
TEMAS TRATADOS

- ✓ Prueba de tiempo de sangrado
 - ✓ Tiempo de protrombina (TP)
 - ✓ Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPA)
 - ✓ Pruebas de mezcla para la investigación adicional de TP y TTPA anormales
 - ✓ Tiempo de coagulación de la trombina
 - ✓ Tiempo de trombina en presencia de sulfato de protamina para detectar la presencia de heparina
 - ✓ Tiempo de reptilasa
 - ✓ Fibrinógeno (ensayo de Clauss modificado)
 - ✓ Eliminación de la heparina del plasma
-

Prueba de tiempo de sangrado: La prueba de tiempo de sangrado se desarrolló históricamente para evaluar preoperatoriamente la capacidad de los pacientes para mantener un patrón de sangrado normal mientras se someten a procedimientos quirúrgicos importantes, o pacientes que se sospecha que tienen un trastorno hemorrágico debido a la disfunción plaquetaria. Desafortunadamente, se ha confirmado que la prueba es irreproducible e insensible, por lo que, si se debe usar, debe combinarse con una historia clínica y familiar completa, con pruebas de detección de coagulación complementarias, que incluyan recuento de plaquetas y morfología. El PFA 100/200 ha sustituido en gran medida a la prueba del tiempo de sangrado en la evaluación de la función plaquetaria a pesar de sus insuficiencias observadas en pacientes trombocitopénicos (Rodgers y Levin, 2023; Undas, 2023).

El tiempo de sangrado es el tiempo que tarda un corte de piel estandarizado de profundidad y longitud fijas en detener el sangrado. La prolongación del tiempo de sangrado se produce en pacientes con trombocitopenia, enfermedad de von Willebrand (EVW) tipo 3 y tipo 2B, trombastenia de Glanzmann, síndrome de Bernard-Soulier, enfermedad por plasma acumulado almacenado, otros trastornos plaquetarios, sepsis (Williams et al, 2024), enfermedades autoinmunes, deficiencia de vitaminas, anemia grave, neoplasias hematológicas malignas (por ejemplo, trastornos mieloproliferativos que dan lugar a una deficiencia de factor V) y reacción a fármacos (Vinholt et al, 2019). El fibrinógeno es necesario para detener el sangrado, y se ha sugerido un papel para FV. Por lo tanto, el tiempo de sangrado puede prolongarse en pacientes con deficiencia de fibrinógeno o FV. La prolongación del tiempo de sangrado también ocurre en algunos pacientes con enfermedad renal, disproteinemias y trastornos vasculares (Russeau et al, 2023; Bourguignon et al, 2022).

Materiales y equipos:

- ✓ Esfigmomanómetro
- ✓ Hisopos para limpiar
- ✓ Dispositivo de plantilla de tiempo de sangrado
- ✓ Papel de filtro de 1 mm de grosor
- ✓ Cronómetro

Método:

- ✓ El manguito del esfigmomanómetro se coloca alrededor de la parte superior del brazo, se coloca a la altura del corazón y se insufla a 40 mm de mercurio. Esta presión se mantiene durante toda la prueba.
- ✓ Se limpia la superficie dorsal del antebrazo y se coloca firmemente el dispositivo de tiempo de sangrado contra la piel sin presionar. El gatillo se está presionando y el cronómetro se ha puesto en marcha.
- ✓ Deben evitarse las venas superficiales, las cicatrices y los hematomas.

- ✓ A intervalos de 30 segundos, seque el flujo de sangre con papel de filtro. Acerque el papel de filtro a las incisiones sin tocar el borde de la herida.
- ✓ Registre el tiempo desde la punción hasta el cese de la hemorragia.



Figura 2. Diagrama de flujo que demuestra la prueba de tiempo de sangrado. (Tomado de la plantilla de Sally Kim para “Medición de la presión arterial: el método auscultatorio” en biorender.com).

Interpretación: El rango normal en adultos es de 2 a 7 minutos (hasta 8 minutos), pero puede variar según el método utilizado.

Notas: Se debe establecer un rango normal localmente, independientemente del dispositivo utilizado. La incisión debe hacerse en una dirección paralela a la longitud del brazo. Los cortes hechos perpendicularmente sangran por más tiempo. Debe repetirse si se obtiene un resultado anormal. No es necesario registrar los puntos finales si el sangrado continúa más allá de los 20 minutos. Se debe considerar el efecto de los fármacos que interfieren con la función plaquetaria. Por ejemplo, los medicamentos que contienen aspirina pueden causar prolongación en la coagulación. Por lo tanto, siempre que sea posible, no deben tomarse durante los siete días anteriores a la prueba. Existe la posibilidad de cicatrices y, a veces, formación de hematomas en el sitio de las incisiones en el tiempo de sangrado. Esto debe ser puesto en conocimiento de los pacientes antes de realizar la incisión. El tiempo de sangrado en las mujeres embarazadas puede ser engañoso debido a los niveles fisiológicamente elevados de FVIII y FVW. El manguito del esfigmomanómetro en uso debe calibrarse regularmente según las guías de estándares de calidad vigentes. El método de Duke para el tiempo de sangrado tiene una mayor tasa de imprecisión con un mayor riesgo de desarrollo de hematomas (Russeau et al, 2023). Dado que el tiempo de sangrado se realiza a pie de cama, se deben aplicar todos los procedimientos estándar relativos a los requisitos de calidad de POCT para promover la seguridad del paciente (ISO 15189:2022). En caso de que se sospeche que un paciente tiene la enfermedad de Von Willebrand y su laboratorio tenga la capacidad, se deben realizar las siguientes pruebas/ensayos además de obtener un historial completo de sangrado: antígeno de FVW, actividad de FVW, ensayo de FVIII, hemograma completo (incluidos los recuentos de plaquetas y morfología) y pruebas básicas de detección de coagulación (TP, TTPA, TT, fibrinógeno). Estas pruebas/ensayos darían una mejor comprensión de cuál podría ser el diagnóstico clínico en ausencia de tiempo de sangrado o de un laboratorio de coagulación especial capaz de hacer un diagnóstico definitivo de la EVW.

Tiempo de protrombina (TP): El TP evalúa la integridad del sistema extrínseco. Es muy útil en la detección de deficiencias de factores de coagulación que pueden ser cualitativas o cuantitativas de las vías extrínsecas y comunes. También es útil para monitorizar anticoagulantes antagonistas de la vitamina K (AVK) como la warfarina, y detectar enfermedad hepática, deficiencia de vitamina K, deficiencia de FX por amiloidosis, coagulación intravascular diseminada (CID), presencia de anticoagulantes orales directos (ACOD) de forma dosis-dependiente o anticuerpos contra factores de la vía extrínseca. Estas condiciones

pueden prolongar los resultados de la prueba de TP (Dorgalaleh et al, 2021). La TP es sensible a los cambios en los factores V, VII y X, y menos al FII (protrombina). No es adecuado para detectar cambios menores en el nivel de fibrinógeno, ya que los resultados pueden ser anormales si el nivel de fibrinógeno es muy bajo o si hay un inhibidor presente. La sensibilidad de la prueba está influenciada por los reactivos y la técnica utilizada, y es importante establecer un rango de referencia localmente. La vía medida por TP se muestra en la Figura 3. El reactivo TP, a menudo denominado tromboplastina, contiene factor tisular y fosfolípidos. Hay muchos reactivos adecuados disponibles en el mercado.

Reactivos:

- ✓ Tromboplastina (puede contener cloruro de calcio)
- ✓ Cloruro de calcio 25 mM (necesario solo si el reactivo de tromboplastina no contiene calcio)

Método: La técnica manual del tubo basculante se describe en la Parte 4 de este manual. Se deben seguir las recomendaciones del fabricante del reactivo. Cuando se utiliza un nuevo reactivo de tromboplastina que tiene un número de lote diferente al anterior, se debe trazar una nueva curva de calibración.

Interpretación: Los tiempos de coagulación normalmente se ven influenciados por el uso de diferentes coagulómetros, dependiendo de cómo y cuándo se detecta el punto final. Esto enfatiza aún más la importancia de establecer rangos normales para el método actualmente en uso en el laboratorio y basados en la población local. En presencia de deficiencias leves de factor II, V, VII o X, el grado de prolongación puede ser mínimo. En el caso de deficiencia de FII, el TP puede estar dentro del rango normal. Algunos reactivos de TP pueden verse afectados por la presencia de anticoagulantes lúpicos/anticuerpos antifosfolípidos, y algunos tipos raros de anticuerpos pueden prolongar el TP sin ninguna prolongación del TTPA. Los reactivos con concentraciones más bajas de fosfolípidos tienen más probabilidades de verse afectados, incluidos algunos reactivos que se construyen mediante la lipidación del factor tisular recombinante. La presencia de FVII activado, ya sea después de la terapia con FVIIa recombinante o cuando se ha activado el FVII nativo, puede acortar el TP. El efecto depende del reactivo de factor tisular utilizado. Los reactivos que contienen factor de tejido bovino son particularmente susceptibles a este efecto (Kitchen et al, 1992). La sangre entera para la determinación de la TP puede ser estable durante al menos 24 horas, dependiendo del reactivo utilizado (Baglin y Luddington, 1997). Los TP determinados con reactivos que contienen factor tisular humano pueden ser diferentes de los obtenidos con reactivos que contienen factor tisular de otras especies, como el conejo. En tales casos, el resultado obtenido con los reactivos de factor tisular humano puede ser más indicativo de riesgo de sangrado. Para obtener una discusión completa de los problemas relacionados con la determinación de TP, lea las guías actuales del CLSI sobre TP y TTPA de una etapa (2023).

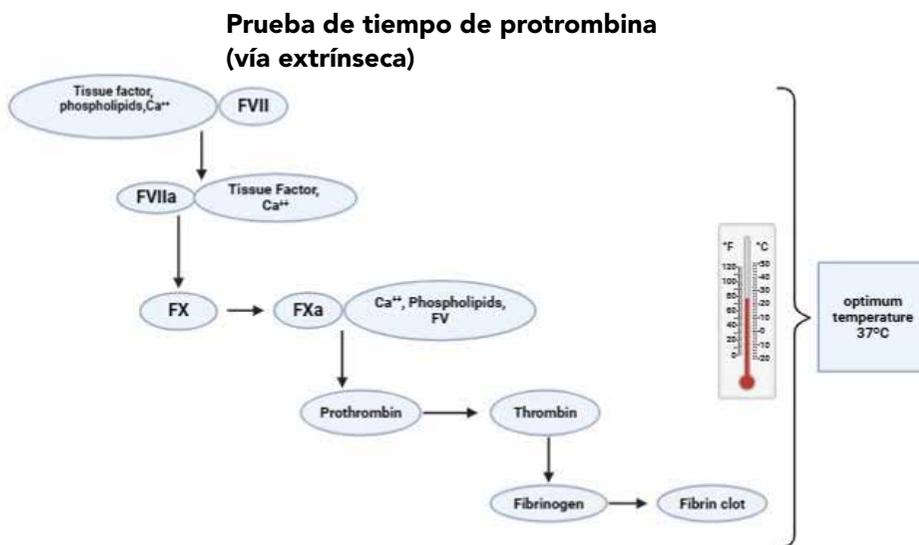


Figura 3. Vía medida por la prueba TP

Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA): se trata de un ensayo basado en la formación de coágulos que ayuda a identificar deficiencias de factores de coagulación o inhibidores de las vías intrínsecas y comunes. Tomada junto con un tiempo normal de protrombina, es la prueba de cribado más útil para detectar deficiencias de los factores VIII, IX, XI y XII. El TTPA también se prolongará en cualquier deficiencia que involucre las vías comunes (deficiencias de los factores V, X y II, y fibrinógeno) y en presencia de inhibidores. La presencia de algunos inhibidores terapéuticos de la coagulación, como la heparina, también prolongará el TTPA. Es importante excluir la posibilidad de que dichos tratamientos se hayan empleado en la investigación inicial de los TTPA prolongados. El TTPA se prolonga en presencia de deficiencia de PK o HMWK, a menos que la prueba se realice utilizando un reactivo que contenga ácido elálgico como activador (Turi, 1986). En ese caso, el TTPA será normal, incluso en ausencia total de estos factores. Es aconsejable tener en cuenta que cada laboratorio debe determinar sus rangos normales de TTPA en función de la población local, el tipo de reactivo de TTPA y el coagulómetro en uso. El reactivo TTPA contiene fosfolípidos diluidos y activadores de contacto como sílice, ácido elálgico y caolín. Esto se añade al plasma citratado pobre en plaquetas a 37 °C. Esta mezcla se incuba a 37 °C durante un tiempo específico para permitir que se produzcan los factores de contacto, luego la adición de cloruro de calcio conduce a la formación del coágulo de fibrina. El tiempo que se tarda en formar un coágulo se registra en segundos. La vía medida por el TTPA se muestra en la Figura 4.

Reactivos:

- ✓ Reactivo TTPA
- ✓ Cloruro de calcio 25mM

Método: La técnica manual del tubo basculante se describe en la Parte 4 de este manual. Se deben seguir las recomendaciones del fabricante del reactivo.

Interpretación: Un rango normal siempre debe establecerse localmente. Un TTAP prolongado con un TP normal indica una posible deficiencia de los factores VIII, IX, XI, XII, HMWK, PK o la presencia de un inhibidor. En los casos de un TTPA prolongado, se debe analizar una mezcla igual de plasma normal y de prueba (es decir, una mezcla de 1 parte de plasma de prueba por 1 parte de plasma normal, llamada mezcla 50:50, como se indica abajo). Si el TTPA corrige en más del 50% la diferencia entre los tiempos de coagulación del plasma normal y el del plasma de prueba, se indica una deficiencia del factor (los detalles se describen en el tema específico a continuación). Una mala corrección sugiere un inhibidor, posiblemente de uno de los factores de coagulación del sistema o de tipo inespecífico, como el anticoagulante lúpico.

Tabla 7. Un ejemplo de interpretación de la TTAP prolongad

Muestra	Resultado
Control TTPA	35 segundos
Prueba	60 segundos
Si la mezcla 50:50	42 segundos (esta es una buena corrección, por lo que probablemente haya una deficiencia de factores)
Si la mezcla 50:50	52 segundos (esta es una mala corrección, por lo que es probable que haya un inhibidor presente)

Investigación del TTPA prolongado aislado: Para los pacientes con un TP normal y un TTPA prolongado, la secuencia normal de investigación a seguir es:

- ✓ Determinar el tiempo de trombina. Si es normal, proceda a seguir los pasos. Si el tiempo de trombina es prolongado, repetir en presencia de sulfato de protamina. Si el tiempo de trombina se corrige a la normalidad, esto sugiere que hay heparina presente, y no se requieren pruebas adicionales a continuación. Si no se sabe que el paciente está recibiendo heparina de ningún tipo, se debe solicitar una muestra repetida.

- ✓ Determinar el TTPA en mezclas de plasma normal y de paciente utilizando una mezcla 1:1 (50%) de normal:paciente. El hecho de que la mezcla al 50% no corrija el TTPA a la normalidad puede indicar la presencia de un inhibidor (los detalles se describen más abajo).
- ✓ Determinar el TTPA con un segundo reactivo que contenga fosfolípidos de alta concentración, como la actina FS (Dade Behring). Si el TTPA inicial se prolonga claramente (al menos tres segundos por encima del límite superior de uso normal) y la actina FS es normal, entonces el anticoagulante lúpico es la causa probable. Esto puede confirmarse posteriormente mediante pruebas específicas como el tiempo de envenenamiento de la víbora de Russell diluido, aunque normalmente no es necesario en ausencia de cualquier requisito para investigar un posible anticoagulante lúpico como factor de riesgo para la trombosis. En muy raras ocasiones, la deficiencia de PK es la otra causa posible de TTPA normal con actina FS y prolongación marcada de la TTPA con un reactivo que utiliza sílice o caolín como activador. Como la mayoría de los casos de anticoagulante lúpico, este no se asocia con ningún riesgo de sangrado. Por lo tanto, nuevamente, es posible que no se requiera confirmación. Cuando el TTPA inicial es claramente prolongado (tres o más segundos) y el TTPA de actina FS es normal, no es necesario realizar ensayos factoriales.
- ✓ Si ambos TTPA se prolongan, realice ensayos con FVIII:C, FIX y FXI. Se puede realizar un ensayo FXII si es necesario, ya que la deficiencia es relativamente común y la detección de esta puede explicar la prolongación del TTPA. Esto no es necesario para excluir la presencia de un trastorno hemorrágico, ya que la deficiencia de FXII no se asocia con un mayor riesgo de sangrado.
- ✓ Los reactivos como la actina FS, que emplean ácido elálgico como activador de contacto, se asocian con resultados normales en presencia de una deficiencia incluso grave de PK.

Notas: Hay muchos reactivos adecuados disponibles en el mercado. Estos incluyen materiales con diferentes sensibilidades. En cuanto a la TP, los tiempos de coagulación pueden verse influenciados por el uso de un coagulómetro. Históricamente, la investigación ha demostrado que hay mucha variabilidad en las pruebas de TTPA, como se observa en la variación de los resultados de diferentes reactivos, las variaciones de los resultados de diferentes coagulómetros y la variación de los resultados de las pruebas de muestras similares en diferentes laboratorios. Esta evidencia lleva a la necesidad de adherirse al establecimiento de rangos normales locales para coagulómetros específicos y reactivos TTPA. Dentro de los plasmas de prueba, los niveles altos de un factor de coagulación pueden compensar los niveles más bajos de otros factores. Por ejemplo, un FVIII marcadamente elevado durante la reacción de fase aguda puede conducir a un TTPA normal en presencia de reducciones de FIX o FXI, lo que podría ser clínicamente importante. Si un paciente tiene los antecedentes personales o familiares apropiados que sugieren un trastorno hemorrágico, puede estar justificado realizar investigaciones adicionales, incluidas pruebas de factores específicos, en presencia de un TTPA normal, particularmente si el resultado se encuentra en la parte superior del rango de referencia. La concentración de fosfolípidos varía notablemente entre los reactivos. Esta es una de las razones por las que los reactivos varían considerablemente en su sensibilidad a la presencia de anticoagulantes lúpicos. Si se utiliza un reactivo sensible al lupus para el TTPA inicial, es útil realizar un segundo TTPA utilizando un reactivo como Actin FS (Dade Behring, Marburgo, Alemania), que tiene una concentración de fosfolípidos muy alta (Kitchen et al, 1999). Si la prolongación con el primer reactivo es causada por un anticoagulante lúpico, entonces el segundo TTPA es casi siempre normal, ya que muy pocos anticoagulantes lúpicos prolongan el TTPA cuando se usa Actina FS.

Un TTAP normal con FS de actina, combinado con un TTAP inicial prolongado, normalmente excluye la presencia de deficiencia de FVIII, FIX o FXI, y en este caso, no hay necesidad de ensayos factoriales. En raras ocasiones, puede producirse un TTPA normal con cualquier reactivo cuando FIX o FXI se reducen ligeramente (30 a 50 U/dl) y el FVIII está marcadamente elevado. El TTPA con actina FS suele ser normal cuando el FXII se reduce en el rango de 20 a 50 U/dl y el TTPA con activación a base de caolín o sílice está ligeramente elevado. Este defecto no tiene relevancia clínica. Unos pocos anticoagulantes potentes contra el lupus prolongan el TTPA con actina FS. Los anticuerpos específicos contra FVIII, FIX o FXI prolongan el TTPA, independientemente del reactivo. Para un análisis completo de las cuestiones relacionadas con la determinación de la TTPA, véase CLSI (2023).

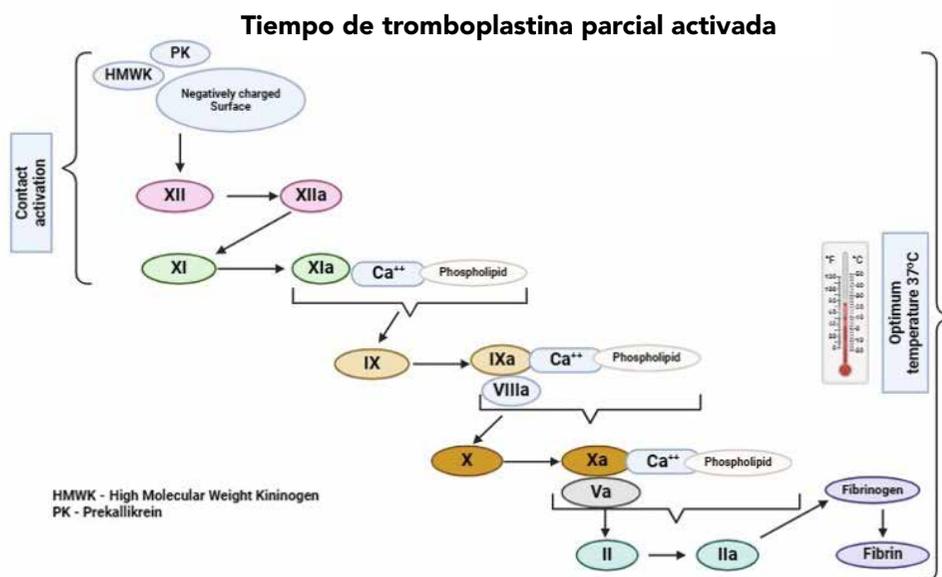


Figura 4. La vía medida por TTPA

Pruebas de mezcla para una investigación adicional de TP y TTPA anormales: Las pruebas de mezcla se realizan en gran medida cuando el TP o TTPA basal es prolongado, y es necesario identificar la causa de la prolongación para que se puedan realizar pruebas adicionales para llegar a un diagnóstico. Se ha identificado mucha variabilidad en la forma en que se realizan e interpretan las pruebas de mezcla. El conocimiento sobre el comportamiento de las deficiencias de factores e inhibidores en los estudios de mezcla es primordial, además de los factores que pueden influir en el rendimiento e interpretación de las pruebas de mezcla (Figura 5) (Favaloro, 2020; Adcock et al, 2023). El plasma del paciente y la PNP se mezclan en porciones iguales (es decir, 50:50) y la prueba previamente prolongada se realiza en esta mezcla. Se deben utilizar los controles apropiados (PNP mezclado con plasma que contiene inhibidor y PNP mezclado con plasma que contiene una deficiencia de factor). Existen varios métodos de interpretación y cada laboratorio debe establecer sus rangos de corte. Además, cada laboratorio debe establecer los intervalos de referencia normales para la TP y la TTPA en función de la población local para guiar la interpretación precisa de los resultados (Adcock et al, 2023).

Procedimiento:

- ✓ Mezclar porciones iguales de PNP y plasma del paciente (50:50) y preparar para la prueba previamente prolongada (en este caso se aplicará TTPA).

Si se corrige el resultado de TTPA obtenido de la mezcla normal de control y plasma del paciente en comparación con el resultado original de TTPA prolongado, se pueden realizar pruebas de mezcla adicionales para identificar el factor que es deficiente en el paciente. Se puede realizar un segundo lote de pruebas de mezcla utilizando un tubo que contiene una mezcla de plasma del paciente y plasma deficiente en FVIII en porciones iguales, y un segundo tubo que contiene una mezcla igual de plasma deficiente en FIX con el plasma del paciente. Se realiza una prueba TTPA en ambas mezclas. El resultado de TTPA que muestra una corrección indica una deficiencia de FVIII o FIX (Tabla 8).

Estas dos mezclas solo se realizan si la historia clínica del paciente es sugestiva de una deficiencia intrínseca del factor de la vía en laboratorios que no tienen la capacidad de realizar ensayos factoriales.

Interpretación de las pruebas de mezcla: Si el TTPA corrige en más del 50% la diferencia entre los tiempos de coagulación del plasma normal y el de prueba, se indica una deficiencia del factor, como se ha comentado anteriormente. Una mala corrección sugiere un inhibidor, posiblemente de uno de los factores de

coagulación del sistema o de tipo inespecífico, como el anticoagulante lúpico. También podemos utilizar el porcentaje de cálculo (%) de corrección para la interpretación de la prueba de mezcla, como se muestra a continuación.

$$\text{(\% Corrección)} = \frac{(\text{TTPA del paciente} - \text{TTPA de la mezcla})}{(\text{TTPA del paciente} - \text{TTPA NPP})} \times 100$$

Corrección = % el valor está por encima o igual al punto de corte establecido localmente

Sin corrección = % el valor está por debajo del valor de corte establecido localmente



Figura 5. Diagrama desarrollado en biorender.com utilizando información obtenida de Adcock et al. (2023).

Como se destaca en Adcock et al (2023), hay varios factores que influyen en la precisión de las pruebas de mezcla. Un factor importante es conocer el historial clínico y de medicación del paciente. Otros factores importantes incluyen si la recolección de la muestra se llevó a cabo según los estándares aceptados, si el paciente tiene antecedentes de una deficiencia de factor, el tipo de reactivos utilizados y su sensibilidad (especialmente a las deficiencias leves de factor e inhibidores), el establecimiento de intervalos de referencia normales para las pruebas de detección con muestras normales de la población local, la preparación del plasma normal del grupo y los niveles de concentración de factores de coagulación (al menos 80%). y si los inhibidores específicos o inespecíficos son de naturaleza endógena o exógena. Una mejor comprensión de estos factores mejorará la capacidad de los laboratorios para interpretar correctamente los resultados de las pruebas de mezcla.

Plasma deficiente en FVIII/FIX para estudio de mezcla: El plasma de pacientes con deficiencia severa aislada (<1 UI/dl) de FVIII o FIX es muy útil para estudios de mezcla. El plasma seleccionado para este propósito debe tener un TP normal, lo que confirma que es probable que los otros factores de coagulación sintetizados en el hígado estén en niveles normales. Dichos plasmas pueden liofilizarse para su almacenamiento a largo plazo o almacenarse como plasma a -35 °C (o menos) durante al menos tres meses. Mediante el uso de mezclas 50:50 de aditivo y plasma del paciente, se puede caracterizar una anomalía. En situaciones en las que hay una prolongación aislada del TTPA, es preferible el plasma deficiente en FVIII al plasma envejecido. Del mismo modo, el plasma deficiente en FIX es preferible al plasma adsorbido.

Es ético obtener el consentimiento informado del paciente antes de obtener una muestra para su uso en pruebas de mezcla. Se debe establecer un estado negativo del inhibidor antes de recolectar muestras para las pruebas de mezcla.

Tabla 8. Patrón de mezcla de los resultados de las pruebas en presencia de deficiencias de factores individuales

Defecto en el plasma de prueba	TTPA	FVIII- deficiente	Deficiente en FIX	Plasma normal
FVIII	Anormal	No corregido	Corregido	Corregido
FIX	Anormal	Corregido	No corregido	Corregido
FXI/FXII	Anormal	Corregido	Corregido	Corregido
Inhibidor	Anormal	No corregido	No corregido	No corregido

Defecto en el plasma de prueba	TP	TTPA	Plasma normal
FII	Anormal	Anormal	Corregido
FV	Anormal	Anormal	Corregido
FVII	Anormal	norma	Corregido
FX	Anormal	Anormal	Corregido

Notas: La muestra de coagulación debe contener un recuento de plaquetas de $<10 \times 10^9/l$ para proporcionar un contenido mínimo de fosfolípidos y permitir la detección de anticoagulantes lúpicos débiles (Toulon et al, 2016). Los estudios de mezcla solo deben realizarse en el mismo plasma del que se ha obtenido un resultado prolongado. Si por alguna razón se extrajo una nueva muestra del paciente, se debe repetir la prueba de referencia anormal antes de realizar la prueba de mezcla. La validación y verificación de nuevos reactivos con nuevos números de lote siempre debe realizarse para garantizar que la sensibilidad del reactivo a los inhibidores y las deficiencias de factores siga estando en el rango aceptable (Toulon et al, 2016). Todas las muestras de coagulación deben recogerse como se describe en la Parte 3 de este manual. Los inhibidores inespecíficos que afectan al TTAP (p. ej., anticoagulante lúpico) generalmente no muestran corrección, aunque los plasmas que contienen inhibidores más débiles o de título bajo pueden corregirse parcialmente con plasma normal.

Inhibidores específicos contra el FVIII: Los inhibidores específicos contra el FVIII pueden estar asociados con la falta de corrección inmediata de la TTPA tras la adición de plasma normal. En otros casos, se produce una corrección inmediata por plasma normal, seguida de un alargamiento de la TTPA en la mezcla con el tiempo. Después de una hora a 37 °C, se debe analizar una mezcla de plasma de prueba y normal, junto con determinaciones de TTPA en plasmas normales y de prueba que se hayan incubado por separado al mismo tiempo. Los inhibidores específicos contra otros factores de coagulación son particularmente raros, pero pueden ocurrir. No es posible generalizar su comportamiento en experimentos de mezcla, excepto que los inhibidores de FIX suelen ser de acción rápida. La Figura 6 muestra cómo cambia el TTPA cuando se agrega un 20% y un 50% de PNP a muestras de sujetos con hemofilia A adquirida con anticuerpos anti-FVIII. El límite superior del rango normal para este método TTPA fue de 37 segundos. Este ejemplo ilustra que, en presencia de anticuerpos anti-FVIII, puede haber una corrección completa en una combinación 50:50 de paciente y PNP en algunos casos. Si estas mezclas se incuban a 37°C, se produce un aumento progresivo del TTPA, ya que los anticuerpos anti-FVIII inhiben el FVIII. El ensayo Nijmegen Bethesda es la prueba "estándar de oro" en la cuantificación de inhibidores presentes en una muestra de plasma después de un cribado positivo. El ensayo cromogénico de Bethesda es la prueba de elección para evaluar los inhibidores en pacientes tratados con emicizumab, ya que se sabe que los resultados del cribado de inhibidores basados en TTPA se acortan en los pacientes tratados con emicizumab (Lowe et al, 2020). Otros inhibidores de los factores de coagulación, como los inhibidores de FXa, se pueden detectar mediante un ensayo de actividad anti-FXa.

Tabla 9. Estudios mixtos en hemofilia A adquirida

Título de Bethesda (U/ml)	TTPA (segundos)	TTPA + 20% plasma normal (segundos)	TTPA + 50% plasma normal (segundos)
1.0	210	137	77
1.1	83	52	38
2.0	82	43	34
6.6	107	51	37
8.4	150	55	39
21	145	62	48
23	123	127	55
120	69	50	38

Tiempo de coagulación de la trombina: El tiempo de coagulación de la trombina (también conocido como tiempo de trombina) es útil para identificar anomalías hereditarias del fibrinógeno, así como anomalías cuantitativas o cualitativas adquiridas. Se sabe que el tiempo de trombina es muy sensible a la presencia de heparina o fármacos como los inhibidores directos de la trombina (IDT) (Bonar et al, 2017). El tiempo de trombina refleja la reacción entre la trombina y el fibrinógeno. Se prolonga cuando el nivel de fibrinógeno es muy bajo (menos de 1,0 g/l); en presencia de heparina, sustancias similares a la heparina, IDT u otros inhibidores (por ejemplo, fibrina/productos de degradación de fibrinógeno [FDP por su sigla en inglés]); y cuando el fibrinógeno es cualitativamente anormal (disfibrinogenemia), incluyendo defectos congénitos y adquiridos secundarios a enfermedad hepática (Mackie et al, 2024).

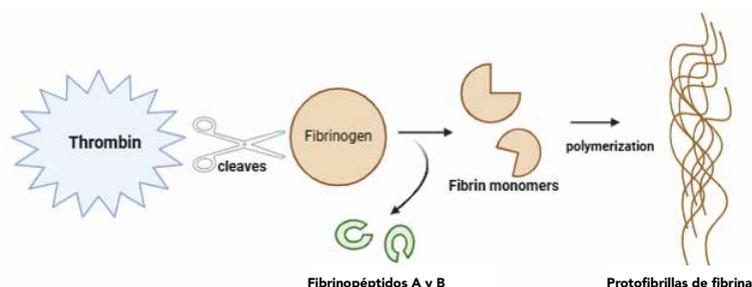


Figura 6. Diagrama de flujo que representa la conversión de fibrinógeno en fibrina en presencia de trombina. Desarrollado con Biorender.

Reactivos:

- ✓ Solución de trombina, que induce la coagulación del plasma normal en unos 15 segundos.
- ✓ Las soluciones más fuertes producen tiempos de coagulación más cortos y pueden ser normales en presencia de defectos leves.

Hay varios reactivos de trombina que están disponibles comercialmente. Algunos tienen dos niveles de diluciones de detección del reactivo de trombina con la solución amortiguadora, y una tercera concentración de reactivo de trombina para muestras con un alto contenido de heparina que sugiere que el paciente está en tratamiento con heparina. Como de costumbre, se recomienda seguir las instrucciones del fabricante y el laboratorio debe establecer rangos de referencia normales locales.

Método: El método manual del tubo basculante se describe en la Parte 4 de este manual. Se deben seguir las recomendaciones del fabricante del reactivo.

Notas: La concentración de trombina utilizada debe ser la que dé un tiempo de coagulación de alrededor de 15 segundos con PNP (control). Si se utiliza trombina concentrada, debe diluirse a alrededor de 10 a 15 U/ml en solución salina y se diluye según sea necesario, hasta obtener el tiempo de control adecuado.

Para todos los reactivos de trombina adquiridos comercialmente, se deben seguir las instrucciones del fabricante sobre la reconstitución, el uso y el almacenamiento. La trombina reconstituida puede almacenarse a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ o menos y diluirse antes de su uso. La trombina diluida mantenida a temperatura ambiente se deteriorará. Se debe incluir un control PNP con cada grupo de pruebas. Las muestras de plasma para determinar el tiempo de trombina deben analizarse dentro de las 4 horas posteriores a la recolección de la muestra y dentro de las 2 horas si se sospecha la presencia de heparina. Los niveles altos de heparina en una muestra de paciente que se está analizando para determinar el tiempo de trombina conducirán a la falta de formación de coágulos. Esto también es posible con algunos DTI (Inhibidor Directo de la Trombina por su sigla en inglés), como el dabigatrán. Utilice la prueba de tiempo de reptilasa para confirmar la presencia de DTI o contaminación/presencia de heparina en la muestra del paciente. Ha habido variación en los resultados de los métodos de tiempo de trombina en función del tipo de reactivos y el instrumento de coagulación utilizado, por lo que se recomienda que el resultado de cada paciente se reporte junto con un rango de referencia específico para ese reactivo e instrumento.

Tiempo de trombina en presencia de sulfato de protamina para detectar la presencia de heparina:

La presencia de HNF puede causar una prolongación del tiempo de trombina. Las formas más grandes de heparina, que prolongan el tiempo de trombina, pueden neutralizarse mediante la adición de sulfato de protamina. El sulfato de protamina está disponible en muchas farmacias hospitalarias, donde se utiliza como agente terapéutico para revertir el efecto de la heparina. La concentración de fármaco en las preparaciones terapéuticas es normalmente mucho más alta de lo que es útil para las pruebas de laboratorio. Por lo tanto, si es necesario, el medicamento debe diluirse en solución salina a una concentración de 40 mg% como solución de trabajo. Se prepara una solución de trabajo de trombina con sulfato de protamina mezclando nueve partes de reactivo de trombina con una parte de 40 mg de sulfato de protamina. A continuación, se utiliza en lugar de la solución de trombina. Se debe analizar el control normal. Si el tiempo de trombina se prolonga, pero se corrige dentro de los dos segundos posteriores al resultado del control, se confirma la presencia de heparina.

Reactivos (Hogwood et al, 2017):

- ✓ Solución amortiguadora de barbitona pH 7,4 (Fritsma, 2019)
- ✓ Solución madre de sulfato de protamina: use 5 ml de 10 mg/ml de sulfato de protamina para hacer una dilución de 1/20 con solución amortiguadora de barbitona. A partir de esta solución se pueden preparar diluciones en serie de varias concentraciones de sulfato de protamina. Permanecen estables cuando se almacenan a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- ✓ PPP del paciente
- ✓ Trombina

Método:

- ✓ Diluir en serie el sulfato de protamina en solución amortiguadora de barbitona.
- ✓ Prepare la trombina diluida con solución amortiguadora de barbitona. Cuando se añaden 100 μl de la trombina diluida a 200 μl de plasma del paciente en solución amortiguadora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, debería permitir la formación de coágulos a 10 segundos.

Interpretación: Si el coágulo se forma en 10 segundos, no hay HNF presente en el plasma del paciente. Si el tiempo es prolongado, hay HNF en el plasma del paciente. El plasma del paciente se mezcla con sulfato de protamina diluido y se vuelve a realizar la prueba. El objetivo es medir el tiempo de trombina en diferentes diluciones de plasma de pacientes y sulfato de protamina que permiten la formación de coágulos dentro de un rango normal.

Tiempo de reptilasa: La reptilasa es un veneno de serpiente obtenido de *Bothrops atrox*. Es una enzima similar a la trombina conocida como batroxobina que actúa escindiendo el fibrinógeno para formar fibrinopéptido A, lo que lleva a la formación de un monómero de fibrina y a la formación de coágulos por polimerización. No es inhibida por la antitrombina, por lo que no se ve afectada por la presencia

de heparina o DTIs. Por lo tanto, se puede utilizar para evaluar la tasa de conversión de fibrinógeno en fibrina en presencia de heparina y DTI (Mackie et al, 2024). Es útil comprobar si un tiempo prolongado de trombina está causado por la presencia de heparina o DTI en la muestra. Si el tiempo de trombina es prolongado y la reptilasa es normal, la causa más probable es la presencia de heparina o un DTI. En presencia de disfibrinogenemia, el tiempo de reptilasa puede ser más sensible (es decir, más prolongado) que el tiempo de trombina. La reptilasa añadida al plasma del paciente (PPP) produce batroxobina que escinde el fibrinógeno liberando fibrinopéptido A para formar un monómero de fibrina con formación de coágulos después de la polimerización (Karapetian, 2013).

Reactivos: Reptilasa (Sigma Aldrich, código V5375) disuelta a una concentración de 25 mg en 15 ml de solución amortiguadora de Owren. Este veneno crudo es peligroso y se debe tener cuidado para evitar inhalar el polvo. El operador debe usar guantes y una mascarilla mientras manipula el veneno crudo. La solución madre debe almacenarse ultracongelada a -70 °C en alícuotas de 0,5 ml. Es estable durante al menos dos años en estas condiciones. Para preparar un reactivo listo para usar, descongele y diluya el reactivo madre 1/10 en la solución amortiguadora de Owren, se prepara la alícuota y se vuelve a congelar a -70 °C para su uso posterior. Este reactivo listo para usar es estable en estas condiciones durante al menos tres meses. Las alícuotas congeladas listas para usar deben descongelarse en un baño maría a 37 °C durante al menos tres minutos. Esto es estable para su uso durante al menos 12 horas a temperaturas ambiente de 20 a 25 °C. Hay varias preparaciones de batroxobina disponibles comercialmente.

Método:

- ✓ Realice todas las pruebas por duplicado.
- ✓ Coloque suficientes tubos de coagulación de vidrio de 75 x 10 mm en un baño maría a 37 °C (dos por paciente, más dos para el control).
- ✓ Pipetear 0,3 ml de plasma (control o paciente) en tubos de coagulación calientes.
- ✓ Calentar durante uno o dos minutos.
- ✓ Añadir 0,1 ml de dilución de reptilasa y poner en marcha el cronómetro.
- ✓ Incline tres veces para mezclar, luego tres veces cada cinco segundos hasta que se forme un coágulo.
- ✓ Registrar el tiempo de coagulación.
- ✓ El tiempo de control debe ser de 15 a 18 segundos. (Si es más corto, ajústelo diluyendo aún más el reactivo de reptilasa con la solución amortiguadora de Owren).
- ✓ Si no se produce ningún coágulo, reporte como >90 segundos.

Rango normal: El tiempo del paciente debe estar dentro de los tres segundos del tiempo de control. El tiempo de control debe reportarse con el tiempo del paciente.

Interpretación: La interpretación del tiempo prolongado de trombina y el tiempo de reptilasa se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Interpretación del tiempo prolongado de trombina

Tiempo de trombina	Tiempo de reptilasa	Causa	Observaciones
Prolongado	Igualmente prolongado	Hipo o afibrinogenemia	Medir el fibrinógeno
Prolongado	Fuertemente prolongado	Disfibrinogenemia	Congénita o adquirida
Prolongado	Normal	Heparina	
Prolongado	Ligeramente prolongado	Heparina con alguna hipo o disfibrinogenemia	Un caso raro de disfibrinogenemia puede dar este patrón
Prolongado	Igualmente prolongado	Coagulación intravascular diseminada (CID)	Medición de dímeros D
Prolongado	Normal	Inhibidores directos de la trombina	

Nota: Los reactivos de reptilasa están disponibles en una concentración lista para usar en varios fabricantes comerciales. La ventaja de esto es que no hay necesidad de manipular el veneno crudo, evitando así sus problemas de salud y seguridad. Si usa uno de estos, siga las instrucciones de uso del fabricante. Cuando la reptilasa es un reactivo caro, puede utilizarse el método de neutralización de protamina/tiempo de trombina para confirmar la presencia de heparina en la muestra de ensayo.

Fibrinógeno (ensayo de Clauss modificado): las diluciones de plasma normal estándar con contenido conocido de fibrinógeno se preparan en solución amortiguadora de glioxalina. Se mide el tiempo de coagulación después de la adición de trombina y se construye un gráfico. El tiempo de coagulación es proporcional a la concentración de fibrinógeno, y la dilución 1/10 se toma para representar el valor en la preparación estándar. El plasma de prueba se diluye 1/10 y el resultado se lee de la línea estándar.

Reactivos:

- ✓ Plasma patrón o de referencia con concentración conocida de fibrinógeno
- ✓ Trombina alta concentración de 100 - 200 U/ml (la concentración puede variar según la fuente).
- ✓ Solución amortiguadora de imidazol (glioxalina) o solución amortiguadora de Owren, pH 7,35

Método: La técnica manual del tubo basculante se describe en la Parte 4 de este manual. Se deben seguir las recomendaciones del fabricante del reactivo.

Esta prueba no se ve afectada por la heparina en los niveles utilizados para el tratamiento de la tromboembolia venosa. Se supone que el uso de una mayor concentración de trombina supera el efecto de las altas concentraciones de HNF sobre la trombina, como las que se aplican en el bypass cardiopulmonar que permite la formación de coágulos. Sin embargo, se debe tener precaución al interpretar los resultados de estos pacientes, ya que se pueden observar tiempos de coagulación prolongados, lo que lleva a una subestimación del fibrinógeno, a menos que el reactivo contenga neutralizadores de heparina para contrarrestarlo. El efecto de los DTI dependerá en gran medida de la concentración de DTI en el plasma del paciente y del tipo de reactivos utilizados. Los DTI en el rango terapéutico no afectan a la trombina de alta concentración utilizada en el ensayo de fibrinógeno de Clauss (Mackie et al, 2024).

Datos de calibración típicos: (Nota: se debe establecer una curva de calibración con los reactivos en uso local).

Plasma estándar: 2,1 g/l de fibrinógeno

Tabla 11. Ejemplo de calibración de fibrinógeno

Dilución del patrón	Concentración de fibrinógeno (g/l)	Tiempo de coagulación (segundos)
1/5	4.2	8.5
1/10	2.1	14
1/15	1.4	19.5
1/20	1.05	24.5

Ejemplos:

Plasma de prueba 1: diluido 1 en 10, tiempo de coagulación 15 segundos.

fibrinógeno = 1,9 g/l (del gráfico de calibración)

Plasma de prueba 2: diluido 1 en 5, tiempo de coagulación 16 segundos.

fibrinógeno = 1,8 g/l del gráfico de calibración x 5/10 (desde 1/5 de dilución en lugar de 1/10)
= 0,9 g/l

Notas sobre el ensayo de fibrinógeno de Clauss: El nivel de fibrinógeno puede subestimarse en presencia de altas concentraciones de productos de degradación de fibrina/fibrinógeno, por lo que se recomienda una interpretación cuidadosa de los resultados cuando se sospecha de ello. Debe evitarse la recolección de muestras de sangre para la coagulación de dispositivos venosos o arteriales contaminados con heparina para excluir la posibilidad de interferencia oscura de heparina en los resultados obtenidos. Deben evitarse las muestras de pacientes con dosis altas de HNF al cuantificar los niveles de fibrinógeno para evitar la obtención de resultados falsos bajos.

Prueba de fibrinógeno derivada de TP: Varios analizadores de coagulación pueden estimar el nivel de fibrinógeno durante la determinación del tiempo de protrombina. Esto es posible porque el cambio en la dispersión o transmisión de la luz debido a la formación de coágulos es proporcional a la concentración inicial de fibrinógeno. Estos métodos se conocen comúnmente como fibrinógeno derivado de TP. Existen limitaciones para la mayoría de los métodos derivados de TP. En particular, los resultados obtenidos suelen ser mucho más altos que los obtenidos por el ensayo de Clauss cuando hay niveles muy bajos (<1,5 g/l) o niveles elevados (por encima de 5 g/l) de fibrinógeno. Los resultados suelen estar por encima de lo normal en presencia de disfibrinogenemia (Mackie et al, 2024; Miesbach et al, 2010). Existen métodos de fibrinógeno de Clauss que son adecuados para analizar plasma de prueba sin diluir, pero los resultados pueden no ser intercambiables con los resultados de los ensayos de Clauss ampliamente utilizados que emplean plasma de prueba diluido (Jennings et al. 2009).

Factores que afectan el uso de fibrinógeno derivado de TP: Para los pacientes en tratamiento anticoagulante, es aconsejable no utilizar la estimación de fibrinógeno derivado de TP para cuantificar sus niveles de fibrinógeno. Ciertos anticoagulantes orales afectan a la generación de trombina, reduciendo finalmente la producción de trombina y causando la formación de fibrillas gruesas que son detectadas como turbidez en la muestra por los sensores ópticos y transmitidas como aumento de fibrinógeno (Chitolie et al, 1994). Ha habido casos de pacientes con hipodisfibrinogenemia que han sido identificados con fibrinógeno normal derivado de TP, mientras que estos niveles eran realmente bajos cuando se midieron por el método de Clauss (Chitolie et al, 1994). La turbidez plasmática de referencia conduce a estimaciones más altas de los niveles de fibrinógeno. Además, el plasma del paciente que es lipémico y turbio puede ocasionar una estimación alta errónea de fibrinógeno. Estos niveles inexactos de fibrinógeno se pueden observar en pacientes crónicas y graves. Sobre la base de las Guías internacionales actuales sobre cuantificación de fibrinógeno, se recomienda el método de fibrinógeno de Clauss y, debido a las imprecisiones asociadas con el fibrinógeno derivado de TP, no debe usarse para detectar deficiencias de fibrinógeno, no debe usarse en pacientes que se sabe que están en tratamiento anticoagulante y los resultados deben interpretarse con cuidado.

Eliminación de la heparina del plasma: La heparinasa 1 (el componente activo de la Hepzyme®) es específica para la heparina, que escinde en múltiples sitios por molécula, produciendo oligosacáridos que han perdido su actividad antitrombótica. La Hepzyme® es una heparinasa bacteriana purificada 1 producida en *Flavobacterium heparinum*. Puede eliminar hasta 2 UI de heparina por ml en plasma. La Hepzyme® se puede utilizar para neutralizar el efecto de la heparina en una muestra, de modo que se pueda evaluar el estado de coagulación subyacente. Se utiliza especialmente en casos de contaminación por heparina (Forte y Abshire, 2000).

Reactivos:

- ✓ Hepzyme®, un vial que contiene una preparación seca de heparinasa 1 con estabilizantes
- ✓ Fabricante: Dade Behring
- ✓ Almacenamiento: 4°C
- ✓ Estabilidad: según la fecha de caducidad del fabricante. Cada vial se utiliza para realizar la prueba en un solo paciente

Método:

- ✓ Añadir 1,0 ml de plasma citrado pobre en plaquetas a un vial de Hepzyme®.
- ✓ Vuelva a detener e invierta suavemente de 5 a 10 veces.
- ✓ Dejar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- ✓ Transfiera a un vaso de muestra de plástico de 2 ml y espere unos momentos para que desaparezcan las burbujas.
- ✓ Colóquelo en CA 1500 y realice la prueba requerida.

Se debe incluir el tiempo de trombina para comprobar que toda la heparina se ha eliminado con éxito. Las pruebas deben realizarse lo antes posible (es decir, dentro de las pautas de prueba para ese procedimiento).

Interpretación: Esta enzima no elimina ningún factor de coagulación (a diferencia de algunas de las técnicas alternativas para eliminar la heparina), por lo que el acortamiento sustancial de los tiempos de coagulación en el TTPA, el tiempo de trombina o el TP después del tratamiento con hepzima indica que la heparina estaba presente. Tanto la HNF como las formas de bajo peso molecular son degradadas por esta enzima.

Referencias

Adcock DM, Gosselin RC. El peligro de depender del TTPA y el TP en pacientes con terapia con ACOD, un posible problema de seguridad del paciente. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Supl 1: 37-40.

Adcock DM, Moore GW, Montalvo SL, Kershaw G, Gosselin RC. Estudios de mezcla de tiempo de tromboplastina parcial activada y tiempo de protrombina: estado actual del arte. *Semin Thromb Hemost* 2023; 49(6): 571-579.

Baglin T, Luddington R. Fiabilidad de la determinación diferida del INR: implicaciones para la atención anticoagulante descentralizada con muestras de sangre fuera del centro. *Br J Haematol* 1997; 96(3): 431-434.

Bonar RA, Lippi G, Favalaro EJ. Descripción general de la hemostasia y la trombosis y contribución de las pruebas de laboratorio al diagnóstico y tratamiento de los trastornos de la hemostasia y la trombosis. En: Favalaro EJ, Lippi G, eds. *Hemostasia y Trombosis: Métodos y Protocolos*. Nueva York, NY: Springer Nueva York; 2017: 3-27.

Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Detección y diagnóstico de trastornos plaquetarios hereditarios. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022; 59(6): 405-444.

Chitolie A, Mackie IJ, Grant D, Hamilton JL, Machin SM. Inexactitud de la medición de fibrinógeno 'derivada'. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 1994; 5(6): 955-957.

Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio. Prueba de tiempo de protrombina (TP) en una etapa y prueba de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA), 3ª edición. Norma CLSI H47. 2023. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h47>.

Dorgalaleh A, Favalaro EJ, ¡Bahréin! M, Rad F. Estandarización del tiempo de protrombina/relación normalizada internacional (TP/INR). *Int J Lab Hematol* 2021; 43(1): 21-28.

Favalaro EJ. Estudios de mezcla de coagulación: Utilidad, estrategias algorítmicas y limitaciones para las pruebas de anticoagulación lúpica o el seguimiento de pruebas de coagulación anormales. *Am J Hematol* 2020; 95(1): 117-128.

Favalaro EJ. Optimización de la verificación del tiempo medio normal de protrombina (MNTP) y el índice de sensibilidad internacional (ISI) para una conversión precisa del tiempo de protrombina (TP) a la relación internacional normalizada (INR). *Métodos Mol Biol* 2017; 1646: 59-74.

Forte K, Abshire T. El uso de la hepzima para eliminar la heparina de muestras de sangre extraídas de dispositivos de acceso venoso central. *J Pediatr Oncol Nurs* 2000; 17(3): 179-181.

Fritsma GA. Terapias antitrombóticas y su evaluación de laboratorio. En: *Hematología de Rodak: Principios Clínicos y Aplicaciones*. 2019: 746-764.

Hogwood J, Mulloy B, Gray E. Precipitación y neutralización de heparina de diferentes fuentes por sulfato de protamina. *Productos farmacéuticos (Basilea)* 2017; 10(3): 59.

Organización Internacional de Normalización (ISO). ISO 15189:2022(en) Laboratorios médicos — Requisitos de calidad y competencia. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15189:ed-4:v1:en>. Consultado el 23 de marzo de 2025.

Diferencias entre los ensayos de multifibrina U y los ensayos convencionales de fibrinógeno Clauss: datos de encuestas del Plan Nacional de Evaluación de Calidad Externa del Reino Unido. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 2009; 20(5): 388-390.

Karapetian H. Tiempo de reptilasa (RT). *Métodos Mol Biol* 2013; 992: 273-277.

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. Recomendaciones del Consejo Internacional de Normalización en Hematología (ICSH) para la recolección de muestras de sangre para pruebas de coagulación. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.

Kitchen S, Cartwright I, Woods TA, Jennings I, Preston FE. Composición lipídica de siete reactivos de TTPA en relación con la sensibilidad a la heparina. *BrJ Haematol* 1999; 106(3): 801-808.

Kitchen S, Malia RG, Preston FE. Comparación de métodos para la medición del factor VII activado. *Thromb Haemost* 1992; 68(3): 301-305.

Lowe A, Kitchen S, Jennings I, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Efectos de emicizumab en TTPA, ensayos de FVIII y ensayos de inhibidores de FVIII utilizando diferentes reactivos: resultados de un ejercicio de prueba de competencia NAECS del Reino Unido. *Hemofilia* 2020; 26(6): 1087-1091.

Mackie I, Casini A, Pieters M, Pruthi R, Reilly-Stitt C, Suzuki A. Recomendaciones del Consejo Internacional de Normalización en Hematología sobre los ensayos de fibrinógeno, el tiempo de coagulación de la trombina y las pruebas relacionadas en la investigación de los trastornos hemorrágicos. *IntJ Lab Hematol* 2024; 46(1): 20-32.

Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GD. Guías sobre ensayos de fibrinógeno. *BrJ Haematol* 2003; 121(3): 396-404.

Maier CL, Sniecinski RM. Monitorización de la anticoagulación para médicos perioperatorios. *Anestesiología* 2021; 135(4): 738-748.

Mielke CH. Medición del tiempo de sangrado. *Thromb Haemost* 1984; 52(2): 210-211.

Miesbach W, Schenk J, Alesci S, Lindhoff-Last E. Comparación del ensayo Clauss de fibrinógeno y el método derivado del fibrinógeno TP en pacientes con disfibrinogenemia. *Thromb Res* 2010; 126(6): e428-433.

Miller CH. Pruebas de laboratorio para inhibidores del factor VIII y IX en la hemofilia: una revisión. *Hemofilia* 2018; 24(2): 186-197.

Funciones del dominio del factor VIII b. *Hemofilia* 2009; 15(6): 1187-1196.

Practical-Haemostasis.com. Prueba de neutralización de sulfato de protamina, <https://practical-haemostasis.com/>. Consultado el 23 de marzo de 2025.

Rodgers RPC, Levin J. Una reevaluación crítica del tiempo de sangrado. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(3): 499-516.

Russeau AP, Vail H, Manna B. Tiempo de sangrado. [Actualizado el 8 de agosto de 2023]. En: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK537233/>. Accessed 23 de marzo de 2025.

Toulon P, Eloit Y, Smahi M, Sigaud C, Jambou D, Fischer F, Appert-Flory A. Sensibilidad in vitro de diferentes reactivos de tiempo de tromboplastina parcial activados a deficiencias leves de factores de coagulación. *IntJ Lab Hematol* 2016; 38(4): 389-396.

Undas A. La prueba del tiempo de sangrado en 2024: un pasado glorioso y desafíos actuales. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(3): 517-519.

Vandiver JW, Vondracek TG. Niveles de antifactor Xa frente a tiempo de tromboplastina parcial activada para la monitorización de la heparina no fraccionada. *Farmacoterapia* 2012; 32(6): 546-558.

Vinholt PJ. El papel de las plaquetas en la hemorragia en pacientes con trombocitopenia y enfermedad hematológica. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(12): 1808-1817.

Williams B, Lin Z, Pittet JF, Chao W. Coagulopatía inducida por sepsis: una revisión narrativa exhaustiva de la fisiopatología, la presentación clínica, el diagnóstico y las estrategias de tratamiento. *Anesth Analg* 2024; 138(4): 696-711.