

Instituto de Hematología e Inmunología

SENSIBILIDAD DEL TIEMPO PARCIAL DE TROMBOPLASTINA ACTIVADO A LA DEFICIENCIA DE FACTORES VIII Y IX Y A LA HEPARINA

Lic. Alina Díaz Concepción, Dra. Delfina Almagro Vázquez y Lic. Alberto Brito Martínez

RESUMEN

Se reevaluó el rango de referencia del tiempo parcial de tromboplastina activada (TPTA). Se obtuvo un rango de referencia de 29 a 40 seg. con una media (\bar{X}) de 34,01 seg. Con nuestro sistema de reactivos se alcanzaron resultados aceptables en cuanto a la sensibilidad a diferentes niveles de actividad de los factores VIII y IX, se logró una alta correlación en ambos casos ($r^2 = 0,9842$ y $0,9846$, respectivamente) cuando se relacionó el TPTA con los diferentes niveles de actividad de los factores VIII y IX. Se obtuvo una respuesta lineal en el intervalo de actividad de heparina utilizado normalmente en la terapia (0,2 a 0,5 UI/mL) y se alcanzó una buena respuesta a altas concentraciones de heparina (0,8 UI/mL), expresada por un valor finito del TPTA. Se corroboró la necesidad de alargar el tiempo de incubación con el activador a 10 min para mejorar la sensibilidad del ensayo a la heparina.

DeCS: TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL; FACTOR VIII; FACTOR IX; HEPARINA.

La determinación del tiempo de protrombina (TP) y del tiempo parcial de tromboplastina activado (TPTA) se encuentran entre las pruebas de pesquiasaje más comúnmente realizadas en los laboratorios clínicos.¹⁻³ El TPTA se utiliza para el pesquiasaje de las alteraciones del "sistema intrínseco" de la coagulación, la deficiencia de factor VIII, de factor IX y de otras alteraciones menos comunes.^{4,5} Cuando se modifica apropiadamente el TPTA también se utiliza para estimar las concentraciones exactas de esos procoagulantes en el plasma de pacientes y/o

concentradas usados en la terapia.⁶ Es la prueba más ampliamente usada para monitorear el nivel de anticoagulación en pacientes sometidos a terapia con heparina⁷⁻¹⁰ y para detectar inhibidores de la coagulación como el anticoagulante lúpico y los inhibidores del factor VIII (FVIII) y del factor IX (FIX).¹¹

Varios estudios han demostrado que los diferentes reactivos comerciales y no comerciales usados para la realización del TPTA varían considerablemente en su sensibilidad a la heparina (definida como el cambio en el tiempo de coagulación para

un incremento de concentración), particularmente para el FVIII y la heparina.^{12,13} En un estudio cooperativo internacional, *Poller* y otros¹⁴ demostraron que esas diferencias en sensibilidad afectaban la capacidad de los reactivos para detectar alteraciones de la coagulación y que esto podría tener consecuencias clínicas importantes. Se han emitido lineamientos para la realización del TPTA en Estados Unidos por el Comité Nacional de Estándar para Laboratorio Clínico¹⁵ y en Alemania por el Instituto Alemán de Normalización.¹⁶ Por otra parte, en 1986 el Comité Internacional de Estandarización en Hematología propuso los requerimientos analíticos y de sensibilidad del TPTA y para la determinación del FVIII.¹⁷

La expresión de los resultados varía también entre los diferentes países y aún en diferentes laboratorios dentro de un mismo país.¹⁸

De igual forma, los reactivos comerciales difieren ampliamente en su sensibilidad a la heparina,¹⁹⁻²¹ de ahí que los datos obtenidos con un sistema de reactivos no pueden extrapolarse a un sistema de reactivos diferente. Por una parte los reactivos comerciales disponibles para realizar el TPTA muestran una respuesta diferente a la heparina, y otro lado, las heparinas usadas en la prevención y tratamiento de la trombosis reaccionan de forma diferente hacia los mismos reactivos del TPTA.²¹

Se ha enfatizado la importancia de la estandarización de los variados aspectos técnicos en la realización del TPTA. Cada laboratorio debe establecer su propio rango de referencia para todas las pruebas con el empleo de una metodología idéntica a la usada para los pacientes.²² En nuestro laboratorio hace algunos años, se modificó la metodología utilizada para la realización del TPTA, se determinó el nuevo rango de referencia y la sensibilidad a diferentes niveles de deficiencia de los factores de la coagulación de la vía intrínseca.²³

En este trabajo se revisó el rango de referencia para el TPTA y se determinó la sensibilidad de esta técnica para detectar diferentes niveles de factores VIII y IX, así como diferentes concentraciones de heparina.

MÉTODOS

DETERMINACIÓN DEL RANGO DE REFERENCIA DEL TPTA

Se obtuvo sangre de 100 donantes del Banco de Sangre entre 20-50 años de edad sin ingerir algún tipo de medicamentos y sin evidencias de enfermedad. Se tomaron 9 mL de sangre para 1 mL de citrato trisódico al 3,13 %, la sangre se centrifugó a 4 000 rev/min durante 15 min, el plasma se decantó y se ensayó antes de las 2 horas de la toma de muestra. El TPTA se realizó según el método de Proctor y Rapaport.²⁴ Se usó como activador caolín ligero (BDH) al 0,5 % en tampón imidazol-salino, pH 7,35, y como reactivo fosfolipídico, cefalina de cerebro humano producida en nuestro laboratorio, según el método de Bell y Alton.²⁵

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LOS FACTORES VIII Y IX

Se evaluó la sensibilidad del TPTA a los diferentes niveles de deficiencia de los factores VIII y IX diluyendo una mezcla de plasmas normales (plasma de 40 donantes del Banco de Sangre obtenidos en las mismas condiciones anteriormente explicadas y guardadas en alícuotas a -80°C) con plasma deficiente de FVIII obtenido de un paciente hemofílico A con menos del 1 % de actividad del FVIII y sin inhibidores, de forma tal que se obtuvieron actividades teóricas desde 100 % hasta 10 % de FVIII.

Los resultados se expresaron como relación semilogarítmica entre el logaritmo de la actividad del FVIII y el TPTA expresado en segundos. La sensibilidad al FIX se determinó de la misma forma, solo que el plasma deficiente usado fue un plasma comercial deficiente en FIX (Hemolab Cofactor IX BioMérieux).

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LA HEPARINA

La sensibilidad a la heparina se realizó adicionando heparina (Heparin Leo 5 000 UI/mL) a la mezcla de plasmas normales, de forma tal que se obtuvieron actividades finales de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 y 0,8 UI/mL. A cada una de estas muestras se les determinó el TPTA utilizando 2 sistemas de reactivos: cefalina-caolín y ácido elálgico (Hemostat APTT-EL).

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ACTIVACIÓN

Se realizó el TPTA a la mezcla de plasmas normales y a un plasma heparinado, en una concentración de 0,1 UI/mL utilizan-

do diferentes tiempos de incubación con el activador (cefalina-caolín) desde 1 a 14 minutos.

Todas las determinaciones se realizaron en un coagulómetro Amelung modelo KC-10 por duplicado y se repitieron 5 veces.

Los cálculos estadísticos se realizaron usando el paquete estadístico MICROSTA.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos para el TPTA en el grupo de 100 donantes fueron $\bar{X} = 34,01$ seg, con una desviación estándar de 2,83 seg. Se estableció un rango de referencia de 24-40 seg ($\bar{X} \pm 2DS$) o de 0,85-1,17, expresados como la relación entre el tiempo de coagulación de la muestra y el obtenido con la mezcla de plasmas normales.

Las figuras 1 y 2 muestran las curvas de sensibilidad del TPTA a los factores VIII y IX, respectivamente, expresados como la relación semilogarítmica entre el TPTA (seg) y el logaritmo de la actividad del FVIII ó FIX (%). Los coeficientes (r^2) fueron excelentes en ambos casos (0,9909 y 0,9807, respectivamente). La sensibilidad del TPTA es casi la misma cuando varían los niveles de actividad de FVIII y FIX en el plasma.

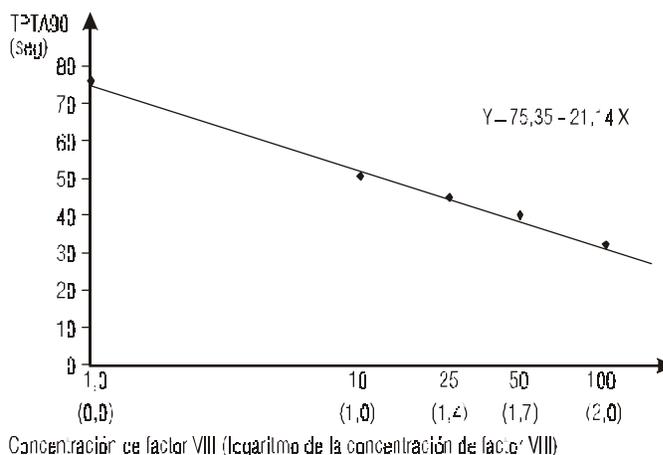


FIG. 1. Recta de regresión que relaciona el tiempo parcial de tromboplastina activada (TPTA) y la concentración de factor VIII.

Las curvas de sensibilidad a la heparina (fig. 3) muestran que la linealidad y la pendiente fueron buenas en los 2 sistemas investigados. Los coeficientes de correlación (r^2) fueron de 0,9842 y 0,9846, respectivamente y p altamente significativa ($p < 0,0001$) en ambos sistemas.

La respuesta a bajas concentraciones de heparina (0,2 UI/mL) fue adecuada para ambos activadores, ya que se obtuvo una relación plasma heparinado/plasma no heparinado superior al límite máximo normal (1,17 y 1,18) respectivamente, aun-

que no ocurrió así a la concentración de heparina de 0,1 UI/mL. Con el activador cefalina-caolín se observó una mayor sensibilidad a la heparina, expresada por relaciones más altas plasma heparinado/plasma no heparinado (tabla).

La influencia del tiempo de incubación con el caolín en la sensibilidad a la heparina se demuestra en la figura 4. Las diferencias entre plasma heparinado y no heparinado aumentan después de 5 minutos de incubación.

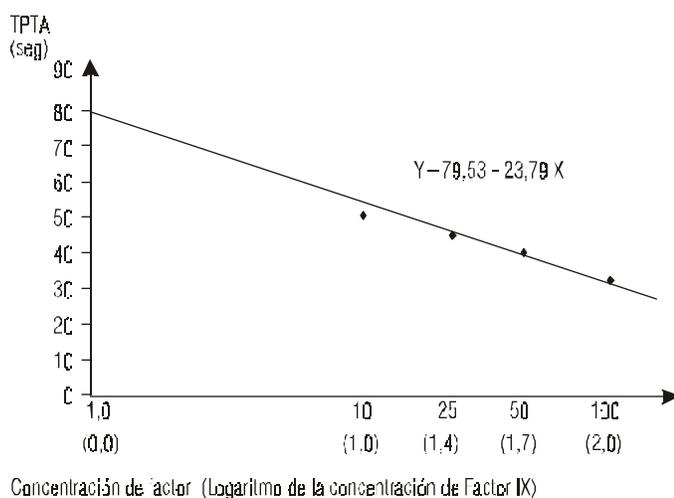


FIG. 2. Recta de regresión que relaciona el tiempo parcial de tromboplastina activada (TPTA) y la concentración de factor IX.

TABLA. Sensibilidad a la heparina. Relación entre el tiempo parcial de tromboplastina activado del plasma normal y del plasma con heparina con los tipos de activadores

Concentración de heparina UI/mL	Relación PN/PH caolín-cefalina	Relación PN/PH Hemostata PTT-EL
0,1	1,14	1,11
0,2	1,47	1,39
0,3	1,98	1,84
0,4	2,44	2,14
0,5	2,85	2,65
0,6	3,49	3,16
0,8	4,50	3,79
Rango normal TPTA	0,85 -1,17	0,85 -1,18

PN: plasma normal; PH: plasma con heparina; TPTA: tiempo parcial de tromboplastina activado.

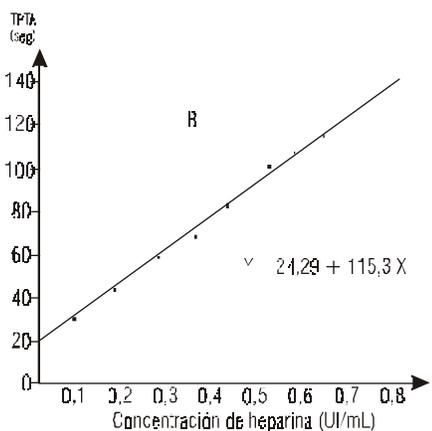
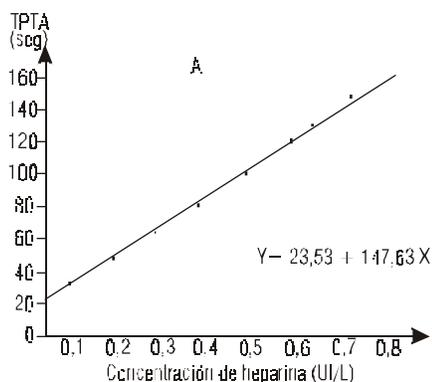


FIG. 3. Rectas de regresión para los valores del TPTA obtenidos con diferentes concentraciones de heparina. A) activador caolín defalina; B) activador ácido elálgico (Hemostat a PTFEL).

DISCUSIÓN

Es conocida la importancia de la estandarización de los diferentes aspectos técnicos en la realización del TPTA. En nuestro laboratorio, hace algunos años se estableció la metodología actualmente utilizada para la realización del TPTA y se estableció un rango de referencia de 31 a 45 seg para el método automático, y de 32 a 46 seg para el método manual, sin embargo, posteriormente observamos que pacientes con TPTA superiores a 40 seg tienen una deficiencia muy ligera de factor VIII ó IX, por lo que decidimos revisar el rango de referencia anteriormente establecido. La determinación del TPTA en 100 donantes de sangre resultó en un rango de referencia de 19-40 seg ($\bar{X} \pm 2DS$) y $\bar{X} = 34,01$ seg.

Al estudiar la sensibilidad del TPTA para detectar variados niveles de referencia de factores VIII y IX (figs.1 y 2), se obtuvo que para un valor teórico de actividad del FVIII y FIX de 50 %, el TPTA obtenido fue de 40,8 y 40,1 seg, se obtuvieron valores superiores de TPTA para niveles de actividad de FVIII y FIX inferiores a 50 % (límite inferior del nivel normal), lo que está en correspondencia con el rango de referencia obtenido para el TPTA.

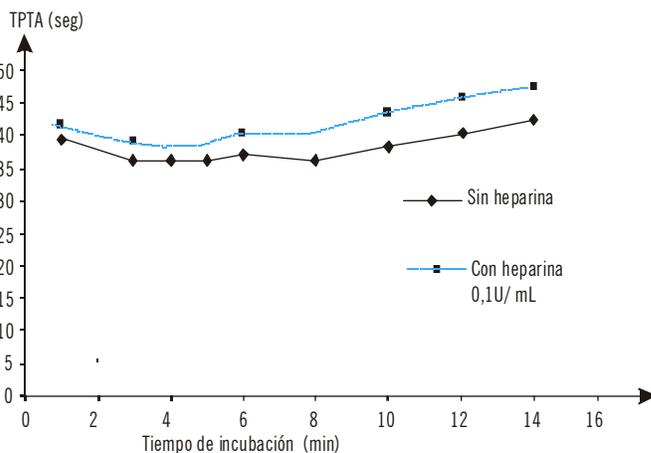


FIG. 4. Efecto del tiempo de activación con caolín en la sensibilidad del TPTA a la heparina.

Nuestro sistema de reactivos demostró una buena sensibilidad a los factores VIII y IX con altos coeficientes de correlación (0,9909 y 0,9807, respectivamente). Se comprobó que la sensibilidad del TPTA es casi la misma cuando varían los niveles de FVIII y FIX. En 1986, el panel de TPTA del Comité Internacional de Estandarización en Hematología propuso una relación entre el logaritmo de la actividad del FVIII y TPTA, expresada por la ecuación de la línea de regresión $y = 100 - 32X$,¹⁷ dado que el límite de tolerancia para el TPTA (Y) es $\pm 10\%$ del TPTA realmente obtenido. Nuestro sistema se encuentra dentro de los límites de tolerancia establecidos por este panel.

Los resultados obtenidos indican que nuestro sistema tiene buena respuesta a una actividad de heparina alta (0,8 U/mL) y que se obtiene una respuesta lineal en el intervalo de actividad de la heparina utilizado normalmente en la terapia (0,2-0,5 UI/mL). Los coeficientes de correlación que utilizan como activador el caolín ($r^2 = 0,9842$), así como el ácido elálgico ($r^2 = 0,9846$), fueron excelentes (fig. 3). Cuando se empleó este último, la sensibilidad a la heparina expresada como la relación plasma heparinado/plasma no heparinado (tabla 1), fue inferior a la obtenida cuando se usó el caolín como activador, lo que está acorde con lo reportado en la literatura.²⁶

Con ambos tipos de activadores se pudieron detectar altas actividades de heparina (0,8 UI/mL). *Cerneca* y otros²⁷ ensayaron la sensibilidad a la heparina de diferentes sistemas comerciales con diferentes métodos de detección del coágulo. Se obtuvo un valor finito del TPTA

a altas concentraciones de heparina (0,8 UI/mL) solo con el sistema Stago-Sta, lo cual se relacionó con el método de detección del coágulo utilizado (electro-mecánico). Estos autores plantearon que parece probable que la optimización del método de detección del coágulo hace posible medir períodos más largos de formación de fibrina de forma más exacta que usando otros sistemas.

El tiempo de activación es importante en la sensibilidad del TPTA a la heparina. Nuestros resultados demostraron que con tiempos de incubación del activador con el plasma heparinado mayores de 5 minutos, se obtienen resultados superiores. Ya otros autores han señalado que en interés de la reproductibilidad del método, es preferible usar 10 minutos como tiempo de incubación, para garantizar una activación completa.²⁸

Una solución a la carencia de estandarización del TPTA existente hasta el momento es la evaluación de la sensibilidad del sistema utilizado por medio de ensayos *in vitro*, seleccionando reactivos con suficiente sensibilidad para los requerimientos de una situación clínica dada. Con nuestro sistema se obtuvieron resultados aceptables en cuanto a la sensibilidad del TPTA a los diferentes niveles de deficiencia de factores VIII y IX. Por otra parte, se obtuvo una respuesta adecuada a bajas concentraciones de heparina (0,2 UI/mL), así como un valor finito de TPTA a altas concentraciones de heparina. Se estableció un tiempo óptimo de incubación con el activador superior de 10 minutos, con el objetivo de lograr una activación más completa y aumentar la sensibilidad de la prueba.

SUMMARY

The reference range of the activated partial thromboplastin time (APTT) was reevaluated. A reference range from 29 to 40 seconds with a mean (\bar{X}) of 34.01 sec. was obtained. By using our system of reagents, acceptable results were obtained as regards the sensitivity to different levels of activity of factors VIII

and IX. A high correlation was attained in both cases ($r^2 = 0.9842$ and 0.9846 , respectively) when the APTT was associated with the different levels of activity of factors VIII and IX. A linear response was obtained in the interval of heparin activity commonly used in therapy (0.2 to 0.5 UI/mL) and a good response was attained at high concentrations of heparin (0.8 UI/mL) expressed by a finite value of APTT. The need to extend the incubation time with the activator to 10 min. to improve the sensitivity of the test to heparin was corroborated.

Subject headings: PARTIAL THROMBOPLASTIN TIME; FACTOR VIII; FACTOR IX; HEPARIN.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quick AJ, Stanley-Brown M, Bancroft FW. A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. *Am J Med Sci* 1935;190:501-11.
2. Poller L, Thomson JM, Taberner DA. Use of the activated partial thromboplastin time for monitoring heparin therapy: problems and possible solutions. *Res Clin Lab* 1989;19:363-70.
3. Suchman AL, Griner FF. Diagnostic uses of the partial thromboplastin time and prothrombin time. *Ann Intern Med* 1985;104:810-6.
4. Brinkhous KM, Dombrose FA. Partial thromboplastin time in handbook series. En: Schmidt RM, ed *Hematology*. Boca Raton: CRC Press, 1980;vol 3:216-21.
5. Barna L, Triplett DA. Use of activated thromboplastin time for the diagnosis of congenital coagulation disorders: problems and possible solutions. *Ric Clin Lab* 1989;19:345-54.
6. Bowie EJW, Thomson JH, Didisheim P, Owen CA. *Laboratory manual of hemostasis*. Philadelphia: WB Saunders, 1971:111-3.
7. Brandt JT, Triplett DA. Laboratory monitoring of heparin. Effect of reagents and instrument on the activated partial thromboplastin time. *Am J Clin Pathol* 1981;76:530-7.
8. Van der Besselaar AMPH, Meeuwisse-Braun J, Jansen-Guiter R. Monitoring heparin therapy by the activated partial thromboplastin time. The effect of preanalytical conditions. *Thromb Haemost* 1987;57:226-31.
9. Calvin BT, Barrowcliffe TW, The British Society for Haematology. Guidelines on the use and monitoring of heparin 1992 Second Revision. *J Clin Pathol* 1993;46:97-103.
10. Stevenson KJ, Eeaston AC, Thomson JM, Poller L. Lipid class composition and heparin sensitivity in the activated thromboplastin time. *Thromb Haemost* 1983;50:601-3.
11. Kelsey PR, Stevenson KJ, Poller L. Lupus anticoagulant and phosphatidyl serine: demonstration of their inter-relationship and of a possible diagnostic test. *Br J Haematol* 1984;56:671-6.
12. Sibley CS, Singer JW, Wood RT. Comparison of activated partial thromboplastin reagents. *Am J Clin Pathol* 1983;59:581-6.
13. Hoffman JML, Meulendijk PN. Comparison of reagents for determining the activated partial thromboplastin time. *Thromb Haemost* 1978;39:640-5.
14. Poller L, Thomson JM, Palmer MK. Measuring partial thromboplastin time. An international collaborative study. *Lancet* 1976;1:842-6.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Activated partial thromboplastin time test (APTT). Tentative Guideline NCCLS document H 29-T Villanova, 1992.
16. DIN Deutsches Institut für Normung: *Haemosta Serologic: Normen*. Berlin: Beuth Verlag, 1995.
17. Koepke JA. Partial thromboplastin time test. Proposed performance guidelines ICSH Panel on the PTT. *Thromb Haemost* 1986;55:143-4.
18. Dati F. Quality management and standardization programs in Haemostaseology JIFCC 1996;8:111-6.
19. Soloway HB, Bellineau RR, Grayson JWJr, Butler JJ. The in vitro effect of heparin on the partial thromboplastin time. *Am J Clin Pathol* 1972;58:405-7.
20. Shapiro GA, Huntzinger SW, Wilson JE. Variations among commercial activated partial thromboplastin time reagents in response to heparin. *Am J Clin Pathol* 1972;67:477-80.

21. Bjorsson TR, Nash PV. Variability in heparin sensitivity of APTT reagent. *Am J Clin Pathol* 1986;86:199-204.
22. Peake I, Seligsohn U, Gitel S, Kitchen S, Zevelix A. The laboratory diagnosis of haemophilia: recommendations by the Laboratory activities Committee of the World Federation of Hemophilia. *Haemophilia* 1995;1:159-64.
23. Rubio R, Almagro D, González A, Mesa J, Fonseca C. Algunas consideraciones actuales sobre el tiempo parcial de tromboplastina activado. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1986;2:235-42.
24. Proctor RR, Rapaport SI. The partial thromboplastin time with kaolín. *Am J Clin Pathol* 1961;36:212.
25. Bell WN, Alton HG. A brain extract as a substitute for platelet suspension in the thromboplastin generation test. *Nature* 1954;174:880-1.
26. Barrowcliffe TW, Gray E. Studies of phospholipid reagents used in coagulation II: factors influencing their sensitivity to heparin. *Thromb Haemost* 1981;46:634-7.
27. Cerneca F, Bruno G, Simeone R, Bet N, Bertolessi M, Oliviere ML, et al. Activated partial thromboplastin time: sensitivity to heparin and factor VIII deficiency. *Transfus Sangue* 1997;42:160-5.
28. Barrowcliffe TW, Gray E. Studies of phospholipid reagents used in coagulation I: some general properties and their sensitivity to factor VIII. *Thromb Haemost* 1981;46:629-33.

Recibido: 20 de diciembre de 1999. Aprobado 24 de diciembre de 1999.

Lic. *Alina Díaz Concepción*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf.: (537)578268. Fax (537) 338979. e-mail:ihidir@hemato.sld.cu