

11218



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES  
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

S  
2ej-

## *TIEMPOS DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADA, PROTROMBINA Y TROMBINA CON CORRECCIONES Y DILUCIONES EN EL DIAGNOSTICO DE COAGULOPATIAS*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **TESIS DE POSTGRADO**

PARA OBTENER EL TITULO DE:  
ESPECIALISTA EN HEMATOLOGIA  
**P R E S E N T A :**  
DR. AMADO JOSE KARDUSS URUETA

ASESOR: DR. JAVIER PIZZUTO CHAVEZ

1992



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## INTRODUCCIÓN

Para el diagnóstico preciso de las diferentes coagulopatías hereditarias o adquiridas, se han descrito numerosas pruebas de laboratorio. A través del tiempo estas se han ido modificando y perfeccionando para hacerlas más sensibles, específicas y reproducibles de modo que en la actualidad contamos con una batería adecuada de exámenes para el abordaje de estos enfermos. En ese trabajo se informan los resultados obtenidos con una modificación técnica de tres pruebas tradicionales: El tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa), el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de trombina (TT) a las que se le adicionó correcciones con plasma normal (PN) y diluciones con solución salina (SS). La adición de plasma con el fin de corregir el defecto en caso de deficiencia de factores y las diluciones para hacer este más aparente al diluir con la SS el factor de por sí ya deficiente. Por el contrario, si la prolongación es producida por un inhibidor, no corregirá con PN y con la SS disminuirá o desaparecerá debido al efecto dilucional sobre este de la SS.

Para facilitar el entendimiento del funcionamiento de estas pruebas y el de su modificación, se revisarán los conceptos básicos de la hemostasia normal.

## HEMOSTASIA PRIMARIA

El sistema hemostático está compuesto por interacciones muy precisas entre el endotelio de la pared vascular, las plaquetas y algunas proteínas plasmáticas específicas (1). Su función es la de evitar pérdidas sanguíneas después de traumas o heridas leves y ayudar a que estas sean menores en caso de lesiones a arterias o venas mayores.

En el momento en que hay lesión o daño al endotelio, queda expuesta la matriz subendotelial en donde hay, entre otros compuestos, fibras de colagéna. Estas tienen la capacidad de unirse a un receptor plaquetario, el complejo glicoprotéico Ia-IIa (1, 2) y también al factor de von Willebrand, una proteína plasmática cuya función es la de unir estas fibras con otro receptor plaquetario específico, la glicoproteína Ib-IX (2). Mediante estos dos mecanismos ocurre un revestimiento plaquetario del endotelio denudado. Este fenómeno se denomina adhesión (1, 2).

Casi simultáneamente hay activación de la plaqueta debido a la unión a receptores localizando en su membrana de agonistas como trombina, colagéno, epinefrina, tromboxano A2 y ADP. Estas sustancias producen, a través de una proteína G, la activación de las enzimas fosfolipasa C y A2, las cuales hidrolizan fosfolípidos de membrana y estos actúan como segun-

dos mensajeros, provocando aumento del calcio citoplasmático y la fosforilación de proteínas intracelulares críticas. Lo anterior produce como efecto final el cambio de forma de la plaqueta de esférica a ameboidea y la secreción al exterior del contenido de los gránulos alfa y densos (1, 3). El cambio conformacional expone sitios activos en el complejo glicoprotéico de membrana IIB-IIIA, lo que permite que el fibrinógeno se una a este y se produzcan enlaces entre plaqueta y plaqueta. Este fenómeno se conoce como agregación (1, 2, 3).

Al completarse la adhesión, activación, secreción y agregación, se forma en segundos un tapón plaquetario, que es el responsable de la fase inicial o primaria de la respuesta hemostática (1, 2).

Simultáneamente con la formación del tapón plaquetario, se da inicio a la segunda fase de la coagulación o plasmática. Mediante una serie de reacciones sucesivas en las que hay activación proteolítica autolimitada de precursores proteicos del plasma, mejor conocidos como factores de la coagulación, se produce trombina. Una proteasa que convierte una fracción del fibrinógeno plasmático en fibrina (1, 4). La mayoría de estas reacciones necesitan calcio y una superficie que las soporte, que pueden ser las plaquetas o el endotelio (1).

Con fines didácticos se ha dividido a esta fase en distintas etapas. La primera o de contacto, comienza con la formación de un complejo sobre la colágena subendotelial de tres proteínas. El factor XII, el quininógeno de alto peso molecular y la precalicreína. Esta unión por mecanismos todavía insuficientemente aclarados produce una conversión lenta del factor XII a una proteasa, el XII activado. El que a su vez transforma a la precalicreína en calicreína y al factor XI en su forma activa, XIa. La calicreína es capaz de accelear la activación del XII; y el XIa queda disponible para continuar la secuencia de reacciones (1).

La etapa dos provee una segunda forma de activar la coagulación. Es conocida como extrínseca o dependiente de factor tisular. En esta, la lesión endotelial pone al descubierto una lipoproteína que es ubicua en las membranas celulares, el factor tisular, el que en compañía del calcio convierte al factor VII en una enzima activa, el VIIa (1, 4).

El factor XIa generado en la etapa I, actúa proteolíticamente sobre el factor IX activándolo es decir, confiriéndole capacidad enzimática (1, 4). En este punto comienza la tercera etapa en la que el factor X es activado por el IXa en una reacción que para ser eficiente y rápida necesita calcio, una superficie de fosfolípidos y otro factor de la coagu-

lación, el VIII en su forma activa. Además el X puede ser convertido en una proteasa por acción directa del VIIa factor que también es capaz de activar el IX (1, 4).

La etapa cuatro es la final y en ella un complejo llamado protrombinasa, compuesto por los factores Xa. Va. calcio y fosfolípidos plaquetarios, produce un rompimiento peptídico en la molécula de protrombina convirtiéndola en trombina, la que transforma al fibrinógeno en monómero de fibrina, activa a los factores V, VIII, XII y además, es un agonista plaquetario (1, 4).

El monómero de fibrina se polimeriza espontáneamente en un gel insoluble que es estabilizado por uniones, covalentes entre los monómeros individuales por acción del factor XIIIa (4).

#### FIBRINOLISIS

Después que el tapón hemostático definitivo está formado y que la reparación vascular esta en proceso, se inicia la lisis del coágulo de fibrina, mediada por la enzima plasmina. Esta enzima es derivada de la proteólisis del plasminógeno que está unido al coágulo, mediada principalmente por el activador tisular del plasminógeno y en menor proporción por la uroquinasa y una fracción del factor XII (1, 5). La plasmina

degrada al polímero de fibrina en pequeños fragmentos, los productos de degradación de la fibrina, que son posteriormente depurados del organismo por el sistema monocito-macrófago (5). De esta forma queda restaurada la permeabilidad del vaso.

#### ANTICOAGULANTES NATURALES

El mecanismo plasmático de la coagulación necesita ser autolimitado para prevenir la formación de trombos en sitios distintos al de la lesión. Por ello existen anticoagulantes naturales; los principales son, la antitrombina III y la proteína C y su cofactor la proteína S (1, 4). La primera actúa formando complejos bloqueadores irreversibles con los factores IIa, Xa, IXa, XIa, y XIIa; esta acción es aumentada miles de veces por la heparina o heparinoides que se encuentran en el endotelio (4, 6). Mientras que la proteína C, previa activación por la trombina después de que ésta se une a una proteína endotelial llamada trombomodulina, ejerce su función inactivando proteolíticamente a los factores Va y VIIa. Pero para actuar eficientemente este inhibidor necesita de un cofactor conocido como la proteína S. La proteína C además estimula la liberación del activador tisular del plasminógeno del endotelio (1, 4, 6). La acción sobre la coagulación de estas tres sustancias se ha corroborado por la presencia de trombosis en personas con alteraciones cuantitativas o cualitativas de ellas (7, 8).

Un esquema completo de la hemostasia secundaria se puede apreciar en la figura 1.

## PRUEBAS DE COAGULACION

Generalmente todos los mecanismos antes anotados funcionan perfectamente y protegen al organismo de perdidas sanguíneas traumáticas. Sin embargo, existen patologías congénitas y adquiridas que impiden la adecuada formación del coágulo de fibrina y colocan al portador de ellas en riesgo de tener sangrados excesivos y potencialmente mortales después de traumas o procedimientos quirúrgicos, aunque estos sean pequeños (9).

La mayoría de estas patologías afectan a la fase plasmática de la coagulación (1) y el reto del clínico es poder identificar a estos individuos en riesgo, para así tomar las medidas preventivas adecuadas. En otras ocasiones sin embargo, la tarea que enfrenta el médico es la de corroborar o descartar la existencia de una diátesis hemorrágica cuando hay una historia dudosa de sangrado anormal. Para llevar a cabo lo anterior, además de un interrogatorio minucioso y de un examen físico detallado, se necesitan pruebas de laboratorio de primera línea que sean fáciles de realizar, reproducibles, sensibles, específicas y de bajo costo. Que sirvan para descartar la existencia de una patología si son normales

u orientar la selección de estudios de segunda línea más específicos y especializados en caso de anormalidad (6, 10, 11).

En lo que respecta a la fase plasmática de la coagulación se han utilizado a través del tiempo varias pruebas. Entre ellas el tiempo de coagulación de la sangre total, prueba que mide el tiempo necesario en generarse trombina suficiente para formar una matriz de fibrina una vez la sangre ha hecho contacto con el vidrio de un tubo sin anticoagulante. Sin embargo, esta prueba resultó ser poco sensible a deficiencias moderadas de factores. Posteriormente se introdujo la recalcificación del plasma rico en plaquetas; en esta técnica se mide el tiempo de formación de un coágulo al adicionar calcio a un plasma anticoagulado. No obstante, la cantidad de plaquetas en el plasma estudiado y el tiempo de contacto con el vidrio son variables que influyen sobre el resultado final y hacen poco reproducible la técnica. Para evitar esto, se depletó el plasma estudiado de plaquetas y estas se reemplazaron con un fosfolípido externo y además se adicionó un activador para los factores de contacto, con lo que también se controlaba la variable del tiempo de exposición al vidrio. Esta prueba es el TTPa y ha demostrado ser de gran utilidad en el diagnóstico de las coagulopatías (12, 13).

Sin embargo el TTPa no evalúa el factor VII mientras que otra prueba, el TP, diseñado con base en el principio

teórico de que al adicionar una tromboplastina potente, como el factor tisular y calcio al plasma, se generaría trombina y por lo tanto se produciría un coágulo. Demostró con su utilización clínica ser muy sensible a la deficiencia de este factor (6, 11, 20).

No obstante, ni el TTPa ni el TP son sensibles a defectos leves o moderados del fibrinógeno. Por lo que, para una evaluación inicial de un defecto plasmático de la coagulación, se debe utilizar una tercera prueba que sí detecte las anomalías de esta molécula; esta prueba es el TT (21).

A continuación se describirán en detalle estas tres pruebas, que son las más empleadas en el estudio inicial de una probable coagulopatía.

#### Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (TTPa)

El TTPa es una prueba que evolucionó a partir de la recalcificación del plasma rico en plaquetas y del tiempo de tromboplastina parcial sin activador (12, 13). En esta, al plasma pobre en plaquetas anticoagulado con citrato, se le añade una emulsión fosfolípídica para soportar aquellas reacciones de la coagulación que necesitan de una superficie y además se agrega un activador para los factores de contacto que puede ser celite, caolín ó A.elálgico. Posteriormente el

plasma se recalifica y se mide el tiempo necesario para formar el coágulo, que es usualmente entre 30 y 40 segundos. El TTPa es sensible solo a deficiencias de los factores XII, XI, IX, VIII de la vía intrínseca y V, X y protrombina de la vía común. También se prolonga con valores de fibrinógeno menores a 50 mg/dl y en presencia de heparina o de inhibidores de la coagulación ya sean estos específicos o inespecíficos, como el anticoagulante lúpico (6, 11, 12, 13).

Sin embargo la sensibilidad a deficiencias de factores varía dependiendo del tipo de fosfolípido y de activador utilizando (14) y coagulopatías menores con actividad del factor entre 25 y 50% pueden pasar desapercibidas independientemente del tipo de reactivo empleado (6, 10, 11, 15, 16). Además, una serie de variables prelaboratorio como punción traumática, edad de la muestra, relación sangre-anticoagulante, contaminación de catéteres con heparina (17, 18); otras dependientes de la velocidad de oscilación del electrodo del fibrómetro (18) y la imposibilidad para diferenciar si una prolongación es debida a deficiencia de factores o a un anticoagulante, le restan especificidad a la prueba (17, 18, 19).

#### Tiempo de Protrombina (TP)

El TP se realiza anticoagulando con citrato el plasma pobre en plaquetas y posteriormente agregando a este calcio

y una fuente de factor hístico, generalmente extracto de cerebro desecado de humano o conejo; luego se mide el tiempo requerido para formar el coágulo de fibrina. Un tiempo normal de protrombina requiere entre 12 y 16 segundos (6, 11, 20). Esta prueba se prolonga cuando hay deficiencias de los factores V, VII, X o de protrombina o cuando la concentración de fibrinógeno es menor a 50 mgs/dl, también en presencia de heparina o de productos de degradación de la fibrina (6, 10, 20).

Al igual que el TTPa, la sensibilidad para detectar coagulopatías menores no es la óptima y deficiencias leves de protrombina, con nivel de factor mayor al 30% frecuentemente pasan desapercibidas (6, 10). Lo mismo puede ocurrir, aunque con menos frecuencia, con los otros factores evaluados con esta prueba. La sensibilidad depende además de la fuente de factor hístico utilizado; la técnica es más sensible cuando este factor es obtenido de cerebro humano que cuando lo es de conejo. Esto es especialmente cierto en la detección de deficiencias leves de VII (6, 10).

#### Tiempo de Trombina (TT)

El TT valora directamente la capacidad de la trombina para formar el coágulo de fibrina (6, 21). Esta prueba mide el tiempo necesario para que una concentración específica de trombina convierta al fibrinógeno en fibrina. Generalmente

se elige para el análisis una concentración de trombina de modo que un TT normal sea entre 18 y 23 segundos (22). La hipofibrinogenemia menor a 100 mgs/dl las alteraciones cualitativas de esta molécula o la presencia de inhibidores de su polimerización como heparina, productos de degradación de la fibrina o paraproteínas, prolongan el TT (21).

## OBJETIVO

Con el fin de aumentar la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos negativos y positivos y el rendimiento global del TTPa, el TP y el TT y para caracterizar mejor los defectos de la fase plasmática de la coagulación utilizando pruebas sencillas, de bajo costo, accesibles y reproducibles, se realiza en el servicio desde hace varios años una combinación de TTPa, TP y TT que incluye correcciones y diluciones con PN y SS respectivamente y que se ha denominado "las tres T con diluciones".

El objeto de esta modificación es hacer más notorio el defecto en caso de deficiencias de factores al diluir aún más el factor de por sí ya deficiente con la SS o por el contrario, disminuirlo si es producido por un inhibidor al ser también diluido este por efecto de la SS.

En una experiencia previa informada en 1978 (23) en la que se estudiaron 110 pacientes, esta modificación demostró ser de gran ayuda en la identificación y caracterización de las distintas patologías de la hemostasia plasmática. Desde entonces se ha utilizado en la práctica clínica diaria con buenos resultados (comunicación personal Dr. Javier Pizzuto). Pero no se ha realizado un nuevo estudio para validar

esta impresión.

El objetivo principal de este trabajo fue conocer si las pruebas TTPa y TP con diluciones con SS tienen mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas estándar de TTPa y TP en 551 sujetos con deficiencia de factores plasmáticos de la coagulación.

Además se informa la experiencia obtenida con esta técnica en la detección del anticoagulante lúpico y de hiperactividad de factores. Por último, se refieren los resultados del TT con la misma modificación en el estudio de las anomalías del fibrinógeno y su polimerización.

## MATERIALES Y METODOS

## ESTUDIOS

Para la detección de hipocoagulabilidad por deficiencia de factores de la coagulación plasmática, se tomaron con las muestras sanguíneas después de 8 horas de ayuno, por punción venosa limpia e inmediatamente fueron mezcladas con citrato de sodio al 3.8% con una relación de sangre a anticoagulante de 9:1. Se utilizó para esto tubos de vidrio sin vacío y con el anticoagulante recientemente preparado (22). Los estudios fueron realizados dentro de la siguiente hora de tomada la muestra, utilizando para esto plasma pobre en plaquetas obtenido por centrifugación (22).

El TTPa y TP se practicaron según técnicas convencionales (12, 20), utilizando para el primero un reactivo compuesto por cefalina de cerebro de bovino como fosfolípido y ácido élagico como activador (Thrombofax. Ortho Diagnostic. Raritan, New Jersey. 08869) y para el segundo, tromboplastina tisular obtenida de cerebro desecado de conejo (Simplastin. Organon Teknika. Veerdijk, 58. Turnhout. Bélgica), en aparatos semiautomáticos (B.B.L. Becton Dickinson and Co. Cockeville MD. 2103). Si el TTPa o el TP resultaban prolongados se practicaba una mezcla con PN, primero uno a dos y luego

uno a cuatro y se les repetía la prueba, a esta etapa se le llamó de correcciones. En todos los casos, independientemente del resultado inicial, se realizaban diluciones del plasma problema y del control con SS al 0.9%, primero uno a dos y luego uno a cuatro y a estas se les practicaba nuevamente la determinación. Todas las pruebas fueron comparadas con un control de PN obtenido de una mezcla de cinco o seis donadores sanos y siempre fueron practicadas por duplicado (22, 23).

La dosificación de factores se realizó por medio de la comparación con una curva normal utilizando plasmas deficientes comerciales (Behringwerke AG. Diagnóstica. PO. Box 1140-D 3550 Marburg. Germany).

Antes de iniciar la utilización clínica rutinaria de "las tres T con diluciones", se practicaron múltiples determinaciones en vitro de las diluciones con SS para corroborar su reproducibilidad y sensibilidad. Para ello se prepararon artificialmente plasmas con concentraciones cercanas al 100, 75, 50, 25 y 10% de actividad de los factores XII, IX y II, VII, X y V. En el primer caso se practicaron 10 determinaciones por duplicado de TTPa sin y con diluciones uno a dos y uno a cuatro a cada uno de los distintos niveles de cada factor; posteriormente se calculó la desviación estándar y el promedio para cada nivel y con ellos se determinó el coefi-

ciente de variabilidad (CV). Igual metodología se siguió para el estudio del TP sin y con diluciones, utilizando los plasmas con actividad conocida de los factores V, II, VII y X (Tablas 1 y 2).

## DEFINICIONES

Se definió a la prolongación de más de tres segundos para el TP y más de 5 para el TTPa como anormales. La combinación de TTPa o TP prolongados que corrigieron con la mezcla de PN uno a dos o uno a cuatro, más el aumento de la prolongación con las diluciones con SS se tomó como patrón de deficiencia de factores. Así mismo, la existencia de una prueba inicial normal, pero prolongada en las diluciones, se interpretó también como deficiencia (23). La falta de corrección del defecto con las mezclas con PN, más su disminución o desaparición en las diluciones se definió como debido a un anticoagulante endógeno (23). Ejemplos de los patrones antes mencionados obtenidos del estudio de tres pacientes de este trabajo, pueden verse en las figuras 2 y 3.

Cuando existió una combinación de los patrones antes descritos se les denominó mixto.

## CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION

Se revisaron los archivos de coagulación entre los años 1986 a 1991; se seleccionaron para la investigación los estudios en los que hubiera, además del TTPa, TP o ambos, correcciones con PN en caso de prolongación de alguna de las pruebas y diluciones con SS del plasma problema en todos los casos. Que además tuvieran dosificación concomitante de los factores evaluados con la prueba estudiada así fueron XII, XI, IX, VIII, X, V y II para el TTPa y VII, V, X y II para el TP.

Para realizar la evaluación de la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de deficiencias de factores de la coagulación, se excluyeron del análisis las pruebas catalogadas como de patrón mixto o como anticoagulante y también en las que se demostró fibrinólisis aumentada.

## METODOS ESTADISTICOS

Se estimaron y compararon la sensibilidad y especificidad del TTPa y TP convencionales (sin diluciones) y la del TTPa y TP con diluciones en la detección de deficiencias de factores de la coagulación con nivel de actividad menor al 50%. Para esto se construyeron curvas de características operativas del receptor (ROC) para cada una de las pruebas

evaluadas. El área bajo la curva se comparó usando el método de Hanley y Mc Neil (24) y como las curvas de este trabajo emanaron de una misma cohorte de pacientes, se uso además un factor de corrección (25)

## RESULTADOS

### ESTUDIO EN VITRO

De las muestras de plasmas normales preparadas con actividades diversas de los factores plasmáticos de la coagulación y que variaban de 10 a 100%, se hicieron 10 réplicas a cada una de las muestras de TTPa y TP, sin y con diluciones 1:2 y 1:4. En cada grupo de pruebas se estimaron el promedio y la desviación estándar y con ellos el coeficiente de variabilidad ( $CV = \text{desviación estándar} / \text{promedio}$ ).

Para el TTPa se observó que el CV fue siempre igual o menor de 0.1 (promedio 0.06) aún en las diluciones mayores. Mientras que para el TP el CV fue siempre menor de 0.05 (promedio 0.03). Lo anterior indica una alta reproductibilidad de la técnica con las diluciones tanto para el TTPa como para el TP (tablas 1 y 2).

### ESTUDIO CLINICO

De 1986 a 1991, se practicaron en el laboratorio de coagulación del servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional 3500 determinaciones entre TTPa y TP. Sólo 573 fueron evaluables para esta investi-

gación. De estas, se excluyeron del estudio 67 porque, 27 mostraron tener un patrón anticoagulante, 30 mixto y 10 fibrinólisis anormal. En los 511 casos restantes se diagnosticó únicamente deficiencia de factores y por tal motivo fueron los únicos que se incluyeron para el análisis.

Los diagnósticos con que se enviaron al laboratorio estos 511 casos fueron en su orden hepatopatías, hemofilias y otras coagulopatías congénitas, preoperatorios, estudio de estados trombofílicos y absorción intestinal deficiente. En 350 casos se pudo analizar el TTPa y en 191 el TP. En 150 casos estuvo disponible el TTPa y TP de la misma muestra.

De los 350 casos analizables para el TTPa sin y con diluciones, en 149 hubo deficiencia de factores. En 109 esta era única y en 40 combinada. De los 149 plasmas deficientes, el TTPa sin diluciones diagnosticó la deficiencia en el 67.78% (101 casos) y con diluciones en el 91.94% (137 casos), para una sensibilidad de 68% (IC 95% 59.5-74.5) de la técnica sin diluciones y 92% (IC 95% 88.0-93.0) de la prueba con diluciones. La especificidad fue de 93% (IC 95% 89.5-96.5) para el TTPa sin diluciones y 92% (IC 95% 88.0-95.0) para las diluciones (tabla 3). Al comparar las curvas ROC obtenidas con ambas técnicas (figura 5), se encontró un área bajo la curva para el TTPa sin diluciones de 0.83 y con diluciones de 0.92. Esta diferencia fue estadísticamente significativa con P de

0.0001.

Cuando se analizó la intensidad de la deficiencia, se encontró que de los 149 plasmas deficientes, en 85 la actividad del factor (AF) era menor al 30% y en 64 mayor a esta cifra. En el primer grupo, en donde la deficiencia de factores era mayor, el TTPa sin dilución la detectó en el 84% (72 casos), o sea tuvo una sensibilidad de 84.7% (IC 95% 76.0-74.5); con el uso de las diluciones dicha anomalía se detectó en un número mayor (84 casos), mejorando el porcentaje de detección a 99% (IC 95% 95.0-100.0) (tabla 3). En el segundo grupo, en donde la deficiencia fue leve, con nivel de factor mayor al 30%, la utilidad del empleo de las diluciones fue aún más notoria pues el TTPa sin diluciones sólo la diagnosticó en el 45% (29 casos), en cambio con las diluciones se detectó en el 83% (53 casos). De lo anterior resulta que la sensibilidad del TTPa sin diluciones para detectar coagulopatías menores fue del 45.3% (IC 95% 34.2-56.4) y del 82.8% (IC 95% 72.0-93.2) con diluciones respectivamente.

Respecto a los doce casos en los que el TTPa con diluciones no diagnosticó la deficiencia, en 11 esta era leve, pues el nivel de actividad del factor deficiente era mayor al 30%; de estos 11, en cinco casos el factor deficiente pertenecía a la vía común de la coagulación, tres con disminución del factor V y dos del X y en todos los cinco el TP con

diluciones realizado concomitantemente si detectó la deficiencia. En dos de los 6 casos restantes existió hiperactividad de otros factores lo que pudo haber enmascarado el defecto y en los últimos 4 no se encontró explicación para la falta de detección.

De 191 muestras estudiadas con TP se encontraron 63 con deficiencias de factores; de ellas 49 eran únicas y 14 combinadas. El TP sin diluciones detectó dicha deficiencia en el 70% (44 casos), o sea tuvo una sensibilidad del 69.8% (IC 95% 59.0-81.1); mientras que con las diluciones el porcentaje de detección aumentó al 92% (58 casos) con una sensibilidad de 92% (IC 95% 85.0-98.0) (tabla 4). Sin embargo, al comparar los resultados anteriores en las áreas bajo la curva ROC no se observó diferencias significativas entre ambas pruebas: 0.93 y 0.92 respectivamente, con P de 0.3 (figura 6).

Al analizar las deficiencias de acuerdo con su severidad, se observó que en 31 casos el nivel de actividad del factor era menor al 30% y en 32 mayor a esta cifra. Al igual que con el TTPa, la sensibilidad del TP sin diluciones fue pobre para detectar defectos leves (AF mayor al 30%), pues solo los identifico en 18 de los 32 casos estudiados (56%); en cambio esto mejoró notablemente al emplear las diluciones ya que entonces se detectó en 28 casos, aumentando así la sensibilidad de 56.2% (IC 95% 39.3-73.5) del TP sin diluciones

a 87.5% (IC 95% 76.1-97.9) con el uso de las diluciones. En el diagnóstico de deficiencias más severas con AF menor al 30%, las diferencias fueron menos claras: 83.8% (IC 95% 79.0-96.0) para la determinación sin diluciones y 93.5% (IC 95% 84.0-100.0) con el empleo de las diluciones. En las tablas 3 al 6 se describen la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de cada una de las pruebas anteriores.

De las seis deficiencias que escaparon a su detección con el uso de las diluciones, 4 eran deficiencias leves (AF mayor al 30%), una con AF del 28% y la restante del 9%. en 5 de estos 6 casos el factor deficiente fue el V y en uno el X. Como era de esperarse el TTPa con diluciones realizado a las mismas muestras tampoco demostró el defecto.

## DISCUSION

Para el diagnóstico de la existencia o no de una deficiencia plasmática de la coagulación, las dos pruebas más utilizadas son el TTPa y el TP (6, 10, 11) debido a su sencillez, bajo costo, reproducibilidad y a que su especificidad y sensibilidad son bastante buenas (26); sin embargo, no son óptimas. En lo que se refiere al TTPa hay muchas variables prelaboratorio como son: punción traumática, edad de la muestra, relación sangre a anticoagulante, contaminación de catéteres con heparina y otras inherentes a la técnica, como la velocidad de oscilación del electrodo del fibrómetro (17, 18) que pueden ocasionar prolongaciones falsas. Además inhibidores contra factores de la vía intrínseca o más frecuente aún, el inhibidor lúpico prolongan el TTPa sin que haya deficiencia de factores (17, 27), por lo que la especificidad de la prueba puede ser baja. De hecho en un estudio, Kitchens (17) demostró que de 100 TTPa prolongados sin causa aparente, en sólo el 50% se documentó deficiencia de factores.

De otra parte, aunque se acepta que la sensibilidad en la detección de deficiencias de factores menores al 25% es de hasta el 90% (, 11, 12), esto varía dependiendo de la fuente del fosfolípido o del activador utilizado (14). Así Poller (28) encontró un rango de sensibilidades que varió

del 70 al 98% en la detección de una deficiencia de factor VIII del 20% cuando estudió 5 reactivos diferentes. Esta es también la experiencia en nuestro laboratorio (23). La diferencia en sensibilidades se hace más notoria todavía cuando el defecto es leve, con nivel de factor del 25 al 50% (14, 15). Sin embargo, cuando los distintos reactivos han sido evaluados por distintos investigadores, aunque se ha corroborado la diferencia en sensibilidad entre ellos en cada estudio, esta no ha sido reproducible (14); así, mientras Sibley y Cols (29) informan como pobre la sensibilidad obtenida con un preparado de cefalina de cerebro de conejo activado con celite, Hathaway y Cols (15) informan la encontrada con este mismo reactivo como buena. Por lo tanto es imposible recomendar un preparado como el mejor (14) y quizá la mejor sugerencia es que cada laboratorio haga sus pruebas de calidad y si la sensibilidad aún es baja después de dominar la reproducibilidad de la técnica, será recomendable probar otro reactivo o utilizar las diluciones con SS.

En la realización del TP intervienen menos variables que en la del TTPa y es por lo tanto una prueba más reproducible (11). Lo anterior unido a la poca frecuencia de inhibidores contra los factores que evalúa el TP, hacen que esta tenga mayor especificidad (26), sin dejar de considerar que la sensibilidad para el diagnóstico de las coagulopatías menores tampoco es la ideal (10).

Por todo lo anterior y con el fin de aumentar tanto la especificidad como la sensibilidad, pero sin perder la sencillez ni la reproducibilidad ni tampoco elevar marcadamente los costos de los estudios de la coagulación, se ideó la modificación técnica antes descrita.

La base teórica de esta modificación es que, cuando hay una deficiencia de factores, al diluir el plasma en estudio con la SS, se incrementa el grado de deficiencia ya que se disminuye aún más la actividad circulante de estos, lo que hace que se aumente la prolongación inicial de los tiempos de coagulación de la prueba en cuestión o que se haga aparente dicho defecto si no se había puesto en evidencia (Figura 2). Por el contrario, si la prolongación es debida a un anticoagulante endógeno, al diluirse este por efecto de la SS, disminuye o desaparece entonces el defecto original (Figura 3). Las correcciones con PN complementan al método de las diluciones para la adecuada caracterización de una prueba prolongada, ya que si es debida a una deficiencia el PN corregirá dicho defecto mientras que, si es por un anticoagulante no lo hará.

Para verificar la reproductibilidad de la técnica con las diluciones antes de su utilización clínica, se calculó el CV; para esto se practicaron más de 700 determinaciones a plasmas con AF conocida, obteniéndose en todos los casos un CV igual o menor a 0.10 (Tablas 1 y 2), lo que ratifica

la alta reproducibilidad de esta modificación.

En la segunda fase del estudio, la clínica, la sensibilidad del TTPa sin diluciones para diagnósticar deficiencias de factores con actividad circulante menor al 50% fue del 68%. Esta baja sensibilidad fue debida a que en la muestra hubo una proporción importante de coagulopatías menores, lo que se nota al discriminar las deficiencias en dos grupos; menores y mayores al 30% de AF deficiente. En el primero la sensibilidad del TTPa si diluciones fue del 85%, lo que se ecuentra dentro de los rangos infomados en la literatura para este nivel de factor (28), mientras que en el segundo fue muy pobre solamente del 45% lo que confirma los hallazgos de otros autores que estudiaron un número menor de enfermos con coagulopatías leves (nivel de factor mayor de 30%) (15,29).

Con el uso del TTPa con las diluciones se aumenta la sensibilidad e el diagnóstico de deficiencias de cualquier nivel del 68 al 92% con una P de 0.0001, elevando por lo tanto el valor predictivo negativo de 79 a 93 (tablas 3 y 5). Esto demuestra una clara superioridad del nuevo método sobre el tradicional. La diferencia es notoria especialmente en el grupo de deficiencias menores, en donde la actividad del factor deficiente circulante era mayor al 30%; aquí el uso de la prueba sin diluciones tuvo una sensibilidad muy baja, de apenas el 45% y con el uso de las diluciones aumentó al 83%, es decir

casi al doble.

En la detección de defectos mayores, en donde el nivel del factor deficiente es menor al 30%, la sensibilidad aunque mejor con las diluciones no fue muy diferente de la lograda con la técnica tradicional, 85 contra 98%. Sin embargo, con las diluciones se aumentó el valor predictivo negativo a una cifra ideal de 99%. Esto significa que el TTPa con diluciones es una prueba altamente segura para descartar la existencia de deficiencias graves con actividad circulante del factor deficiente menor al 30%.

En lo que respecta al TTPa, la comparación de los resultados de este trabajo con los informados en la literatura es difícil llevarla a cabo por varios motivos. Existe falta de uniformidad en las fuentes de fosfolípidos y de activador utilizados en los distintos estudios, en la mayoría de estos las muestras son pequeñas o sólo se investigó la sensibilidad para detectar deficiencias únicas de factores, siendo esta generalmente hereditaria de VIII o de IX. Por otra parte, son pocos los trabajos que evalúan la sensibilidad en la detección de defectos leves, con nivel de actividad del factor circulante mayor al 30%. Teniendo en cuenta lo anterior, creemos que nuestro trabajo tiene aún más valor porque en el grupo que estudiamos, la etiología de la deficiencia fue diversa siendo la mayor parte adquirida, los niveles de actividad

oscilaron desde cero a 49% y en casi la mitad (42%) la deficiencia fue leve, con nivel de factor mayor al 30%. Además en la cuarta parte de los casos estudiados hubo disminución concomitante de dos o más factores. Estas características son mucho más frecuentes en la práctica clínica diaria que las deficiencias hereditarias mayores únicas de los factores VIII, IX y XI.

En apoyo de lo anterior, en la tabla 7, se comparan los resultados de este estudio con los informados en la literatura. Como puede observarse se nota una superioridad de la técnica con las diluciones sobre la convencional en la detección de deficiencias de factores plasmáticos de la coagulación; puede apreciarse también que esta superioridad es mayor cuando se trata de deficiencias leves.

La utilización de una técnica adecuada en la toma de la sangre para minimizar las variables prelaboratorio y la realización a todas las muestras con resultado prolongado de mezclas con PN, redundaron en un alto nivel de especificidad en la prueba sin diluciones que no se perdió con las diluciones; 93 y 92% respectivamente. Este valor es muy bueno ya que para el TTPa se han informado niveles tan bajos como el 50% (17). Esta alta especificidad se traduce en altos valores predictivos positivos para ambas pruebas de 87 y 89%.

Con respecto al empleo del TP, hay pocos trabajos en la literatura que evalúen con un número alto de exámenes la sensibilidad del TP convencional (sin diluciones) para el diagnóstico de deficiencias de factores y en la mayoría el factor estudiado es el VII exclusivamente, informándose sensibilidad hasta del 100% cuando se trata de casos con nivel de este factor menor al 25% (9, 29). En nuestro grupo heterogéneo de estudio, la sensibilidad de la prueba sin diluciones para deficiencias mayores, con nivel de factor menor al 30% fue del 85% y para defectos menos severos con nivel de factor mayor a esta cifra fue sólo del 56%. La sensibilidad global del examen para deficiencias de cualquier nivel de factor fue del 70%, por lo que es posible que pasen desapercibidos disminuciones de los factores evaluados con el TP convencional (sin diluciones) con el consiguiente riesgo para el enfermo.

Las diluciones aumentaron la sensibilidad en la detección de deficiencias menores al 50% de 70 a 92% y aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (P de 0.3), esta ganancia mejoró el valor predictivo negativo a una cifra excelente 96%. Si observamos las curvas ROC emanadas del TP con ambas técnicas en la figura 6; encontramos que las áreas bajo la curva no fueron estadísticamente diferentes debido a que la sensibilidad del TP sin diluciones, aumenta al 92% si se toma como anormalidad la prolongación del T. R de más de un segundo (punto de corte A1) en vez de la de más

de tres (punto de corte A); o sea se alcanza el mismo valor que se obtiene con las diluciones (punto de corte B). Sin embargo, el número de muestras es muy pequeño para recomendar la utilización rutinaria de una prolongación en el TP mayor a un segundo como patológica, ya que esto disminuiría la especificidad de la prueba como en efecto ocurrió. Mientras que las diluciones permiten alcanzar este mismo nivel de sensibilidad sin perder especificidad. Así se puede apreciar en la figura 6 y tabla 4.

La especificidad del TP sin diluciones fue muy buena y no se perdió con las diluciones, por lo que el valor predictivo positivo de ambas técnicas fue de 97 y 98% respectivamente. Estos altos porcentajes son difíciles de lograr con otras técnicas por muy sofisticadas que estas sean.

La realización concomitante de TTPa y TP con diluciones a la misma muestra, mejora el porcentaje de detección de defectos de la vida común, ya que deficiencias leves de V y X pueden pasar desapercibidas con el TTPa y demostrarse con el TP (9). Así ocurrió en cinco de doce casos en nuestro grupo de pacientes. Esto ya ha sido informado en la literatura (9, 10) y sugiere una mejor sensibilidad del TP para diagnosticar deficiencias leves de V y X, sin embargo, es necesario estudiar un número mayor de muestras con distintos niveles de deficiencias de estos factores para llegar a conclusio-

nes más validas.

En este trabajo también se confirmó la utilidad de las tres T con diluciones informada previamente (23) no solo en la identificación de hipocoagulabilidad por deficiencia de factores, sino también en otras patologías como en la detección y diferenciación de alteraciones en la cantidad y función del fibrinógeno, en la monitorización de la heparinoterapia, en la detección de inhibidores de la polimerización de la fibrina, en los llamados estados de hipercoagulabilidad e inclusive en la identificación del anticoagulante lúpico, como se comentara a continuación:

#### 1. Utilidad del Tiempo de Trombina con Correcciones y Diluciones:

Para que la evaluación inicial de la fase plasmática de la coagulación sea completa es necesario, como se comentó con anterioridad, practicar además del TTPa y TP, el TT. Mediante esta prueba es posible diagnosticar alteraciones de la molécula del fibrinógeno, cuantitativas como en el caso de la hipofibrinogenemia o cualitativas como en las disfibrinogenemias, sean estas congénitas o adquiridas (21, 42). También el TT identifica las anomalías en la polimerización de esta molécula producidas por sustancias como los productos de degradación de la fibrina y paraproteínas (21). Esta prueba

es además muy sensible en la detección de niveles de heparina, con menos fuentes de error que el TTPa ya que no está influenciada por variables como los niveles de los factores de la coagulación y la fuente del fosfolípido empleado en el reactivo (15, 31). Esto hace que el TT sea una excelente técnica para la monitorización de la heparinoterapia (31).

El añadir al TT las correcciones con PN en caso de haber resultado prolongado y las diluciones con S6 en todos los casos, ayuda a discernir si una prolongación es debida a una hipofibrinogenemia o a una disfibrinogenemia, o por lo contrario, es secundaria a la presencia de inhibidores de la polimerización del fibrinógeno como los PDF o a una paraproteína (23).

En el primer caso habrá un TT prolongado que corrige con PN y se prolonga aún más con las diluciones con SS. Se corrobora la deficiencia dosificando el fibrinógeno y encontrando niveles inferiores a 200 mgs/dl, pero si este mismo patrón se encuentra coincidiendo con niveles normales de fibrinógeno, entonces existe una molécula de este factor normal en cantidad pero ineficaz dentro del mecanismo de la formación del coágulo por tener alteraciones estructurales, es decir una disfibrinogenemia (21, 23, 32). Es muy importante diagnosticar esta patología porque ya sea congénita o adquirida puede colocar al portador de ella en riesgo de presentar sangrado

anormal o trombosis (32)

Por el contrario, si el patrón muestra una discrepancia entre la falta de corrección de lo prolongado del TT con la adición de PN con su normalización al usar las diluciones con SS, en presencia de niveles normales de fibrinógeno, entonces se trata de un inhibidor de la polimerización de esta molécula y habrá que dirigir los siguientes exámenes hacia la búsqueda de este.

Como ejemplo de lo anterior referimos los resultados de 200 pruebas en las que se realizaron TT, correcciones, diluciones y dosificación de fibrinógeno. Este último por método de precipitación por calor (22) y el TT según técnica descrita en la forma convencional (22), con la trombina ajustada para producir un tiempo normal de 18 a 23 segundos (22).

De los 200 casos estudiados en el Laboratorio de Coagulación del servicio de Hematología del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS en el lapso de 5 años, se obtuvo la siguiente experiencia: A) En doce había fibrinógeno menor a 200 mgs y en todos el patrón fue de deficiencia, es decir la prolongación del TT se corregía con la adición de PN y aumentaba aún más con las diluciones con SS. B) En otros doce, el comportamiento fue también de deficiencia, pero con nivel normal de fibrinógeno por lo que

se diagnosticaron como disfibrinogenemia; sin embargo, no se pudo realizar la electroforesis de esta molécula para comprobar y caracterizar adecuadamente la sospecha de alteración molecular. C) En 15 casos el patrón fue de inhibidor, con nivel normal de fibrinógeno y D) En 11 hubo acortamiento de la prueba, sugestivo de aumento de los valores de fibrinógeno, pero solo en seis de estos casos el valor fue mayor a 500 mgs/dl. En las restantes 150 pruebas hubo correlación entre un TT normal y los valores también normales del fibrinógeno.

Otra de las utilidades del TT con correcciones es la monitorización de la heparinoterapia; a este respecto Pizzuto y Cols (31), informaron en 1979 que el TT con correcciones con PN rico en plaquetas era una técnica más sensible y reproducible que el TTPa y la recalcificación del plasma para la monitorización de los niveles de heparina. En su estudio demostró, primero *in vitro* y luego *in vivo*, que cuando la prolongación del TT producida por la heparina era corregida al mezclar el plasma heparinizado con el PN rico en plaquetas en una proporción entre 1:4 a 1:8, los niveles obtenidos de heparina eran los terapéuticos y sobre todo con un riesgo de sangrado por sobre anticoagulación muy bajo. Lo mismo no ocurrió al utilizar el TTPa y la recalcificación del plasma con los mismos propósitos.

La utilidad del TT con correcciones se hace todavía

más notoria cuando la heparinoterapia debe utilizarse en presencia de patologías como hepatopatía, coagulación intravascular diseminada, trombocitopenia o anticoagulación con cumarínicos ya que en estos casos se requiere un control muy exacto de los niveles terapéuticos de la heparina para evitar sangrados excesivos (31).

Con lo anterior podemos concluir que el adicionar el TT con correcciones y diluciones al TTPa y TP en el estudio de la fase plasmática de la coagulación, aumenta la sensibilidad global para la detección y caracterización de los defectos de esta fase, ya que tanto el TTPa como el TP son pruebas inadecuadas para el estudio de las alteraciones del fibrinógeno y de su polimerización, mientras que el TT con correcciones y diluciones es una técnica ideal para este propósito.

El TT con correcciones con PN rico en plaquetas es la mejor prueba para el adecuado control de la heparinoterapia especialmente cuando esta se realiza en un terreno en donde hay de base otros defectos hemostáticos.

## 2. Hiperactividad de Factores de la Coagulación:

Las diluciones también se han utilizado para detectar hiperactividad de los factores de la coagulación. En estos casos al haber aumento de la actividad de los factores de

la coagulación, se observa un acortamiento de la prueba en el plasma problema al compararlo con el plasma control en donde los factores son normales. Este acortamiento puede notarse desde la prueba inicial y persistir en las diluciones o manifestarse sólo con el uso de las diluciones (23). Un ejemplo de este patrón puede apreciarse en la figura 4, obtenido del estudio de una puérpera.

Sin embargo el rendimiento para este fin es bajo. Así, en una revisión retrospectiva de 199 estudios que incluían TTPa sin y con diluciones y la dosificación de todos los factores de la coagulación evaluados con esta prueba, se encontraron 67 pacientes con aumento de la actividad de uno o más factores. En 21 de estos casos (31%) el comportamiento del TTPa con diluciones detectó el aumento, en 46 (89%) no lo hizo obtenido una sensibilidad muy baja, de sólo el 31%. Por el contrario, la especificidad es buena. De 132 estudios con niveles normales de factores, en sólo 10 (7.6%) hubo un falso patrón de acortamiento sugestivo de hiperactividad lo que dio como resultado una especificidad del 92.42%.

Con los anteriores resultados podemos concluir que la existencia de un patrón de acortamiento en el TTPa con las diluciones en SS es altamente sugestivo de hiperactividad de factores; no obstante un TTPa normal aún con las diluciones no descarta satisfactoriamente la presencia de esta.

El significado de dicha hiperactividad en la genesis de los fenómenos tromboembólicos es todavía materia de controversia (9).

### 3. Diagnóstico del Anticoagulante Lúpico:

Los anticoagulantes o inhibidores endógenos circulantes son sustancias producidas por el organismo que interfieren con la reacciones de la coagulación en vivo o/y en vitro (27, 33). Usualmente son inmunoglobulinas IgG o IgM y pueden ser específicas en contra de un factor de la coagulación, por ejemplo, contra el VIII o no específicas, como es el caso del anticoagulante lúpico (AGL) (27, 34).

El ACL es una inmunoglobulina IgM o IgG y menos frecuentemente IgA o una mezcla de estas, que actúa contra los fosfolípidos aniónicos (27, 33, 35). De esta forma impide en vitro la adecuada formación del coágulo en las reacciones que son dependientes de fosfolípidos, especialmente el TTPa (27, 34). El ACL es el más común de los anticoagulantes endógenos y por lo tanto una causa frecuente de prolongación del TTPa. Kitchen (17) en su estudio, encontró que de 100 TTPa prolongados sin causa conocida, 33 fueron debidos al AGL y solo seis a un inhibidor contra un factor específico.

Lo anterior más la asociación del ACL con fenómeno

tromboembólicos tanto arteriales como venosos, pérdidas fetales y trombocitopenia por destrucción inmune (27, 33, 36, 37, 38, 39), han hecho necesaria la identificación de este inhibidor por el laboratorio.

La técnica más utilizada en su búsqueda inicial es el TTPa (34). Se considera muy sugestiva de ACL una prolongación del TTPa mayor de 5 segundos sobre el control si esta no corrige al mezclar a partes iguales el plasma estudiado con PN en un paciente con cuadro clínico sugestivo (39); sin embargo, cuando el ACL es muy débil la mezcla con PN puede corregir la prolongación por el efecto dilucional que también produce sobre el anticoagulante que en poca concentración se encuentra en el plasma estudiado (27, 40) y así confundir la prolongación inicial del TTPa con deficiencia de factores. Esto puede ocurrir hasta en el 16% de los casos de ACL estudiados (27).

La realización concomitante de diluciones con SS del plasma problema además de las correcciones con PN, permite identificar a un número apreciable de enfermos con ACL débil ya que, aunque haya corrección de la prolongación con la mezcla uno a dos con PN, al usar las diluciones con SS esta prolongación no aumenta, como debería esperarse en caso de deficiencia de factores (figura 2). sino que disminuye o desaparece (figura 3), es decir hay un comportamiento mixto en la

prueba global.

En la revisión retrospectiva de 1986 a 1991 de los archivos del laboratorio de coagulación, se identificaron 91 pacientes enviados para búsqueda de ACL por presentar trombosis arteriales o venosas, trombocitopenia o pérdidas fetales. A todos se les realizó TTPa según técnica descrita (12), con el mismo reactivo comercial ya referido en el estudio de las deficiencias plasmáticas de la coagulación. En caso de prolongación mayor a 5 segundos se practicaban correcciones con PN 1:2 y en todos los casos diluciones con SS. En la totalidad se realizó además TTPa con caolín como activador (41) e inhibición de la tromboplastina tisular según técnica descrita por Schleider y Cols (42).

Se definió a la prolongación del TTPa con caolín mayor a 2 segundos de la mezcla 1:2 del plasma problema con PN (39) y también a la prolongación de la inhibición de tromboplastina tisular en la dilución 1:500 (42) 1.4 veces o más sobre el control como diagnóstico de ACL.

Se identificaron 33 casos como ACL. De estos, en 25(76%), el TTPa de la mezcla 1:2 con PN permaneció prolongado más de 5 segundos sobre el control, es decir fue sugestivo de ACL, demostrando una sensibilidad del 76%. De los 8 casos restantes en donde dicha prueba resultó negativa, en 4 hubo

corrección con la mezcla con PN pero las diluciones no hicieron más evidente dicha prolongación, sino que por el contrario, la disminuyeron o la corrigieron, lo que sugirió la presencia de un anticoagulante. Por tanto el haber agregado el uso de las diluciones con SS aumentó la sensibilidad de este al 89% por haber detectado en 4 casos (12%) la presencia de ACL débil, porcentaje similar al 16% informado en la literatura (27), que hubiera pasado inadvertido o enmascarado por el efecto dilucional del PN sobre el anticoagulante.

En los otros 4 casos el TTPa inicial fue normal pero el TTPa con caolín o la inhibición de tromboplastina tisular fueron positivos, esto es explicable por la ya reconocida heterogeneidad del ACL (34) la que es debida en parte, a la especificidad diferencial que tiene la inmunoglobulina sobre los distintos tipos de fosfolípidos utilizados en los distintos reactivos comerciales empleados en las pruebas de coagulación (27, 34, 43).

En conclusión, las diluciones con SS realizadas de rutina a los pacientes con sospecha de ser portadores de ACL evitan la confusión que puede ocasionar una falsa corrección del defecto con PN en los casos de ACL débiles y mejorar la sensibilidad del TTPa en la detección de esta patología. No obstante, debido a la gran heterogeneidad de laboratorio de este inhibidor, es poco probable que una sola prueba pueda

detectar la totalidad de los enfermos y cuando el cuadro clínico es sugestivo se debe utilizar una combinación de ellas (27, 34).

## CONCLUSIONES

Del análisis de los presentes resultados y de la revisión de la literatura al respecto se puede concluir:

1. La sensibilidad del TTPa y TP convencionales (sin diluciones) para demostrar deficiencias de factores con nivel de actividad circulante menor al 30% aunque buena, no es la óptima y menos aún cuando se trata de coagulopatías menos intensas, con nivel de factor mayor al 30%. La práctica de diluciones con SS 1:2 y 1:4 aumenta la sensibilidad de ambas pruebas en la detección de deficiencias con nivel de factor menor al 50% de 68 y 70% obtenidos con el TTPa y TP con la técnica convencional, hasta 92% logrado al añadir el uso de las diluciones a ambas pruebas. Esta ganancia en sensibilidad es más notoria aún cuando se trata de una deficiencia leve, con actividad de factor mayor al 30%, en cuyo caso la sensibilidad con el TTPa mejoró de 45 a 83% y con el TP de 56 a 88%.

2. Esta ganancia en sensibilidad se logra sin pérdida de especificidad, mejorando de esta forma el rendimiento global de ambos exámenes. Esto hace posible mejorar el diagnóstico de deficiencias plasmáticas de la coagulación, especialmente las leves, congénitas o adquiridas y redundante en una mejor identificación de los pacientes con riesgo de tener sangrados

patológicos ya sean espontáneos o posteriores a trauma o cirugía objetivo principal del médico que evalúa a estos enfermos.

3. La modificación técnica antes descrita continúa siendo altamente reproducible (CV menor de 0.1), sencilla y además accesible, ya que no necesita de reactivos o aparatos distintos a los utilizados en la realización de las pruebas convencionales, por lo que se puede implementar fácilmente en la mayoría de los laboratorios clínicos de rutina.

4. El uso concomitante del TT con correcciones y diluciones complementa la evaluación inicial de la fase plasmática de la coagulación, ya que con dicha prueba se pueden detectar y caracterizar las alteraciones cualitativas y cuantitativas del fibrinógeno, así como las de su polimerización. El TT constituye una técnica excelente para monitorizar la heparinoterapia.

V. La utilización de correcciones y diluciones ayuda además a la identificación de la hiperactividad de factores de la coagulación y también al adecuado diagnóstico del ACL.

Tabla # 1

COEFICIENTE DE VARIABILIDAD DEL TTPa EN LAS DILUCIONES CON  
SOLUCION SALINA

| Factor | Acti. | Sin Dilución |      |      | Dilución 1:2 |      |      | Dilución 1:4 |       |      |
|--------|-------|--------------|------|------|--------------|------|------|--------------|-------|------|
|        |       | D.E          | X    | CV.  | D.E          | X    | CV.  | D.E          | X     | CV.  |
| XII    | 75%   | 0.61         | 26.7 | 0.02 | 1.25         | 29.8 | 0.04 | 1.65         | 53.2  | 0.03 |
|        | 50%   | 3.15         | 30.2 | 0.10 | 2.61         | 32.4 | 0.06 | 4.43         | 58.3  | 0.07 |
|        | 25%   | 2.58         | 46.6 | 0.05 | 3.41         | 55.6 | 0.06 | 1.71         | 76.1  | 0.02 |
|        | 10%   | 3.29         | 54.8 | 0.05 | 4.04         | 76.3 | 0.05 | 4.04         | 95.9  | 0.04 |
| IX     | 100%  | 1.39         | 22.3 | 0.06 | 1.36         | 30.9 | 0.04 | 5.95         | 60.7  | 0.09 |
|        | 50%   | 3.00         | 30.0 | 0.10 | 3.04         | 34.8 | 0.08 | 7.92         | 74.2  | 0.10 |
|        | 25%   | 1.40         | 39.4 | 0.03 | 1.15         | 47.9 | 0.02 | 9.50         | 97.1  | 0.09 |
|        | 10%   | 1.24         | 47.6 | 0.02 | 2.96         | 58.7 | 0.05 | 6.30         | 134.1 | 0.04 |

Acti: Actividad, De: Desviación Estándar, X: Promedio, CV: Coeficiente de Variabilidad.

Se prepararon artificialmente muestras de plasmas con actividades de los factores XII y IX de 100, 75, 50, 25 y 10%; posteriormente se practicaron 10 replicas de TTPa sin y con las diluciones con solución salina 1:2 y 1:4 a cada una de las muestras preparadas. En cada serie de pruebas se estimaron el promedio (X) y la desviación estándar (DE) obtenidas de las 10 determinaciones y con ellos se calculó el coeficiente de variabilidad (CV). El CV en todas las series fue de 0.10 o menor, esto indica una alta reproducibilidad del TTPa con diluciones 1:2 y 1:4 con solución salina.

Tabla # 2

COEFICIENTES DE VARIABILIDAD DEL TP EN LAS DILUCIONES CON  
SOLUCION SALINA

| Factor | Acti. | Sin Diluciones |      |      | Dilución 1:2 |      |      | Dilución 1:4 |      |      |
|--------|-------|----------------|------|------|--------------|------|------|--------------|------|------|
|        |       | D.E.           | X    | CV.  | D.E.         | X    | CV   | D.E.         | X    | CV   |
| II     | 100%  | 0.26           | 12.6 | 0.02 | 0.35         | 16.6 | 0.02 | 0.66         | 25.1 | 0.02 |
|        | 50%   | 0.24           | 13.5 | 0.01 | 0.55         | 17.7 | 0.03 | 0.57         | 28.3 | 0.02 |
|        | 25%   | 0.30           | 13.1 | 0.02 | 0.68         | 19.5 | 0.03 | 0.76         | 30.7 | 0.02 |
|        | 10%   | 0.30           | 14.5 | 0.02 | 0.55         | 20.1 | 0.02 | 0.56         | 32.4 | 0.01 |
| VII    | 100%  | 0.44           | 13.3 | 0.03 | 0.25         | 16.6 | 0.01 | 1.27         | 26.1 | 0.04 |
|        | 50%   | 0.39           | 15.7 | 0.02 | 0.50         | 21.9 | 0.02 | 2.06         | 34.5 | 0.05 |
|        | 25%   | 0.31           | 18.5 | 0.01 | 0.77         | 25.7 | 0.02 | 1.37         | 41.9 | 0.03 |
|        | 10%   | 0.42           | 22.3 | 0.01 | 0.46         | 32.0 | 0.01 | 2.44         | 54.7 | 0.04 |
| X      | 100%  | 0.44           | 14.0 | 0.03 | 0.21         | 16.6 | 0.01 | 0.55         | 24.9 | 0.02 |
|        | 50%   | 0.35           | 16.7 | 0.02 | 0.35         | 20.6 | 0.01 | 1.30         | 33.5 | 0.03 |
|        | 25%   | 0.30           | 18.0 | 0.01 | 0.26         | 24.7 | 0.01 | 1.21         | 41.3 | 0.02 |
|        | 10%   | 0.32           | 23.3 | 0.01 | 0.83         | 30.9 | 0.02 | 1.64         | 51.2 | 0.03 |
| V      | 100%  | 0.26           | 12.6 | 0.02 | 0.38         | 16.5 | 0.02 | 0.44         | 25.3 | 0.01 |
|        | 50%   | 0.33           | 13.7 | 0.02 | 0.34         | 19.4 | 0.01 | 1.34         | 32.4 | 0.04 |
|        | 25%   | 0.24           | 16.6 | 0.01 | 0.72         | 22.8 | 0.03 | 1.47         | 35.4 | 0.04 |
|        | 10%   | 0.32           | 16.9 | 0.02 | 0.59         | 24.9 | 0.02 | 1.40         | 38.2 | 0.03 |

Act.: Actividad, D.E: Desviación Estándar, X: Promedio, CV: Coeficiente de variabilidad.

Para el estudio de la reproducibilidad del TP con diluciones se prepararon artificialmente muestras de los factores II, VII, X y V con actividades que variaban del 10 al 100%, y siguió la misma metodología que con el TTPa. Como puede apreciarse en el 100% de las series el CV fue de 0.05 o menor, indicando una excelente reproducibilidad.

Tabla #3

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL TTPa SIN Y CON DILUCIONES EN  
EL DIAGNOSTICO DE DEFICIENCIAS DE FACTORES

| Prueba                  |             | ND  | Sensibilidad | IC 95%     | NN  | Especificidad | IC 95%     |
|-------------------------|-------------|-----|--------------|------------|-----|---------------|------------|
| TTPa<br>AF Menor<br>50% | Sin<br>Dils | 149 | 67.7%        | 59.5-74.5  | 201 | 93.0%         | 89.5-96.5  |
|                         | Con<br>Dils | 149 | 91.9%        | 88.0-93.0  | 201 | 92.0%         | 88.0-95.0  |
| TTPa<br>AF Menor<br>30% | Sin<br>Dils | 85  | 84.7%        | 76.0-91.0  | 265 | 86.0%         | 82.0-92.0  |
|                         | Con<br>Dils | 85  | 98.8%        | 95.0-100.0 | 265 | 81.0%         | 72.0-86.0% |

AF: Actividad del Factor, ND: Número de Deficiencias, IC: Intervalo de Confianza, NN: Número de Normales, Dils: Diluciones.

En la tabla se aprecia una mejor sensibilidad del TTPa con diluciones al compararlo con la técnica tradicional.

Tabla #4

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL TP SIN Y CON DILUCIONES EN EL  
DIAGNOSTICO DE DEFICIENCIAS DE FACTORES

| Prueba                |             | ND | Sensibilidad | IC 95%     | NN  | Especifici<br>dad | IC 95%     |
|-----------------------|-------------|----|--------------|------------|-----|-------------------|------------|
| TP<br>AF Menor<br>50% | Sin<br>Dils | 63 | 69.8%        | 59.0-81.0  | 128 | 99.0%             | 98.0-100.0 |
|                       | Con<br>Dils | 63 | 92.0%        | 85.0-98.7  | 128 | 99.0%             | 97.0-100.0 |
| TP<br>AF Menor<br>30% | Sin<br>Dils | 31 | 83.8%        | 79.0-96.0  | 160 | 92.5%             | 88.0-96.0  |
|                       | Con<br>Dils | 31 | 93.5%        | 84.0-100.0 | 160 | 83.0%             | 77.0-89.0  |

AF: Actividad del Factor, ND: Número de Deficiencias, IC: Intervalo de Confianza, NN: Número de Normales, Dils: Diluciones.

Al igual que con el TTPa, se observa una mejor sensibilidad del TP con las diluciones.

Tabla #5

VALORES PREDICTIVOS DEL TTPa SIN Y CON DILUCIONES EN EL  
DIAGNOSTICO DE DEFICIENCIAS DE FACTORES

|          |      | VPP% | IC 95%    | VPN % | IC 95%     |
|----------|------|------|-----------|-------|------------|
| TTPa     |      |      |           |       |            |
| AF Menor | Sin  |      |           |       |            |
| 50%      | Dils | 87.0 | 81.0-93.0 | 79.0  | 74.0-84.0  |
|          | Con  |      |           |       |            |
|          | Dils | 89.0 | 84.0-93.0 | 93.0  | 90.0-97.0  |
| TTPa     |      |      |           |       |            |
| AF Menor | Sin  |      |           |       |            |
| 30%      | Dils | 62.0 | 50.0-73.0 | 94.0  | 91.0-70.0  |
|          | Con  |      |           |       |            |
|          | Dils | 63.0 | 53.0-69.0 | 99.0  | 98.0-100.0 |

AF: Actividad del Factor, VPP: Valor predictivo positivo,  
IC: Intervalo de confianza, VPN: Valor predictivo negativo,  
Dils: Diluciones.

Tabla #6

VALORES PREDICTIVOS DEL TP SIN Y CON DILUCIONES EN EL  
DIAGNOSTICO DE DEFICIENCIAS DE FACTORES

|          |      | VPP % | IC 95%     | VPN % | IC 95%     |
|----------|------|-------|------------|-------|------------|
| TP       |      |       |            |       |            |
| AF Menor | Sin  |       |            |       |            |
| 50%      | Dils | 97.0  | 93.0-100.0 | 87.0  | 81.0-92.0  |
|          | Con  |       |            |       |            |
|          | Dils | 96.0  | 92.0-100.0 | 96.0  | 93.0-99.0  |
| TP       |      |       |            |       |            |
| AF Menor | Sin  |       |            |       |            |
| 30%      | Dils | 96.0  | 89.0-100.0 | 96.0  | 93.0-99.0  |
|          | Con  |       |            |       |            |
|          | Dils | 49.0  | 36.0-62.0  | 98.0  | 96.0-100.0 |

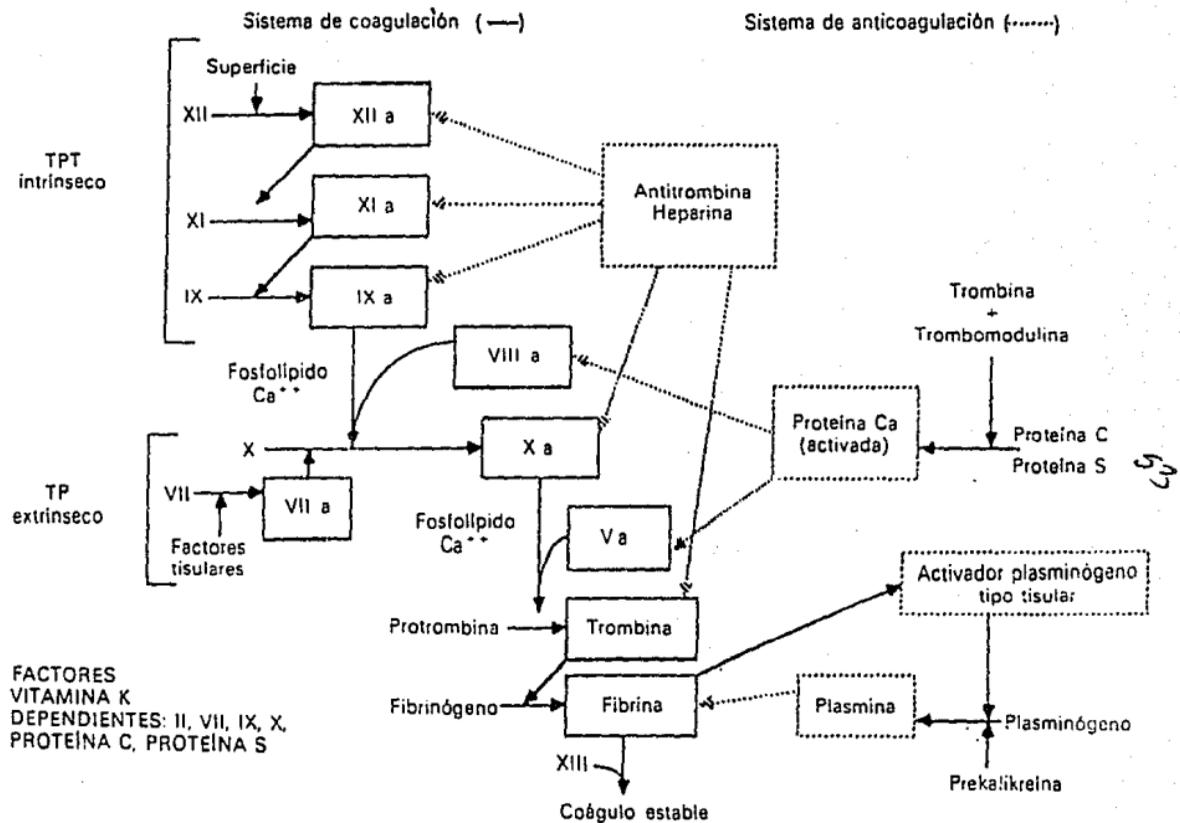
AF: Actividad del Factor, VVP: Valor predictivo positivo,  
IC: Intervalo de confianza, VPN: Valor predictivo negativo,  
Dils: Diluciones.

Tabla #7

SENSIBILIDAD DEL TTPa SIN Y CON DILUCIONES EN EL DIAGNOSTICO  
DE DEFICIENCIAS DE FACTORES

| Referencia       | Nivel de Factor | Sensibilidad Sin Diluciones | Sensibilidad Con Diluciones |
|------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Presente Estudio | 0-30%           | 85%                         | 98%                         |
| Poller (28)      | 20%             | 70%                         | ND                          |
| Poller (28)      | 20%             | 90%                         | ND                          |
| Poller (28)      | 20%             | 92%                         | ND                          |
| Poller (28)      | 20%             | 93%                         | ND                          |
| Poller (28)      | 20%             | 98%                         | ND                          |
| Presente Estudio | 31-49%          | 45%                         | 83%                         |
| Shuman (9)       | 31-49%          | 54%                         | ND                          |
| Hathaway (15)    | 40-49%          | 70%                         | ND                          |

Al comparar los resultados obtenidos por diversos autores y los de este trabajo al utilizar el TTPa sin diluciones con los obtenidos con las diluciones, se observa una mejor sensibilidad de la prueba con las diluciones. Esto es especialmente notorio cuando se trata de coagulopatías menores, con nivel de factor mayor al 30%.



Modificado de Rosenberg, R. D., Baner, K. A., Hospital Practice, marzo, 133, 1986

**FIGURA - 1**

Figura 2  
 Patrón de Deficiencia de Factores.  
 Ejemplo 1

---

|      | Plasma<br>Problema sin<br>Diluir | Correcciones |     | Diluciones |         |
|------|----------------------------------|--------------|-----|------------|---------|
|      |                                  | Con PN       |     | Con SS     |         |
|      |                                  | 1:2          | 1:4 | 1:2        | 1:4     |
| TP"  | 20"/13"                          | 14"          | -   | 24"/16"    | 42"/26" |
| TTPa | 39"/40"                          | -            | -   | 53"/45"    | 84"/68" |

Determinación de Factores:

II: 57%, V: 40%, VII: 40%, X: 60%, VIII: 170%, IX: 105%

---

PN: Mezcla de plasmas normales obtenidos de un mínimo de 4 a 6 donadores sanos.

SS: Solución Salina.

Deficiencia leve de V y VII. Se puede apreciar prolongación del TP sin diluciones que corrige con la mezcla con PN y que se prolonga aún más con las diluciones con SS. Mientras que el TTPa sin diluciones es normal, pero con las diluciones se prolonga co respecto al control, lo que demuestra la deficiencia leve de V que hubiera pasado desapercibida si solo se hubiera practicado el TTPa sin diluciones.

## Ejemplo 2

|      | Plasma       | Correcciones |     | Diluciones |         |
|------|--------------|--------------|-----|------------|---------|
|      | Problema sin | Con PN       |     | Con SS     |         |
|      | Diluir       | 1:2          | 1:4 | 1:2        | 1:4     |
| TP   | 13"/13"      | -            | -   | 18"/17"    | 24"/24" |
| TTPa | 39"/37"      | -            | -   | 60"/45"    | 90"/60" |

Determinación de Factores:

VIII: 28%, Resto normales.

Hemofilia A, Leve con nivel de factor: 28%. Notese que el TTPa sin diluciones es normal, pero al añadir estas a la prueba se hace notoria una prolongación, traduciendo la deficiencia leve de VIII existente en este enfermo. Como era de esperarse, el TP es normal tanto en la prueba inicial como con las diluciones.

## Figura 3

## Patrón de Inhibidor Circulante

|      | Plasma     | Correcciones |     | Diluciones |         |
|------|------------|--------------|-----|------------|---------|
|      | Problema   | Con PN       |     | Con SS     |         |
|      | Sin Diluir | 1:2          | 1:4 | 1:2        | 1:4     |
| TP   | 14"/12"    | -            | -   | 17"/15"    | 26"/24" |
| TTPa | 45"/32"    | 43"          | 39" | 47"/42"    | 60"/59" |

PN: Mezcla de plasma de 4-6 donadores sanos.

SS: Solución Salina.

Paciente con anticoagulante lúpico. El TP es normal, sin y con diluciones.

Mientras el TTPa esta prolongado y no corrige con PN, pero si con las diluciones con SS. Esto demuesra un inhibidor en la vía intrinseca.

Figura 4

## Patrón de Hiperactividad de Factores

|      | Plasma     | Correcciones |     | Diluciones |         |
|------|------------|--------------|-----|------------|---------|
|      | Problema   | Con PN       |     | Con SS     |         |
|      | Sin Diluir | 1:2          | 1:4 | 1:2        | 1:4     |
| TP   | 12"/12"    | -            | -   | 16"/14"    | 22"/19" |
| TTPa | 34"/43"    | -            | -   | 43"/54"    | 65"/89" |

## Determinación de Factores:

II: 150%, V: 120%, VII: 140%, VIII: 190%, IX: 160%, XI: 148%

XII: 120%

PN: Mezcla de plasmas de 4-6 donadores sanos.

SS: Solución Salina.

Hiperactividad de VIII y IX. Notese el TTPa corto en relación al conrol. Este acortamiento se hace más notorio con las diluciones con SS.

# COMPARACION DEL TTPa ESTANDAR Y CON DILUCIONES

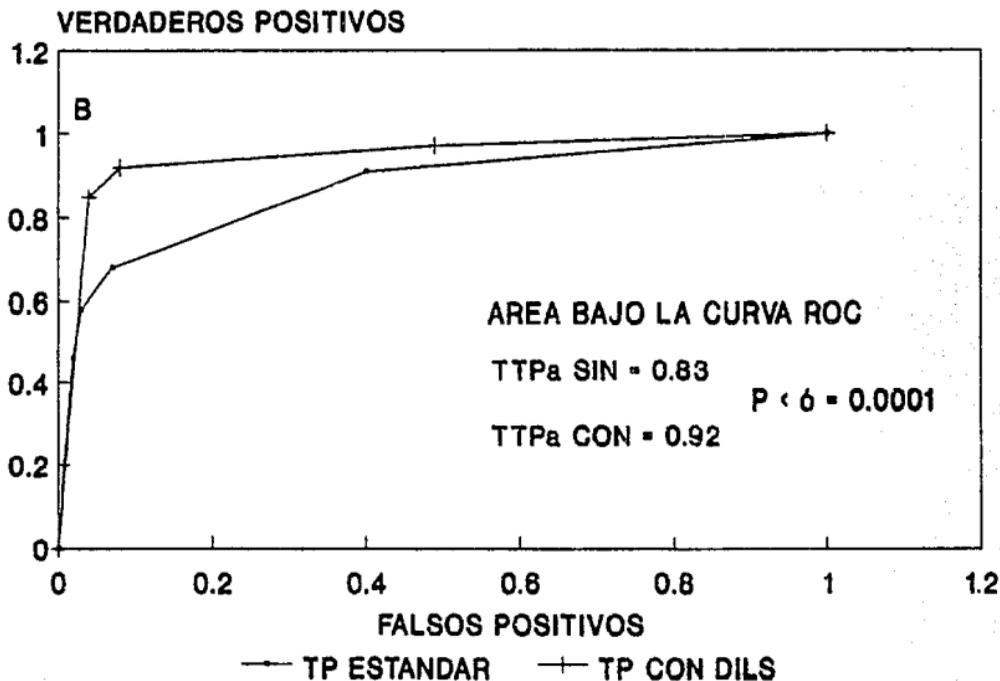


FIGURA 5

# COMPARACION DEL TP ESTANDAR Y CON DILUCIONES

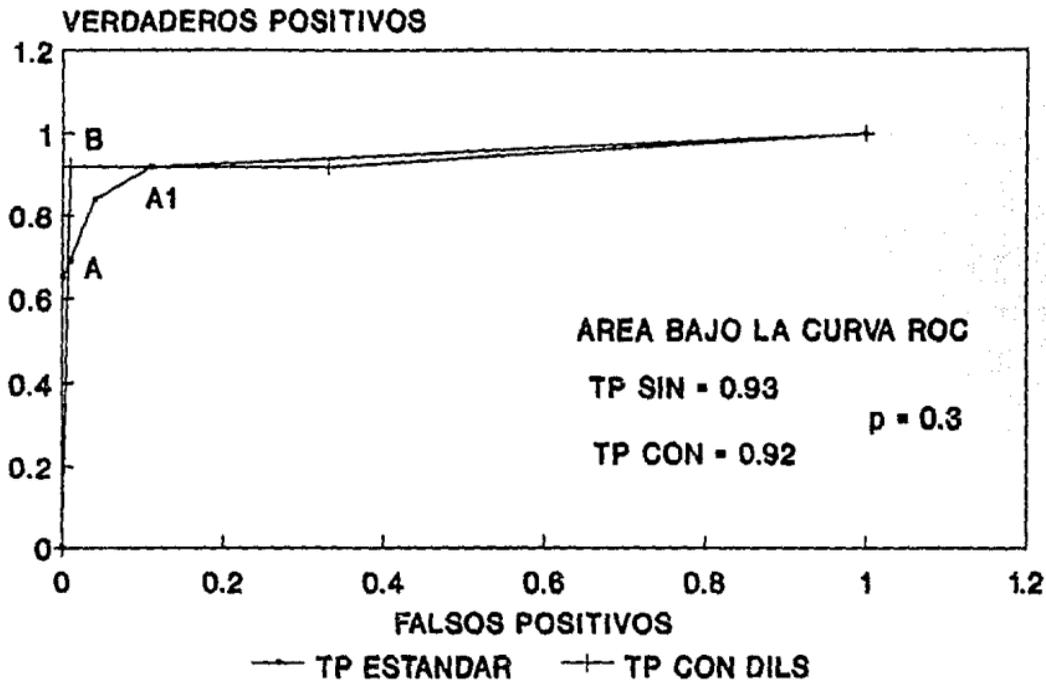


FIGURA 6

## REFERENCIAS

1. Handin Ri. Bleeding and Thrombosis. En Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ Et Al, Eds. Principles of Internal Medicine. New York: Mc Graw Hill, Inc, 1991:358-363.
2. Bennett Js, Shattil SJ. Platelet Function. En: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, Eds. Hematology. New York: Mc Graw Hill, 1990:1233-1250.
3. Ashby B, Daniel JL, Smith JB. Mechanisms of Platelet Activation and Inhibition. Hematol Oncol Clin North Amer 1990;4:1-19.
4. Nemerson Y. Sequence of Coagulation Reactions. En: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, Eds. Hematology. New York: Mc Graw Hill, 1990:1295-1304.
5. Francis CW, Marder VJ. Physiologic Regulation and Pathologic Disorders of Fibrinolysis. Hum Pathol 1987; 18: 263-274.
6. Bennett JS. Coagulación Sanguínea y Pruebas de Coagulación. Clin Med Nort Amer (Español) 1984;1:552-572.
7. Joist JH. Hypercoagulability: Introduction and Perspective. Semin Thromb Hemosta 1990;16:151-157.
8. Schafer AI. The Hypercoagulable States. Ann Intern Med 1985;102: 814-828.
9. Shuman AL, Griner PF. Common Uses Of the Activated Partial Thromboplastin Time and Prothrombin Time. En:

Sox HC Jr, Ed. Common Diagnostic Test. American College of Physicians 1990;226-244.

10. White II JC, Marder VJ, Colman RW Et Al. Approach to the Bleeding Patient. En: Colman RW, Marder VJ, Salinas EW, Eds. Hemostasis and Thrombosis Basic Principles and Clinical Practic. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1987;1048-1061.
11. Giddings JC, Peake IR. Laboratory Support in the Diagnosis of Coagulation Disorders. Clin Haematol 1985;14:571-595.
12. Hougie C. Partial Thromboplastin Time (PTT) and Activated Partial Thromboplastin Time Test. En: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichman MA, eds. Hematology. New York: Mc Graw Hill, 1990; 1766-1768.
13. Proctor RR, Rapaport SI. The Partial Thromboplastin Time With Kaolin A Simple Screening Test for First Stage Plasma Clotting Factor Deficiencies. Am J Clin Pathol 1961;212-219.
14. Bachman F. Diagnostic Approach to Mild Bleeding Disorders Semin Hematol 1980;17:292-305.
15. Hathaway WE, Assmus SL, Montgomery RR, Et Al. Activated Partial Time and Minor Coagulopathies. Am J Clin Pathol 1979;71:22-25.
16. Rapaport SI. Preoperative Hemostatic Evaluation: Which Test, If Any?. Blood 1983;61:229-231.

17. Kitchen CS. Prolonged Activated Partial Tromboplastin Time of Unknown Etiology: A Prospective Study of 100 consecutive cases Referred for Consultation. *Am J Hematol* 1988;27:38-45.
18. Kitchen CS, Smith LG. Pseudo Prolongation of The Partial Thromboplastin Time. *Am J Clin Pathol* 1983;80:750-752.
19. Czapec EE. Iatrogenic Prolonged aPTT: A Nondisease State. *JAMA* 1974;227:1304.
20. Hougie C. One Stage Prothrombin Time. En: Williams WJ, Beutler E, Ersley AJ, Lichman MA, Eds. *Hematology*. New York: Mc Graw Hill, 1990;1768-1770.
21. Hougie C. Methods for the Estimating Fibrinogen Concentration. En: Williams WJ, Beutler E, Ersley AJ, Lichman MA, eds. *Hematology*. New York: Mc Graw Hill, 1990:1770-1771.
22. Tiempo de Trombina. En: Reyna FM, Ballesteros LJ, Pizzuto ChJ. *Manual de Técnicas de Coagulación*. México: Limusa, 1988;87-88.
23. Reyna M. Pruebas de Laboratorio Accesibles en el Estudio de las Enfermedades Hemorrágicas. En: Pizzuto J, Harker L, Marder V, Eds. *Ciclos Sobre el Avance Continuo de la Medicina*. México: Instituto Mexicano del Seguro Social, 1978;119-130.
24. Hanley JA, Mc Neil BJ. The Meaning and Use of the Area Under a Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve. *radiology* 1982;143:29-36.

25. Hanley JA, Mc. Neil BJ. A Method of Comparing the Areas under Receiver Operating Characteristic Curves Derived From the Same Cases. *Radiology* 1983;148:839-843.
26. Suchman AL, Griner PF. Diagnostic Uses of the Activated Partial Thromboplastin Time and Prothrombin Time. *Ann Inter Med* 1986; 104: 810-816.
27. Triplett DA. Laboratory Diagnosis of Lupus Anticoagulantes. *Semin Thrombo Hemosta* 1990;2:182-192.
28. Poller L. Severe Bleeding Disorders in Children With Normal coagulation Screening Tests. *Br J Med* 1982;285:377
29. Sibley C, Singer JW, Wood RJ. Comparison of Activated Partial thromboplastin Reagents. *Am J Clin Pathol* 1973; 59:581-586.
30. Hall CA, Rapaport SI, Ames SB Et Al. A Clinical and Family Study of Hereditary Proconvertin (Factor VII) Deficiency. *Am J Med* 1964;37:172-180.
31. Pizzuto J, García Mendez S, Reyna MP, Et Al. Thrombin Time Dilution Test: A Simple Method for the Control of Heparin Therapy. *Thrombo Haemosta.* 1979;42:1276-1285.
32. Dang CV, Bell RW, Shuman M. The Normal and Morbid Biology of Fibrinogen. *Am J Med* 1989;87:567-575.
33. Bruce F. Acquired Anticoagulants. En: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichman MA, Eds. *Hematology.* New York: Mc Graw Hill, 1990;1514-1522.

34. Triplett DA, Brandt J. Laboratory Identification of the Lupus Anticoagulant. *Br. J Haematol* 1989;139-142.
35. Thiagarajan P, Shapiro SS, De Marco L. Monoclonal Immunoglobulin M Coagulation Inhibitor with Phospholipid Specificity. Mechanism of a Lupus Anticoagulant. *J Clin Invest* 1980;66:397-405.
36. Mueh JR, Herbst KD, Rapaport SI. Thrombosis in Patients with the Lupus Anticoagulant. *Ann Intern Med* 1980;92:156-159.
37. Elias M, Eldor A. Thromboembolism in Patients with the Lupus Type Circulating Anticoagulant. *Arch Intern Med* 1984;144:510-115.
38. Gastineau DA, Kazmier FJ, Nichols WL, Et Al. Lupus Anticoagulant: An Analysis of the Clinical and Laboratory Features of 219 Cases. *Am J Hematol* 1985;19:265-275.
39. Espinoza LR, Hartman RC. Significance of the Lupus Anticoagulant. *Am J Mematol* 1986;22:331-337.
40. Kaczor DA, Bickford NN, Triplett DA. Evaluation of Different Mixing Study Reagent and Dilution Effect in Lupus Anticoagulant Testing. *Am J Clin Pathol* 1991;95:408-411.
41. Exner T. Comparison of Two Simple Test for the Lupus Anticoagulant. *Am J Clin Pathol* 1985;83:215-218.
42. Schleider MA, Nachman RL, JaffeEA, Et Al. A Clinical Study of the Lupus Anticoagulant. *Blood* 1976;48:499-509.

43. Mannuci PM, Canciani MT, Meucci P. The Varied Sensivity of Parthial Thromboplastin Time and Protrhrombin Time Reagents in the Demostration of the Lupues Like Anticoagulant. Scand J Haematol 1979;22:423-432.