impact for clinical haemostasis laboratories. *Thromb haemost* 2006; 95 (2): 362-72.
13. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, et al. development of the human coagulation system in the healthy premature infant. *Blood* 1988; 72 (5): 1651-7.
14. P. Reverdiau-Moalic, B. Delahousse, G. Body, P. Bardos, J. Leroy, and Y. Gruel: Evolution of Blood Coagulation Activators and Inhibitors in the Healthy Human Fetus. *Blood*, VOI 88, NO 3 (August I), 1996; 900-906
15. G Mitsiakos, G Papaioannou, E Papadakis, E Chatziioannidis, E Giougi, P Karagianni, J Evdoridou, P Malindretos, M Athanasioud, F Athanassiadou, N Nikolaidis: Haemostatic profile of full-term, healthy, small for gestational age neonates. *Thrombosis Research* 124 2009; 288–291
16. M Sola-Visner. Platelets in the neonatal period: developmental differences in platelet production, function, and hemostasis and the potential impact of therapies. *Hematology Am SocHematolEduc* 2012; 506-11
17. E Henry, R D Christensen, Reference Intervals in Neonatal Hematology. [Clin Perinatol.](http://www.clinperinatol.com) 2015; 42 (3):483-97.
18. SE Wiedmeier, E Henry, MC Sola-Visner and RD Christensen: Platelet reference ranges for neonates, defined using data from over 47 000 patients in a multihospital healthcare system. *Journal of Perinatology* 2009; 29 130–136.