

2 Capítulo

Pruebas de laboratorio de hemostasia

Pilar Medina Badenes, Silvia Navarro Rosales y Josune Orbe Lopategui

PUNTOS CLAVE

- Las pruebas de laboratorio convencionales identifican la mayoría de los defectos hemostáticos clínicamente importantes, basados en la medida de la coagulación (TP, TTPa, TT y fibrinógeno) o la degradación de la fibrina por la plasmina (dímero D).
- Las pruebas de hipercoagulabilidad analizan la tendencia de un individuo a desarrollar episodios trombóticos que pueden tener causas genéticas (estudio de trombofilia) o ser debidos a la presencia de autoanticuerpos frente a la activación de la protrombina (anticoagulante lúpico).
- Otras pruebas que puedan tener aplicación futura porque son rápidas, permiten monitorización continua y una terapia guiada son el test de generación de trombina y la tromboelastometría.

RECOGIDA, PROCESADO Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS ANTES DE LAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

Los resultados de las pruebas de laboratorio de coagulación pueden verse afectados por una serie de variables preanalíticas.

Es ampliamente conocido que el tipo de tubo empleado, el llenado completo y la correcta centrifugación y almacenamiento son esenciales para un adecuado estudio de las pruebas de coagulación (1). Sin embargo, otros muchos factores pueden contribuir a la obtención de resultados erróneos y, con ello, a un incorrecto manejo del paciente. A continuación revisaremos una serie de variables preanalíticas menos estudiadas, pero determinantes en las pruebas de coagulación:

- El *tiempo de ayuno* puede modificar los resultados de los ensayos de la coagulación. Así, una comida ligera antes de la extracción puede modificar los resultados del tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) y de la antitrombina (2). Aunque no es una variable decisiva, los autores del estudio (Oliveira y cols.) sugieren estandarizar el tiempo de ayuno a 12 horas.
- La *postura* antes y durante la extracción también es importante. El TTPa y el fibrinógeno aumentan y el TP disminuye si los pacientes están sentados o de pie respecto a decúbito supino (3). Esto último puede tener un impacto significativo en los pacientes que toman antagonistas de la vitamina K, lo que puede conducir potencialmente al aumento injustificado de la

- dosis de fármaco. Por ello, se recomienda la extracción de sangre con el paciente sentado.
- Durante la punción venosa es muy habitual el *bombeo del puño*, que no afecta a las pruebas de coagulación, pero que, sin embargo, desencadena una hiperpotasemia que sí afecta a otras pruebas de laboratorio. Asimismo, es muy habitual el uso del *torniquete*, que se recomienda aplicar durante un máximo de 60 segundos puesto que tiempos más largos aumentan significativamente el fibrinógeno, TP y TTPa (4).
 - El *orden de extracción de los tubos de sangre* es esencial para prevenir la contaminación cruzada de los aditivos. Para las pruebas de coagulación se deben emplear *tubos de citrato trisódico* 0,105-0,109 mol/l y el uso de otros tubos puede conllevar la alteración en muchos parámetros de la coagulación (Tabla I). Además, en el caso de las pruebas de coagulación, la contaminación del tubo de citrato con K_2 -EDTA produce un aumento del TTPa y TP y una disminución del fibrinógeno (5), lo cual podría generar errores en el manejo de los pacientes. Por ello, el orden de extracción de los tubos de sangre debe ser el siguiente: hemocultivo, suero sin aditivos, citrato, heparina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y oxalato de flúor.

Además, deben tenerse en cuenta las siguientes recomendaciones para no alterar el resultado de las pruebas de coagulación:

- Emplear *agujas de un calibre 21* como máximo (22-23 para niños) para prevenir la estasis venosa y la liberación de componentes fibrinolíticos.
- Extraer la sangre de *venas antecubitales* y desechar los primeros 5-10 ml de sangre si se extrae de catéteres venosos periféricos o de catéteres centrales. Asimismo, buscar una nueva vena si hay dificultad en la venopunción, puesto que afecta especialmente a las pruebas de función plaquetaria.
- *Llenar los tubos correctamente e invertir suavemente* 5 veces para evitar la activación de la coagulación o la hemólisis.
- *Centrifugar* a 150-200 × g 15 minutos a temperatura ambiente para obtener plasma rico en plaquetas (PRP) y estudiar la función plaquetaria en las siguientes 2 horas. Para el resto de pruebas, obtener plasma pobre en plaquetas (PPP) centrifugando a 2.000 × g al menos 10 minutos a temperatura ambiente y evitar el almacenamiento prolongado a 4-8 °C, puesto que aumenta la actividad del FVII y acorta el TP y TTPa.

PRUEBAS DE LABORATORIO DE LA COAGULACIÓN

Los laboratorios ofrecen un conjunto de pruebas que tiene como objetivo identificar la mayoría de los defectos hemostáticos clínicamente importantes, y basados en la medida de la coagulación. Estas pruebas incluyen principalmente:

Tabla I
Consecuencias del uso indebido de tubos de sangre para las pruebas de coagulación

Tipo de muestra	Consecuencias en ensayos de coagulación de rutina	Consecuencias en ensayos de factores de la coagulación
Plasma con EDTA	Prolonga TP y TTPa y ocasionalmente TT Podría influir en fibrinógeno y dímero D	Falsos niveles bajos, especialmente FV y FVIII
Suero/muestra coagulada	No fibrinógeno (ausencia de coágulo en TP, TTPa o TT) Falso diagnóstico de afibrinogenemia Puede afectar al dímero D	Falsos niveles bajos, especialmente FII, FV y FVIII Falsos niveles altos FVII
Plasma con heparina (tubo de heparina o contaminación del tubo de citrato)	Prolongación de TP, TTPa y TT Falsos niveles bajos de fibrinógeno	Niveles reducidos, especialmente FVIII, FIX, FXI y FXII
Tubo de citrato no llenado completamente	Prolongación de TP, TTPa y TT Puede infraestimar fibrinógeno y dímero D	Posibles falsos niveles bajos de los factores

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético; TP: tiempo de protrombina; TT: tiempo de trombina; TTPa: tiempo de tromboplastina parcial activado.

tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), fibrinógeno y tiempo de trombina (TT). Alteraciones en estas pruebas se asocian con posibles diagnósticos y permite realizar más pruebas para definir la anomalía (Tabla II).

Tiempo de protrombina

El tiempo de protrombina (TP) es una prueba global de la coagulación que permite analizar la vía extrínseca junto con la vía común, explorando la actividad de los factores VII, V, X, II y fibrinógeno. Es una técnica coagulativa, y para su realización se añade al plasma pobre en plaquetas (PPP) tromboplastina o factor tisular (FT) purificado e ion calcio. De esta forma se consigue la activación del FVII activando consecuentemente la coagulación. El TP puede verse alterado por deficiencia de un solo factor; teniendo una sensibilidad máxima al déficit de FVII. En general, la disminución de 1,5 a 2 veces el valor normal se relaciona con una concentración de factor de menos del 30 %. En caso de deficiencia de más de un factor, esta prueba estará alargada, como sucede en hepatopatías, deficiencia de vitamina K o presencia de heparina en la muestra. A partir del TP se puede obtener la razón internacional normalizada (INR) y el índice de Quick. El INR se utiliza como método estandarizado para monitorizar las terapias anticoagulantes antivitaminas K (ejemplo, dicumarínicos).

Con el uso de diferentes tromboplastinas en los ensayos de FVII o FX, se mostrará una prolongación del TP por encima

del límite superior de lo normal cuando hay una deficiencia aislada de FVII, FX o FV con un nivel inferior a 30-40 U/dl, aunque el nivel de FII asociado con la prolongación del TP es inferior al de los otros factores.

Tiempo de tromboplastina parcial activado

El tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) también es una prueba global de la coagulación que permite analizar la vía intrínseca de la coagulación junto con la vía común. Se trata de una técnica coagulativa que consiste en la activación de plasma citratado tras la administración de un activador del sistema de contacto (caolín, ácido eláico o sílice) junto con fosfolípidos e iones calcio. Se ve afectado por la deficiencia de los factores XII, XI, IX, VIII, X, V, II y fibrinógeno. Los déficits deben ser menores del 30-40 % de lo normal, o que se vean afectados varios factores, que en algunas ocasiones se asocian a sangrados. Además, el TTPa es una técnica muy sensible a la presencia de anticoagulantes circulantes (como el anticoagulante lúpico, la heparina o los anticuerpos contra un determinado factor de la vía intrínseca). Por este motivo, si en un estudio básico aparece alargado, además de comprobar la calidad de la muestra de sangre o si la muestra ha sido extraída de un catéter o reservorio, se puede realizar un experimento mezcla, que consiste en repetir el TTPa con una mezcla 1:1 de plasma del paciente con plasma normal. Si se corrige nos

Tabla II
Alteraciones en las principales pruebas de coagulación

TP	TTPa	TT	Fibrinógeno	Posibles causas
Prolongado	Normal	Normal	Normal	Deficiencia de FVII
Normal	Prolongado	Normal	Normal	Deficiencia de FVIII, FIX, FXI, FXII, factor de contacto o anticoagulante lúpico
Prolongado	Prolongado	Normal	Normal	Deficiencia de FII, FV o FX Terapia anticoagulante oral Deficiencia de vitamina-K Deficiencia combinada de FV-FVIII o de FII-FVII-FIX-FX Enfermedad hepática
Prolongado	Prolongado	Prolongado	Normal o bajo	Hipofibrinogenemia o disfibrinogenemia Enfermedad hepática Transfusión masiva CID

CID: coagulación intravascular diseminada; TP: tiempo de protrombina; TT: tiempo de trombina; TTPa: tiempo de tromboplastina parcial activado.

orientará a déficit de factores, mientras que si no se corrige tras la administración de plasma normal, pensaremos en la presencia de algún anticoagulante o anticuerpo (anticoagulante lúpico o anticuerpos antifactor VIII:C).

Se han establecido deficiencias de FIX o FXI por debajo de 20-25 U/dl y un patrón más mixto de resultados normales y anormales, cuando el FIX o FXI está en el rango de 25-60 U/dl. En el caso del FVIII, se han obtenido resultados normales de TTPa en pacientes con FVIII en el rango de 30-50 U/dl.

Tiempo de trombina

El tiempo de trombina (TT) valora el paso de fibrinógeno a fibrina. Para su análisis se añade a la muestra de plasma citratado una solución diluida de trombina de origen bovino o humano. Se trata de una prueba muy sensible a las alteraciones del fibrinógeno. Por ello, estará alterada en casos de déficit de fibrinógeno (hipofibrinogenemia o afibrinogenemia, ya sean congénitos o adquiridos, coagulación intravascular diseminada o disfibrinogenemia). Hay que tener en cuenta que el TT también puede ser alterado por la presencia de heparina en la muestra. Para distinguir si se trata de esta situación podemos emplear otra técnica que conocemos como *tiempo de reptilase*, que no estará alterado en el caso de presencia de heparina y, sin embargo, sí en el resto de patologías, debiéndose determinar en este caso los niveles de fibrinógeno.

Fibrinógeno

Para determinar la concentración funcional de fibrinógeno utilizamos el análisis cinético de von Clauss. Este se basa en la relación inversa que existe entre el tiempo de coagulación de un PPP con exceso de trombina y la concentración de fibrinógeno funcional establecida según una curva estándar de plasma normal. La calibración se realiza a partir de varias diluciones diferentes de un plasma normal del que conocemos previamente la concentración de fibrinógeno. Los valores de normalidad de fibrinógeno son de 200-400 mg/dl y pueden elevarse como reactante de fase aguda. La disminución de fibrinógeno se relaciona con hipofibrinogenemias congénitas, hepatopatías, coagulación intravascular diseminada (CID) y disfibrinogenemias. Esta prueba no se ve influenciada por la presencia de heparina. La concentración total de fibrinógeno puede determinarse con estudios no funcionales, que pueden tener interés para diferenciar entre situaciones clínicas de hipofibrinogenemia y disfibrinogenemia. Puede determinarse por medios físicos (precipitación a 56 °C) o inmunológicos.

Recomendaciones y resumen: pruebas de laboratorio de la coagulación

Existen diferencias en los rangos de normalidad para los diferentes test de laboratorio según los reactivos y diferentes tipos de activadores utilizados; por ello es indispensable determinar rangos de referencia específicos en cada laboratorio. También cabe señalar que la variación dentro de un mismo sujeto del TP y TTPa a lo largo del tiempo puede ser de 6 a 12 %.

En vista de las limitaciones de las pruebas de detección, es importante que los resultados se interpreten junto con todos los detalles de historia personal y familiar pertinentes en el momento de la detección de trastornos de la coagulación. Las pruebas de detección normales no siempre excluyen la presencia de estados de deficiencia leve.

ESTUDIO DE TROMBOFILIA

La trombofilia es la tendencia de un individuo a desarrollar episodios trombóticos, venosos o arteriales. Este tipo de estudio incluye la determinación de proteínas inhibitoras de la coagulación (anticoagulantes naturales) y cofactores, el análisis genético de las mutaciones protrombóticas más frecuentes y el diagnóstico del síndrome antifosfolípido (SAF) (6,7):

- Cabe destacar que el estudio de trombofilia requiere una correcta indicación por parte del clínico, y es fundamental seleccionar correctamente a los pacientes de acuerdo con los siguientes criterios:
 - Primer evento trombótico antes de los 50 años.
 - Historia familiar de trombosis.
 - Trombosis recurrentes.
 - Trombosis idiopáticas.
 - Trombosis en localizaciones inusuales.
- No debe realizarse en la fase aguda de la trombosis.
- Se deben descartar procesos concomitantes que modifiquen los resultados.
- Se debe evitar que el paciente esté en tratamiento con antivitaminas K, para ello se debe cambiar el tratamiento a heparina de bajo peso molecular (HBPM).

Proteína C, proteína S y antitrombina

La *proteína C* (PC) inactiva a los factores Va y VIIIa con la ayuda de la *proteína S* (PS) frenando con ello la generación de trombina. La mayoría de las deficiencias de PC son deficiencias de tipo I, con niveles antigénicos disminuidos, pero siendo la proteína funcional, aunque también existe la deficiencia de tipo II, que se caracteriza por niveles antigénicos normales pero niveles funcionales disminuidos. La prueba para el diagnóstico de deficiencias es la proteína C funcional, un ensayo coagulométrico basado en la

prolongación de un tiempo de TTPa realizado en presencia de proteína C activada (APC). El activador de la PC empleado es un derivado de veneno de serpiente. Se consideran normales variaciones entre el 70 y el 130 % de la concentración normal (establecida mediante una curva estándar basada en plasma normal). También se puede medir su actividad funcional por un método colorimétrico basado en la degradación de un sustrato cromogénico específico.

Cuando se diagnostica un déficit congénito de PC, debe completarse con un ensayo antigénico por técnica de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) para establecer si se trata de un déficit de tipo I o de tipo II. También deben realizarse las dos pruebas, antigénica y funcional, si el individuo estudiado es portador de la mutación factor V Leiden (FVL), puesto que esta puede reducir los niveles de PC en el ensayo coagulométrico. La presencia de niveles aumentados de FVIII puede disminuir el resultado del ensayo coagulométrico, mientras que el lupus anticoagulante puede causar niveles aumentados, pudiendo obtenerse un falso resultado normal en presencia de una deficiencia de PC.

La *proteína S* (PS), cofactor de la PC, circula libre en plasma (40 %) o unida a la proteína transportadora de la subunidad C4b del complemento o C4b-BP (60 %). La forma libre es la activa, aunque también puede inhibir de manera indirecta el complejo Xasa (IXa-VIIIa) y protrombinasa (Xa-Va), independiente de su unión al C4b-BP. La prueba para su diagnóstico es la PS libre, un ensayo inmunológico que puede ser realizado por ELISA (colorimétrica) o por aglutinación de látex (turbidimétrica). Se consideran normales variaciones entre el 70 y el 140 % de la concentración normal (establecida mediante una curva estándar basada en plasma normal). Actualmente todavía no se ha conseguido la estandarización del diagnóstico de déficit de PS, y los ensayos disponibles que miden su actividad difieren sustancialmente entre sí, incluso en individuos sanos. Por ello, los ensayos que evalúan la funcionalidad de la PS deben ser usados con cautela. Además, la presencia de la mutación factor V Leiden (FVL) interfiere en varios de estos ensayos funcionales, dando lugar a una infraestimación del nivel de PS y a un diagnóstico de déficit erróneo. Además, la presencia de niveles aumentados de FVIII puede disminuir el resultado del ensayo coagulométrico, mientras que el lupus anticoagulante puede causar falsos niveles aumentados, pudiendo obtenerse un falso resultado normal en presencia de una deficiencia de PS. Existen tres tipos de déficits de PS: la de tipo I, que se caracteriza por la disminución del nivel antigénico y funcional de la PS total y libre, la de tipo II, que se caracteriza por la disminución de la actividad de la PS asociada con niveles antigénicos normales de PS total y libre, y la de tipo III, que se caracteriza por niveles antigénicos y funcionales de PS libre disminuidos pero con niveles normales de PS total.

La *antitrombina* es el principal inhibidor de la trombina y de los factores Xa, IXa y XIa. Para su determinación, la muestra es incubada con un exceso de trombina en presencia

de heparina. La trombina residual es cuantificada por su acción amidolítica con un sustrato cromogénico. La trombina residual medida es inversamente proporcional a los niveles de antitrombina. Se consideran normales variaciones entre el 80 y el 120 % de la concentración normal (establecida mediante una curva estándar basada en plasma normal). Encontraremos descenso de los niveles, por debajo del 60 %, en situaciones de coagulación intravascular diseminada (por consumo), en hepatopatías (ya que su síntesis es hepática), síndrome nefrótico, tratamiento con L-asparaginasa y en casos de déficit congénito de antitrombina, lo que representa el defecto genético que con más intensidad se asocia a la aparición de tromboembolismo venoso. El déficit puede ser de dos tipos: el de tipo I, en el que la proteína está disminuida pero conserva su funcionalidad (es el más frecuente), y el de tipo II, en el que la proteína está en concentración normal, pero es disfuncional. Pueden darse deficiencias adquiridas por defecto de síntesis (insuficiencia hepática, tratamientos con asparaginasa) o por pérdidas excesivas (síndrome nefrótico).

Resistencia a la proteína C activada

Como se indicaba anteriormente, la APC inactiva el FVa y FVIIIa. El diagnóstico de *resistencia a la proteína C activada* se analiza mediante dos TTPa de la muestra previamente diluida con plasma deficiente en FV y un veneno de serpiente específico. La coagulación es activada con calcio en ausencia y presencia de APC. La ratio entre estos dos tiempos de TTPa estima el grado de resistencia. Además, existe una relación lineal entre el riesgo de trombosis y el grado de resistencia. En más del 90 % de los casos, los pacientes que expresan resistencia a la APC son portadores de la mutación del FV c.1691G > A, conocida como FV Leiden (FVL). Con menor frecuencia, también puede observarse una resistencia a la APC en ausencia del FVL pero debido a otra mutación muy poco frecuente (FVHR2 o haplotipo HR2 del FV), o bien en pacientes con niveles elevados de FVIII con anticoagulante lúpico, en mujeres embarazadas o en déficits de proteína S. Finalmente, en un pequeño grupo de pacientes no se llega a identificar la causa de la resistencia a la APC.

Factor V Leiden y mutación 20210A del gen de la protrombina

La mutación c.1691G > A del gen que codifica para el FV (F5), conocida como *factor V Leiden*, produce el cambio de aminoácido Arg506Gln, lo cual impide su reconocimiento por la APC y con ello su inactivación. La presencia de esta mutación conlleva un estado de hipercoagulabilidad en los individuos portadores, lo que está relacionado con un alto riesgo de trombosis. Los heterocigotos presentan un mayor riesgo de tromboembolismo

venoso (TEV) (5-10 %) que los individuos normales, siendo muy superior en los homocigotos (80 %). La presencia de la mutación se puede detectar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación directa del fragmento, mediante el análisis de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) o mediante el uso de sondas específicas de alelo.

La mutación *g.20120G > A* en el gen que codifica para la protrombina (F2) no se localiza en una región codificante sino en la región 3' no traducida. Por ello, no ocasiona ninguna alteración estructural en la proteína, pero sí conlleva un incremento en los niveles plasmáticos de protrombina. La presencia de la mutación se puede detectar con las mismas técnicas de biología molecular que el FVL.

Anticoagulante lúpico

El anticoagulante lúpico (AL) es debido a la presencia de autoanticuerpos dirigidos contra la activación de la protrombina. Paradójicamente, estos pacientes presentan con frecuencia sintomatología trombótica arterial o venosa y excepcionalmente hemorrágica. Sospecharemos la presencia de anticoagulante lúpico ante el alargamiento de los tiempos de coagulación en técnicas dependientes de fosfolípido, concretamente el TTPa. Los reactivos adecuados para detección de AL son los que contienen menor cantidad de fosfolípidos y un activador particulado. Como en todo TTPa, es imprescindible descartar la presencia de heparina en la muestra si está alargado. También podemos realizar el tiempo de veneno de víbora de Russell diluido (DVVRT). Esta técnica se basa en la capacidad que posee el veneno de activar el FX en presencia de iones calcio, FV y fosfolípidos. El DVVRT tiene alta dependencia de los fosfolípidos. Se emplean dos pruebas simultáneas sobre plasma del paciente: DRVVT de *screening* y DRVVT de confirmación, este último rico en fosfolípidos. Los resultados se valoran según la ratio obtenida. En general, resultados > 2 indican que existe presencia de anticoagulante lúpico. Como pruebas confirmatorias de la especificidad antifosfolípido del anticuerpo utilizaremos pruebas que lo neutralicen añadiendo fosfolípidos de estructura hexagonal o plaquetas al medio, lo que acortará el tiempo de coagulación. Se recomienda utilizar al menos dos pruebas de *screening* y una de confirmación.

PRUEBAS DE LABORATORIO DE LA FIBRINOLISIS

Plasminógeno

La actividad del plasminógeno se puede determinar mediante sustratos cromogénicos por su capacidad de activar la plasmina (con estreptocinasa o urocinasas). Si esta es normal,

entonces es poco probable que el paciente tenga deficiencia de plasminógeno. Si la prueba funcional indica una actividad reducida, entonces se pueden realizar pruebas antigénicas para distinguir los trastornos de tipo I (cuando los niveles de actividad y de antígeno se reducen en paralelo) y de tipo II (cuando los niveles de antígeno son normales, aunque los niveles de actividad se reducen) (8).

Los rangos de referencia del plasminógeno son 0,75-1,60 U/ml para la actividad y 150-250 ng/l para el antígeno, pueden variar con la etnia y son mayores en los hombres africanos.

Los niveles de plasminógeno se reducen en el recién nacido, normalizándose a los 6 meses. No presenta variaciones diurnas ni aumenta con el ejercicio, pero sus niveles se incrementan en asociación con infección, traumatismo, inflamación y malignidad.

Se han descrito deficiencias hereditarias de plasminógeno que podrían asociarse con riesgo de trombosis (9).

Las pruebas anormales siempre deben ser verificadas por repetición y la deficiencia no debe ser diagnosticada sobre la base de un único resultado anormal.

Activador tisular del plasminógeno

Los niveles del activador tisular del plasminógeno (t-PA) presentan variación circadiana, son más bajos por la mañana, aumentan durante el día y alcanzan su nivel máximo de actividad por la tarde. La recogida de plasma a pH bajo (aproximadamente pH 6) utilizando tubos Stabilyte® es una forma eficaz de evitar la formación de complejo *in vitro* entre t-PA y su inhibidor el PAI-1, lo que es muy importante si queremos determinar la actividad t-PA.

Se ha descrito una gran variedad de métodos para medir los niveles de t-PA en plasma humano, los ensayos específicos y los ensayos globales no específicos como el tiempo global de la lisis de euglobulinas y el ensayo con placa de fibrina. Los ensayos t-PA específicos incluyen métodos inmunológicos que miden el t-PA antigénico (es decir, tanto t-PA libre como formando complejos con PAI-1), y métodos funcionales. Estos últimos son ensayos cromogénicos que utilizan estimuladores de plasmina y sustratos cromogénicos o bioensayos que utilizan una combinación de anticuerpos monoclonales y sustratos cromogénicos de plasmina.

La concentración basal de t-PA en el plasma de una persona sana en reposo por la mañana es de aproximadamente 5 µg/l cuando se mide con métodos inmunológicos, y aproximadamente de 1 µg/l (o 0,5 IU/ml) si se mide funcionalmente.

Los niveles de t-PA aumentan en respuesta a estímulos tales como ejercicio, estrés mental, oclusión venosa y diversos fármacos (ejemplo desmopresina) (10).

α 2-antiplasmina

La α 2-AP puede determinarse inmunológica o funcionalmente:

- Los ensayos inmunológicos emplean ensayos de ELISA en los que se inmoviliza un anticuerpo contra α 2-AP en la placa para capturar la proteína.
- En los ensayos funcionales se incuba el plasma del paciente con exceso de plasmina. La plasmina es rápidamente inactivada por el α 2-AP y la plasmina residual se mide usando un sustrato cromogénico. El cambio en la absorción es inversamente proporcional a la concentración de α 2-AP.

El rango normal de referencia para adultos es del 80-140 %. La deficiencia hereditaria de α 2-AP es rara y las pruebas de coagulación TP y TTPa son normales. Los pacientes con deficiencias homocigóticas de α 2-AP suelen tener valores < 10 % de lo normal y estos casos presentan hemorragias espontáneas. Los individuos heterocigóticos con niveles de α 2-AP del 30-60 % suelen ser asintomáticos (11,12).

Los recién nacidos sanos a término pueden tener niveles bajos o ligeramente disminuidos de α 2-AP, pero generalmente alcanzan los niveles de adultos al final de la primera semana de vida (9).

Inhibidor del activador tisular del plasminógeno de tipo I (PAI-1)

Los niveles de PAI-1 pueden ser un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular y el riesgo de trombosis posoperatoria y también se ha asociado con el pronóstico en ciertos cánceres (13,14). Sin embargo, su relevancia clínica no se ha establecido, ya que no forman parte de la toma de decisiones terapéuticas o información pronóstica útil en la práctica clínica.

Se detecta mediante ensayos inmunológicos y sustratos cromogénicos. El test ELISA que se emplea normalmente utiliza t-PA funcionalmente activo inmovilizado en la placa de microtitulación. El PAI-1 de la muestra se une al t-PA inmovilizado y luego se cuantifica usando un anticuerpo monoclonal anti-PAI-1 marcado con peroxidasa.

Los ensayos funcionales se basan en la medición de la cantidad de actividad residual de t-PA o urocinasa en una muestra a la que se añade un exceso conocido del activador y un cromógeno para cuantificar la actividad residual de t-PA. El rango de referencia del PAI-1 antígeno es 5-40 ng/ml y de la actividad de PAI-1 < 15 U/ml.

Inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina

El inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina (TAFI, *thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor*) se detecta mediante ensayos inmunológicos (ELISA) funcionales en los que al plasma se añade trombina/trombomodulina para activar el TAFI y se analiza su capacidad de retrasar la lisis del coágulo en presencia de t-PA por cambios en la densidad óptica o se detiene la activación con PPACK (un inhibidor de proteasa) y se mide el TAFIa mediante un sustrato específico (Hippuryl-Arg).

La deficiencia funcional de TAFI puede contribuir al fenotipo de sangrado observado en pacientes con deficiencia de FXI y también puede contribuir a la severidad de la hemorragia en deficientes en FVIII y FIX (15-17). Su papel en la patogénesis de la enfermedad trombótica todavía no está claro.

Los valores normales de TAFI:Ag están entre 5,8-10,0 µg/ml (100-172 nM).

Dímero D

El dímero D se genera cuando la fibrina polimerizada se degrada por acción de la plasmina a diferencia de los productos que se obtienen tras degradación de fibrinógeno (PDF). Existen más de 30 ensayos diferentes para medir el dímero D, pero todos utilizan anticuerpos dirigidos contra el neoepítipo creado por la formación de dímero-D. Es importante recordar que los rangos de referencia varían con la prueba utilizada y no existe un estándar internacional. La concentración de referencia de dímero D es inferior a 0,5 µg/ml.

El rango de referencia/valor de corte del dímero D es mejor establecerlo en el propio laboratorio o, si no es posible, se utiliza un valor de corte publicado en la bibliografía con la misma metodología y preferiblemente del mismo fabricante.

El dímero D se usa principalmente para excluir una trombosis venosa profunda (TVP), es decir, tiene un valor predictivo negativo alto. Sin embargo, por sí solo no se debe utilizar para excluir el diagnóstico de TVP en pacientes con una alta probabilidad clínica previa a la prueba, debiendo realizarse prueba objetiva de imagen (ecografía) (Figura 1).

El dímero D se eleva en numerosas situaciones clínicas y por lo tanto tiene un valor predictivo positivo bajo para TEV. Aumenta en situaciones protrombóticas, tales como CID, embarazo, inflamación, malignidad, traumatismo, cirugía, enfermedad hepática (disminución del aclaramiento) y patologías cardíacas, edad, etc. Se reduce con el tratamiento anticoagulante (indica tratamiento efectivo) y es especialmente bajo en los sujetos deficientes en FXIII, ya que estos presentan alteración de la polimerización de la fibrina.

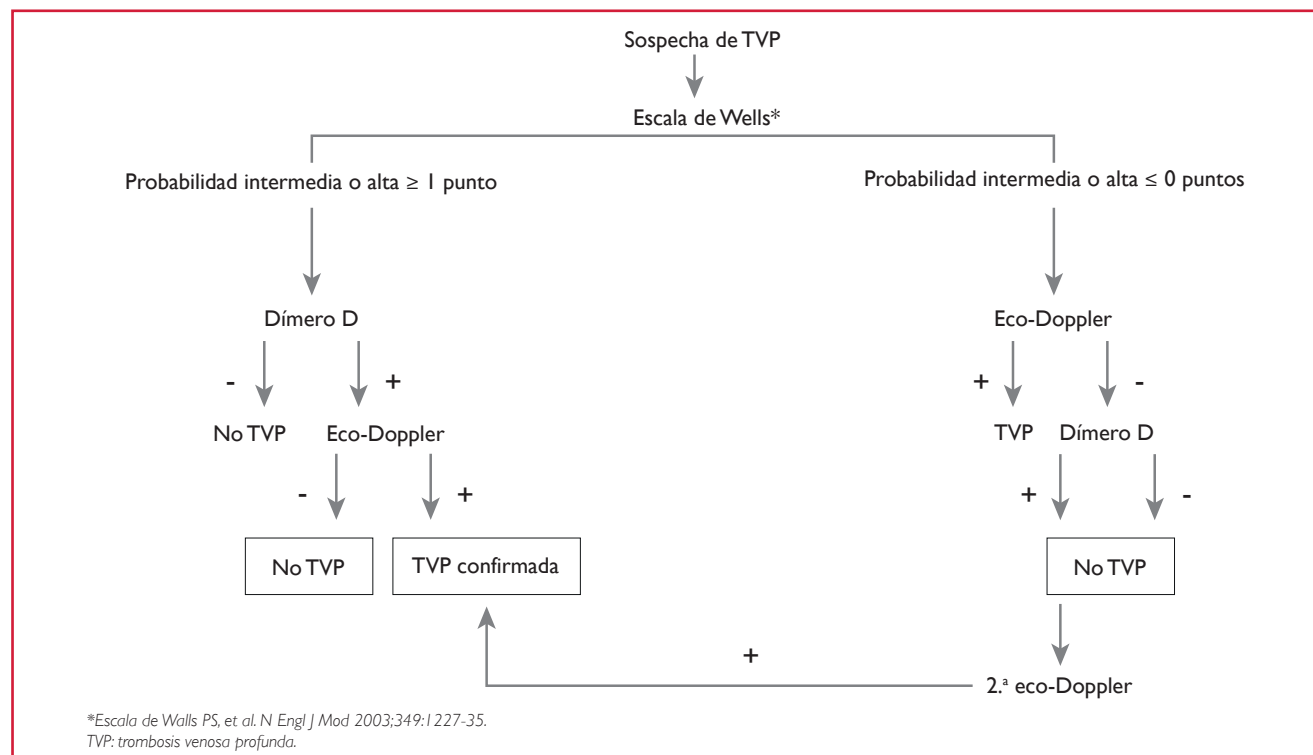


Figura 1. Algoritmo diagnóstico para descartar trombosis venosa profunda.

En pacientes adultos con una probabilidad clínica baja (puntuación de Wells) de desarrollar TVP, un resultado negativo de la prueba de D-dímero da un valor predictivo negativo de 99 % (VPN) en pacientes de 60-80 años, pero solo un 21-31 %VPN en pacientes mayores de 80 años, en los que se sugiere que el punto de corte debe calcularse por la edad $\times 10$ (18).

En pacientes con una probabilidad clínicamente alta de desarrollar TVP, la prueba de D-dímero no tiene esencialmente utilidad clínica; estaría indicada una prueba de imagen confirmatoria.

Tromboelastografía/tromboelastometría

Es un método para medir las propiedades viscoelásticas durante la formación de un coágulo de sangre. A principios de los años noventa se desarrolló un sistema modificado que se denominó "tromboelastometría rotacional" o "ROTEM®", más fácil de operar e interpretar. El ROTEM® permite realizar la prueba fácilmente en un laboratorio central o descentralizado y entregar los resultados de forma rápida y por tanto puede ayudar a mejorar el pronóstico de los pacientes guiando la terapia hemostática y evitando transfusiones innecesarias, sobre todo en situaciones de hemorragia masiva o cirugías de elevado riesgo hemorrágico. También se ha demostrado que el análisis tromboelastométrico y la terapia

guiada son capaces de predecir y ayudar a prevenir eventos tromboembólicos (19).

El tromboelatómetro (ROTEM®) y tromboelastógrafo (TEG) proporcionan curvas e información similar (Figura 2).

Los test incluidos en el ROTEM® se muestran en la tabla III.

Una alteración de la coagulación se determina por un tiempo de coagulación prolongado (CT) que puede deberse a una deficiencia de factor o un efecto de heparina. La comparación de INTEM y HEPTTEM permite confirmar si es un efecto de la heparina. Una alteración en la formación del coágulo se refleja como un tiempo prolongado de formación de coágulos (CFT) y/o una firmeza de coágulos reducida (MCF). Un CFT prolongado, con un MCF normal, indica un trastorno de polimerización, mientras que un MCF reducido con CFT normal indica más bien una deficiencia de sustrato coagulante (fibrinógeno y/o plaquetas) (Figura 3). La fibrinólisis se detecta por lisis del coágulo ($ML > 15\%$) o por una mejor formación del coágulo (CFT más corto, mayor MCF) en APTTEM en comparación con EXTEM.

Test de generación de trombina

Por sus múltiples funciones, la trombina es la molécula "clave" del mecanismo hemostático que incluye actividades procoagulantes

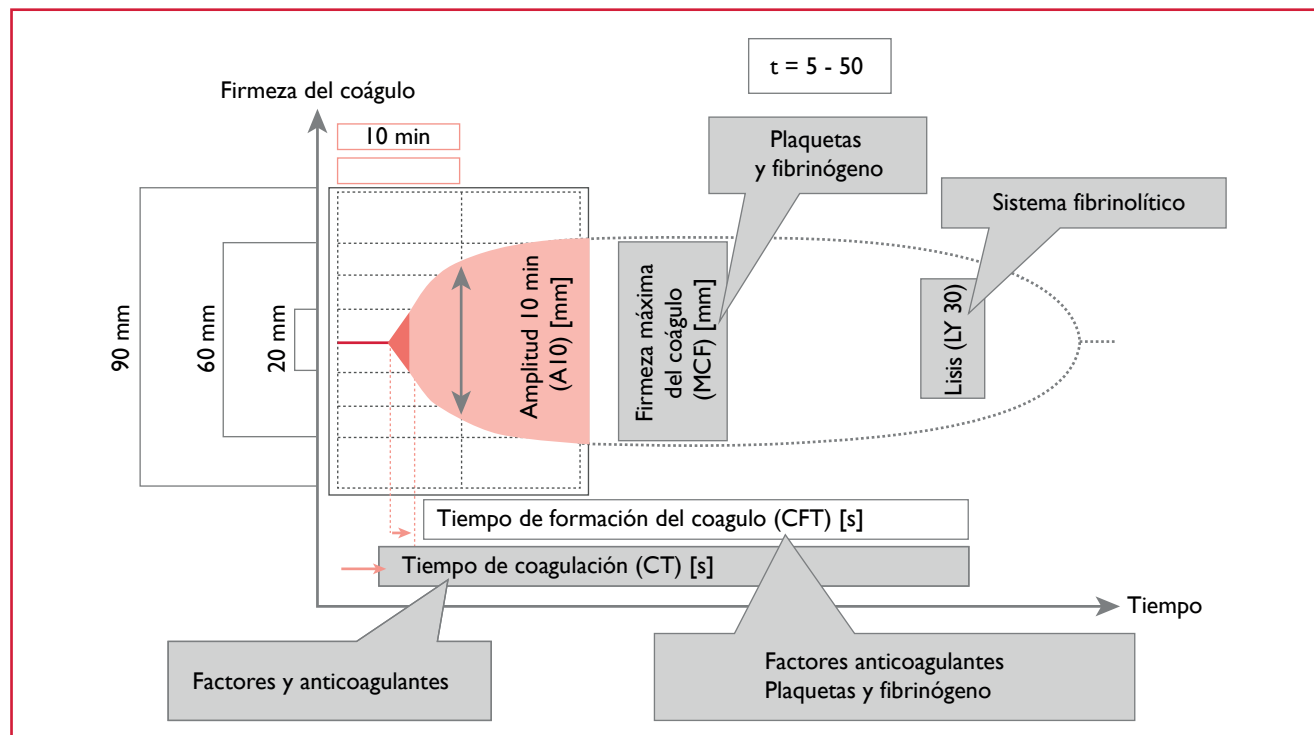


Figura 2. Parámetros principales del ROTEM®.

Tabla III
Test incluidos en ROTEM®

Test	Interpretación
INTEM	Contiene fosfolípidos y ácido elárgico como activadores y proporciona información similar a la TTPa
EXTEM	Contiene factor tisular como activador y proporciona información similar a la del TP
HEPTEM	Contiene heparinasa liofilizada para neutralizar la heparina
APTEM	Contiene atropina para inhibir la fibrinolisis
FIBTEM	Utiliza citocalasina D, inhibidor de plaquetas que bloquea la contribución de las plaquetas a la formación de coágulos, permitiendo el análisis funcional del fibrinógeno
ECATEM	Contiene ecarina y por lo tanto es similar a la Ecarin Clotting Time. Esto hace que sea muy sensible a la presencia de inhibidores directos de trombina

TP: tiempo de protrombina; TTPa: tiempo de tromboplastina parcial activado.

y anticoagulantes. A diferencia de los tiempos de coagulación (TP, TTPa), se trata de un ensayo global de la hemostasia basado en la continua monitorización de la concentración de trombina en formación, a partir de un sustrato fluorogénico de trombina, que genera la curva de trombina (trombograma). Esta curva se compone de diferentes parámetros: tiempo de latencia (fase de iniciación), altura, ancho

y tiempo del pico de trombina, velocidad máxima o pendiente máxima de la curva generada (fase de propagación), concentración total de trombina generada y área bajo la curva (AUC o potencial de trombina endógeno: ETP) (fase de finalización) (Figura 4). El ensayo actualmente disponible, la trombografía calibrada automatizada (CAT), puede ser de utilidad para:

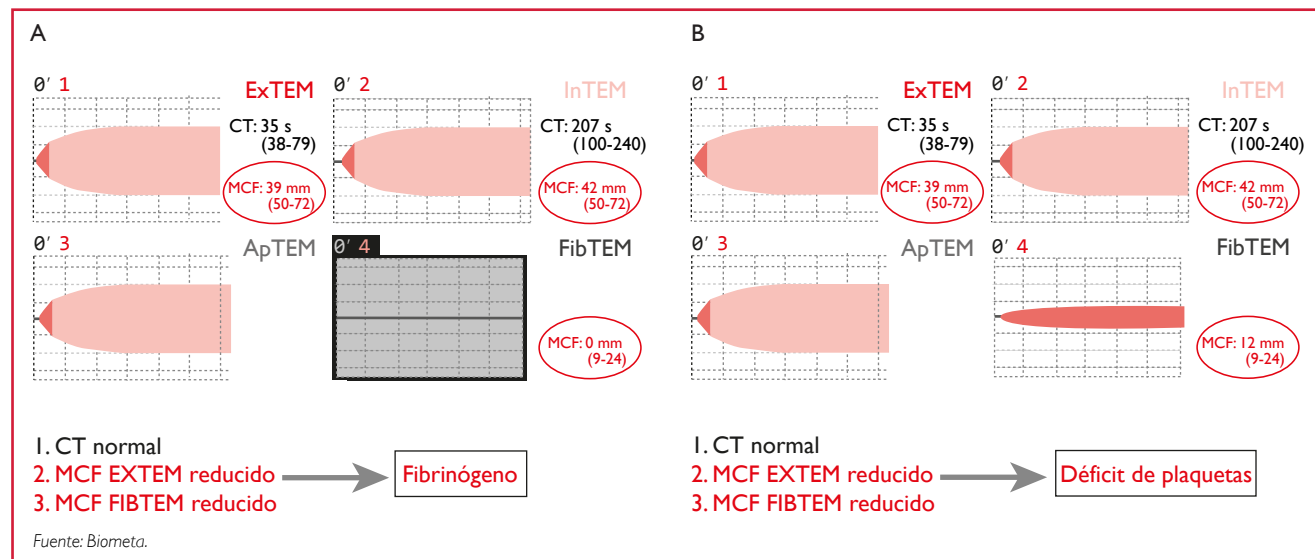


Figura 3. Representación de los resultados del ROTEM®

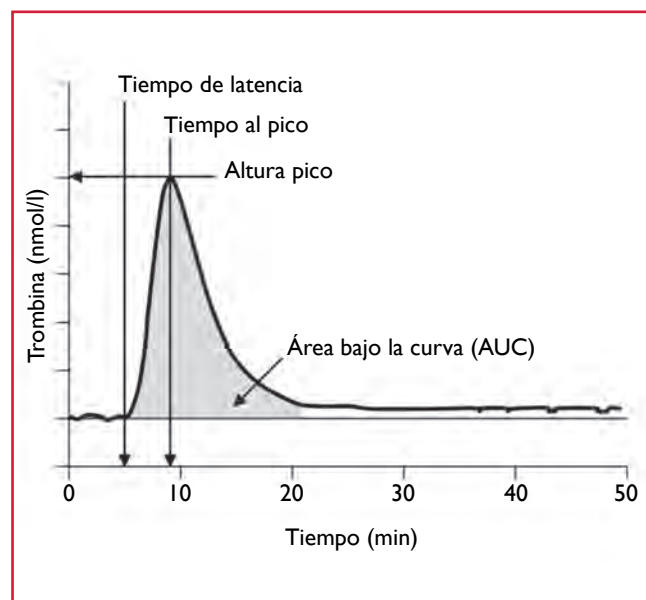


Figura 4. Representación del test de generación de trombina.

- Medir trastornos tromboticos de origen genético o adquirido, como la deficiencia de AT o el uso de anti-coagulantes orales.
- Controlar el tratamiento de trastornos hemofílicos, tales como el tratamiento con factor VIII, factor VIIa.
- Monitorizar el tratamiento de trastornos tromboticos, tales como anticoagulantes (cumarínicos), cualquier heparina (HNF, Fraxiparina®), antiagregantes plaquetarios

(ReoPro®, clopidogrel) o cualquier combinación de los fármacos.

- Obtener una imagen completa de la tendencia trombotica de pacientes con alto riesgo.
- Detectar una trombosis en curso.
- Monitorizar el tratamiento con fármacos prohemostáticos (20).

BIBLIOGRAFÍA

1. Favarolo E J, Funk DMA, Lippi G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis. Lab Medicine 2012;43:1-10.
2. Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Lippi G, Danese E, Gelati M, Montagnana M, et al. Could light meal jeopardize laboratory coagulation tests? Biochem Med (Zagreb) 2014;24:343-9.
3. Lippi G, Salvagno GL, Lima-Oliveira G, Danese E, Favarolo EJ, Guidi GC. Influence of posture on routine hemostasis testing. Blood Coagul Fibrinolysis 2015;26:716-9.
4. Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Lippi G, Montagnana M, Scartezini M, Picheth G, et al. Elimination of the venous stasis error for routine coagulation testing by transillumination. Clin Chim Acta 2011;412:1482-4.
5. Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Danese E, Favarolo EJ, Guidi GC, Lippi G. Sodium citrate blood contamination by K2-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): impact on routine coagulation testing. Int J Lab Hematol 2015;37:403-9.
6. Connors JM. Thrombophilia testing and venous thrombosis. N Engl J Med 2017;377:1177-87.
7. Moll S. Thrombophilia: clinical-practical aspects. J Thromb Thrombolysis 2015;349:367-78.

8. Schuster V, Hügle B, Tefs K. Plasminogen deficiency. *J Thromb Haemost* 2007;5:2315-22.
9. Bugge TH, Flick MJ, Daugherty CC, Degen JL. Plasminogen deficiency causes severe thrombosis but is compatible with development and reproduction. *Genes Dev* 1995;9:794-807.
10. Lethagen S. Desmopressin (DDAVP) and hemostasis. *Ann Hematol* 1994;69:173-80.
11. Miles LA, Plow EF, Donnelly KJ, Hougie C, Griffin JH. A Bleeding Disorder Due to Deficiency of α 2-Antiplasmin. *Blood* 1982;59:1246-51.
12. Carpenter SL, Mathew P. Alpha2-antiplasmin and its deficiency: fibrinolysis out of balance. *Haemophilia* 2008;14:1250-4.
13. Tofler GH, Massaro J, O'Donnell CJ, Wilson PWF, Vasan RS, Sutherland PA, et al. Plasminogen activator inhibitor and the risk of cardiovascular disease: The Framingham Heart Study. *Thromb Res* 2016;140:30-35.
14. Andreasen PA. PAI-1-a potential therapeutic target in cancer. *Curr Drug Targets* 2007;8:1030-41.
15. Wang X, Smith PL, Hsu MY, Tamasi JA, Bird E, Schumacher WA. Deficiency in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) protected mice from ferric chloride-induced vena cava thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 2007;23:41-9.
16. Mosnier LO, Lisman T, van den Berg HM, Nieuwenhuis HK, Meijers JC, Bouma BN. The defective down regulation of fibrinolysis in haemophilia A can be restored by increasing the TAFI plasma concentration. *Thromb Haemost* 2001;86:1035-9.
17. Colucci M, Incampo F, Cannavò A, Menegatti M, Siboni SM, Zaccaria F, et al. Reduced fibrinolytic resistance in patients with factor XI deficiency. Evidence of a thrombin-independent impairment of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor pathway. *J Thromb Haemost* 2016;14:1603-14.
18. Linkins LA, Takach Lapner S. Review of D-dimer testing: Good, Bad, and Ugly. *Int J Lab Hematol* 2017;39:98-103.
19. Wikkelsø A, Wetterslev J, Møller AM, Afshari A. Thromboelastography (TEG) or rotational thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemostatic treatment in bleeding patients: a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Anaesthesia* 2017;72:519-531.
20. Hemker HC, Al dieri R, De Smedi E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost* 2006;96:553-61.