

# TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ACTIVADO Y TIEMPO DE TROMBINA EN EL CONTROL DE LA HEPARINOTERAPIA

## COMPARACION DE DIFERENTES TROMBOPLASTINAS. ESTUDIO IN VITRO

A. VASQUEZ, F. CORREA, M. MORALES, M. PABON, F. PINZON

Se estudió *in vitro* la sensibilidad de las diferentes tromboplastinas comerciales usadas en Colombia, con el tiempo de tromboplastina parcial activado, usando un "pool" de plasmas normales con diferentes concentraciones de heparina (0,2 a 0,6 unidades por ml). Igualmente se midió el efecto heparínico por medio del tiempo de trombina. La tromboplastina más sensible fue el Pathromtin y la menos sensible el Actin. Ambas con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.001$ ). El ITT demuestra gran sensibilidad, pocos factores inciden sobre él y permite determinar las concentraciones de heparina plasmáticas. Los diferentes laboratorios deberán establecer la sensibilidad de las diferentes tromboplastinas que utilizan para proporcionar una monitoria efectiva durante el tratamiento anticoagulante con heparina.

### INTRODUCCION

La heparina se usa en humanos desde hace mucho tiempo para el tratamiento de la enfermedad tromboembólica y más recientemente en dosis bajas, para su profilaxis en pacientes con alto riesgo de flebotrombosis. Múltiples publicaciones han informado su eficacia (1). Pero la heparina inherente a su efecto terapéutico como anticoagulante, lleva consigo el riesgo de, hemorragia que como complicación se presenta entre 0,1% por ciento de los pacientes tratados con este medi-

camento (4, 5) y es una de las drogas que se relaciona más con la muerte de pacientes hospitalizados (6). Por otro lado, si la anticoagulación es insuficiente, sobreviene la posibilidad de extensión del proceso trombótico o la recidiva del embolismo pulmonar. Tales complicaciones al parecer son menos frecuentes cuando la concentración de la heparina se mantiene entre 0,2 y 0,4 unidades por ml de plasma (7) o los tiempos de coagulación que se utilizan para medir su efecto, se sitúan dentro de un intervalo definido como terapéutico (8).

Se han diseñado muchas pruebas para medir el efecto de la heparina con el propósito de identificar quién tiene riesgo de hemorragia o de extensión de la trombosis; unas miden globalmente la coagulación, como los tiempos de: coagulación con sangre total (9), recalcificación (10), tromboplastina parcial activado (TTPA) (11), coagulación con sangre total activada (12); otras exploran el efecto de la heparina sobre un paso específico de la coagulación, como: el tiempo de trombina (TT) (13) y la inhibición del factor Xa (14), además de las pruebas de neutralización con polibreno (15) o protamina (16); pero todas han sido muy debatidas.

La más utilizada es el TTPA (17) del cual se dice que tiene un rango terapéutico de 1,5 a 2,5 veces el tiempo normal (8), aunque se ha informado de la sensibilidad variable de esta prueba en relación con el reactivo empleado (17, 18).

El objeto de este trabajo es correlacionar los niveles plasmáticos de heparina con la prolongación del TT y TTPA, este último medido con cuatro tromboplastinas diferentes que se distribuyen en el país.

Dr. Alejandro Vásquez G: Profesor Departamento de Medicina Interna, Hematólogo, Jefe Sección Hematología; Dr. Franklin Correa H: Profesor Departamento de Medicina Interna, Hematólogo; María Belén Morales G., María del Pilar Pabón de E.: Bacteriólogas, Sección de Hematología; Dr. Fernando Pinzón: Profesor del Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina, Universidad del Cauca, Popayán

Solicitud de separatas al Dr. Alejandro Vásquez.

Tabla 1. Tiempos de coagulación de las tromboplastinas y trombina según la concentración de heparina.

Heparina Uds/ml plasma	Tiempo de tromboplastina parcial activado (seg)								Tiempo de trombina Fibrindex	
	Auto - Aptt		Actin		Platelin-Plus		Pathromtín			
	$\bar{X}$	DS	$\bar{X}$	DS	$\bar{X}$	DS	$\bar{X}$	DS	$\bar{X}$	DS
0.0	38	1.0	39.6	1.15	45	0	41	1.73	26	0
0.1	53.3	0.58	51	2	76.6	1.53	99	1.0	35.6	1.2
0.2	69	0	54.6	0.58	101.3	4.16	155.3	0.58	53.6	1.5
0.3	94	0	79.3	0.58	129.6	4.72	202.3	4.04	71	1.6
0.4	152.3	0.58	135.6	1.15	140.3	2.08	306.3	1.15	84.6	0.6
0.5	140.6	1.15	123	1.73	199.3	0.58	352	43.00	541.6	2.9
0.6	134.6	0.58	178	6.08	169.0	9.54	328	2.0	600	0

#### MATERIAL Y METODOS

El trabajo se efectuó en el Laboratorio de Hematología del Hospital Universitario San José de Popayán, dependiente de la Facultad de Medicina de la Universidad del Cauca.

La sangre se obtuvo de 25 personas sanas y las muestras se tomaron en tubos siliconizados con citrato de sodio al 3.8% en proporción 9:1. Se centrifugaron a 1.200 g por diez minutos, y la mezcla de plasma se distribuyó en alícuotas de 5 ml cada una y se agregó heparina sódica hasta obtener concentraciones de 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 0.6 unidades por ml. Se midió el TTPA manualmente utilizando cuatro tromboplastinas comerciales: Actin<sup>1</sup>, Automated APTT<sup>2</sup>, Pathromtín<sup>3</sup> y Platelin-Plus<sup>2</sup> de acuerdo con las instrucciones de cada fabricante. Del mismo modo se midió el TT con Fibrindex utilizando 0,2 ml de plasma y 0,2 ml de trombina a temperatura ambiente. La ampolla de Fibrindex<sup>4</sup> se diluyó en agua destilada hasta obtener un TT testigo de 26 segundos, lo cual correspondió a una concentración de 0,2 unidades de trombina por ml de plasma.

La persona que realizó las pruebas no conocía las concentraciones de heparina y los

tiempos se hicieron por triplicado. Mientras se practicaba cada prueba, las muestras se mantenían entre cubos de hielo.

El análisis estadístico se hizo por los métodos de varianza y regresión lineal. Las diferencias estadísticas se establecieron mediante la prueba F.

#### RESULTADOS

En la Tabla 1 se presentan los TTPA y TT correspondientes a cada concentración de heparina.

**Tromboplastinas.** En la Figura 1 se ven las curvas del TTPA versus la concentración de heparina obtenida según la ecuación de regresión lineal para cada una de las tromboplastinas empleadas. A medida que aumenta la concentración de heparina, se prolonga el TTPA guardando una relación lineal en todas las tromboplastinas. El índice r para cada reactivo fue de 0,98 (Pathromtín), 0,95 (Actin), 0,94 (Platelin-Plus) y 0,92 (Automated APTT). Se observó que a partir de 0.4 unidades de heparina por ml de plasma los TTPA variaron en proporción menor a lo esperado en relación a la concentración de heparina y la desviación estándar fue mayor para todas las tromboplastinas excepto la de Automated APTT. Tabla 1 y Figura 1.

Como se observa en la Figura 2, hubo diferencia en la sensibilidad de los reactivos empleados. La diferencia fue significativa ( $p < 0.001$ ). El reactivo más sensible fue el Pathromtín.

- 1 Dade Diagnostic Inc. Aguada, Puerto Rico.
- 2 General Diagnostic, División Warner-Lambert Morris Plains, New Jersey USA.
- 3 Beringwerke AG Marburg, W. Germany.
- 4 Ortho Diagnostic Inc. Raritan New Jersey (USA).

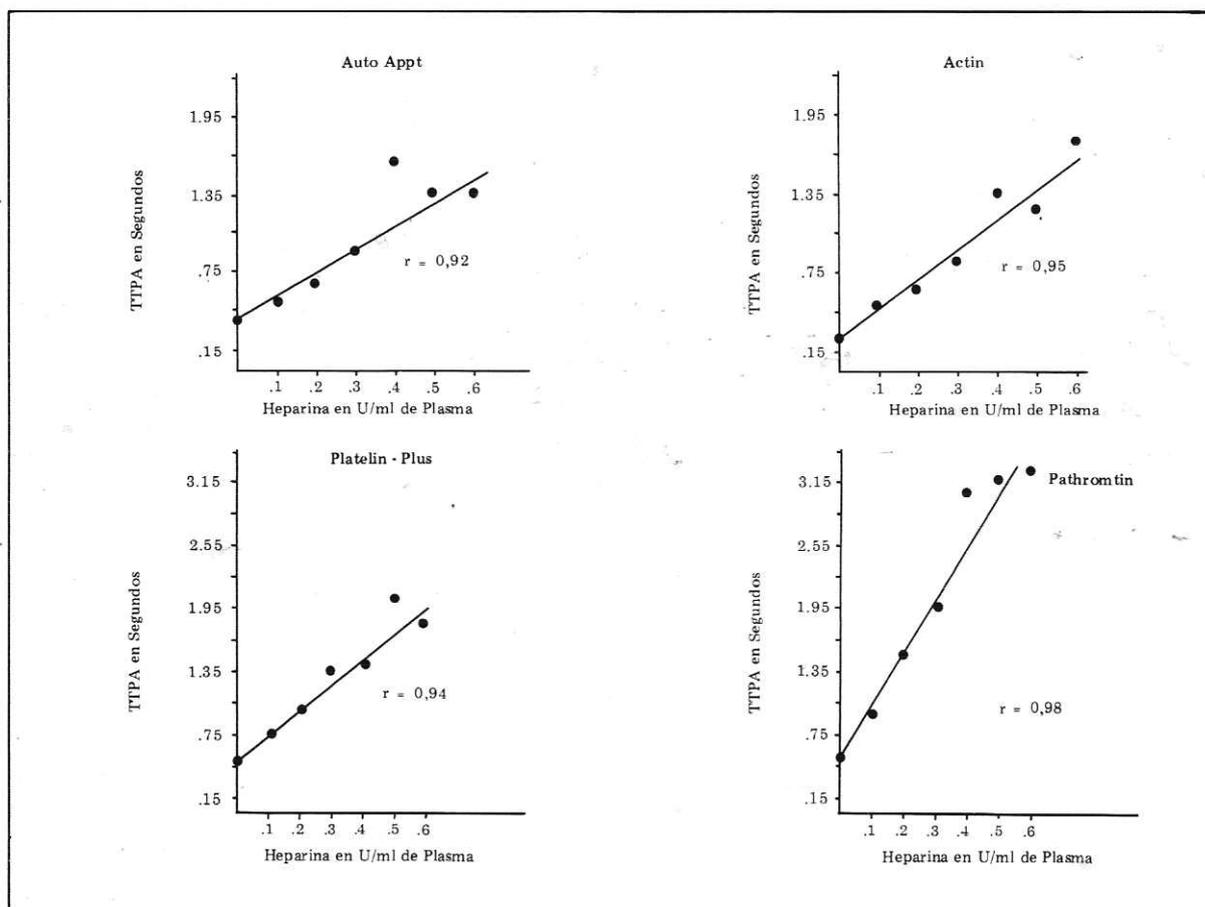


Figura 1. TTPA versus la concentración de heparina según el reactivo usado. Los puntos representan los resultados experimentales. Nótese que a concentración mayor de 0.4 Uds de heparina por ml de plasma, la sensibilidad disminuye.

Se encontró que en las concentraciones terapéuticas de heparina (0.2 a 0.4 unidades de heparina por ml de plasma) las veces que se prolongó el TTPA en relación con el plasma testigo fue diferente para cada reactivo. Figura 2 y Tabla 2.

**Trombina.** La Tabla 1 muestra el TT a las diferentes concentraciones plasmática de heparina. La Figura 3 representa los puntos correspondientes al TT para cada concentración de heparina. El índice r fue de 0.84. Nótese como hasta 0.4 unidades de heparina por ml de plasma el TT aumentó en proporción lineal, al incremento de la concentración de la heparina, y a partir de ese punto, el TT aumentó en proporción mayor a lo esperado sin variación apreciable de la desviación estándar.

Tabla 2. Prolongación del TTPA a concentraciones Terapéuticas de Heparina (0, 2-0, 4Uds/ml de plasma).

Reactivo	Prolongación (No. veces) +
*A - APTT ACTIN	2,0 - 3,0 2,6 - 4,3
PLATELIN - PLUS	1,8 - 2,7
PATHROMTIN	3,0 - 5,0

\* Automated APTT.

+ Prolongación en No. de veces con relación al TTPA respectivo del plasma sin heparina.

### DISCUSION

Es indiscutible que la terapia con heparina debe ser controlada con alguna prueba de

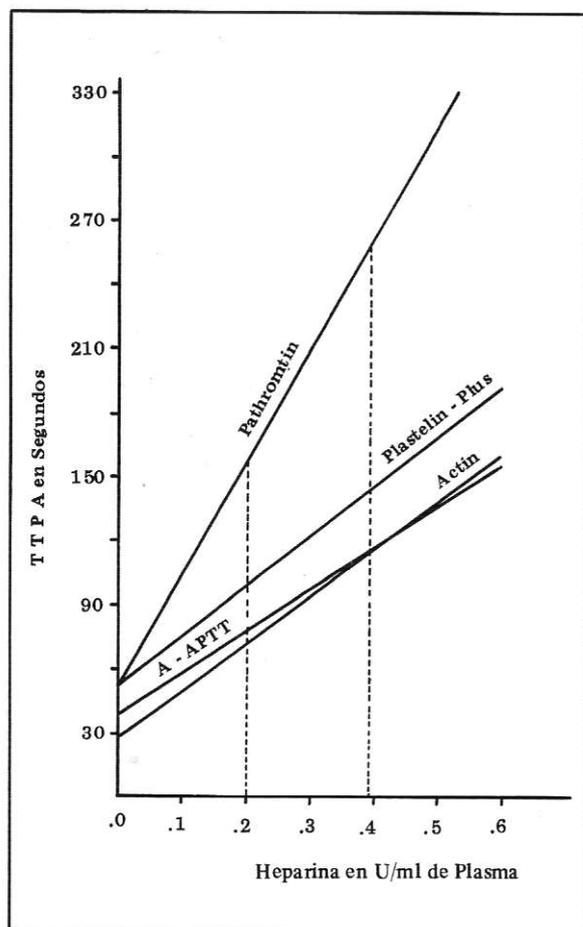


Figura 2. TTPA versus concentración de heparina. Comparación de la sensibilidad entre los reactivos empleados. Las líneas interrumpidas delimitan el intervalo terapéutico obtenido en cada tromboplastina.

coagulación para disminuir el riesgo de hemorragia o recidiva de la trombosis. Entre nosotros la prueba más usada es el TTPA, pese a que muchos autores han demostrado que su sensibilidad es muy variable según el reactivo empleado (17-20). Más aún, para algunos, la monitoria con TTPA no reduce la frecuencia de la complicación hemorrágica (8, 21). No obstante lo anterior, es tradicional aceptar que se tiene efecto terapéutico de la heparina, cuando el TTPA es 1,5 a 2,5 veces mayor que el TTPA de un plasma control del laboratorio (8).

En el presente trabajo corroboramos que al aumentar la concentración de heparina se prolonga proporcionalmente el TTPA, cualquiera

que sea la tromboplastina utilizada, pero se observa también diferente sensibilidad en cada uno de los reactivos empleados para medir el efecto anticoagulante de la heparina.

La tromboplastina más sensible fue la que ante el aumento de la concentración de heparina tuvo la mayor prolongación del TTPA, esto correspondió al Pathromtin. Por el contrario, la menos sensible, fue la que frente al incremento en la concentración de heparina produjo la menor prolongación en el TTPA; esto correspondió al Actin, con diferencia estadísticamente significativa ( $p < .001$ ). No se aclara aún el porqué de la diferente sensibilidad con cada reactivo, algunos la atribuyen al fosfolípido, otros al activador o al tipo de heparina empleado; pero al parecer no es determinante que el método utilizado sea automático o manual (17, 18, 20).

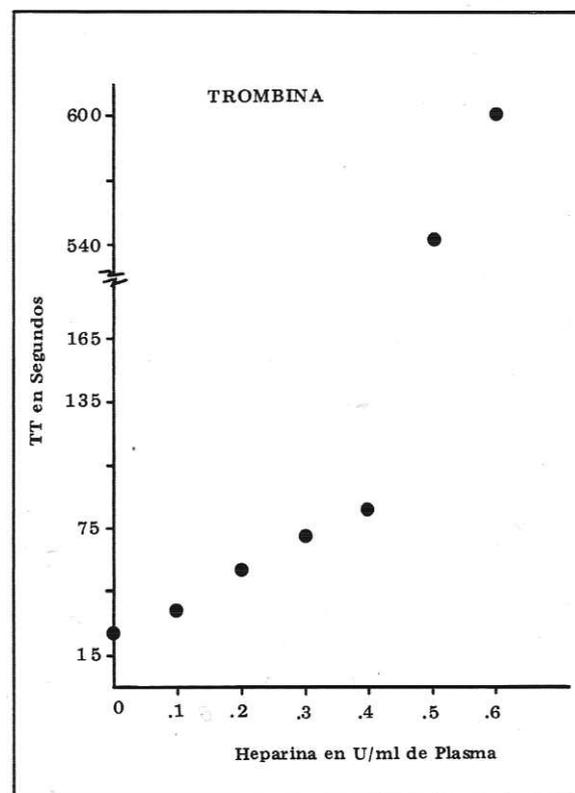


Figura 3. TT versus concentración de heparina. Los puntos representan los tiempos de coagulación encontrados para cada concentración de heparina. Se observa que más allá de la concentración terapéutica aumenta la sensibilidad de la prueba.

El reactivo más sensible discriminó fácilmente entre las concentraciones bajas y terapéuticas de la heparina, pero en el extremo superior del intervalo terapéutico la desviación estándar del TTPA fue mayor, por lo cual la reproducibilidad de la prueba disminuye y se hace difícil diferenciar entre el nivel terapéutico y la concentración tóxica de heparina. Además, la sensibilidad diferente de cada reactivo hace que su intervalo terapéutico sea también distinto (Tabla 2 y Figura 3); por lo tanto la norma general de que el intervalo terapéutico es el de 1,5 a 2,5 veces el TTPA de un plasma testigo (8) pierde validez. En nuestro trabajo vemos cómo el intervalo terapéutico del Pathromtin es definitivamente tóxico si se lo aplicamos al Piatelin-plus y la prolongación terapéutica del TTPA con este último reactivo es subóptima si se lo aplicamos a cualquier otro de los reactivos probados. Estos resultados son semejantes a lo informado por otros (17-20).

Por otro lado, por ser el TTPA una prueba global de la coagulación, múltiples factores plasmáticos ajenos a la heparina inciden en ella. Así por ejemplo, se ha demostrado que la elevación del nivel plasmático del Factor VIII acorta el TTPA y se requiere mayor concentración de heparina para lograr el llamado "Intervalo terapéutico", con aumento del riesgo de hemorragia (7, 22). Esto quizás explica las conclusiones de Salzman y otros (4, 8, 21, 23).

Buscando mejores alternativas se propone el TT (24, 25) que evalúa un paso específico de la coagulación en el que intervienen sólo la biodisponibilidad del fibrinógeno y la presencia de antitrombóticos. En nuestro trabajo, el aumento de la concentración de heparina prolongó proporcionalmente el TT y la prueba fue tan sensible que permitió diferenciar entre las concentraciones bajas y las terapéuticas (Figura 3). El coeficiente de correlación de la curva del TT fue de 0.84; pero si solo consideramos la curva hasta la concentración de 0.4 unidades de heparina por ml de plasma ese coeficiente es de 0.99. La diferencia se debe al gran aumento de sensibilidad de la prueba a partir de las concentraciones terapéuticas; es decir, que desde las concentraciones mínimas

hasta la máxima concentración terapéutica, hay estricta correlación lineal entre el TT y los niveles plasmáticos de heparina, y que a partir de 0.4 unidades de heparina por ml de plasma, pequeños incrementos en la concentración del anticoagulante producen grandes prolongaciones en el TT, lo cual facilita la distinción entre concentraciones terapéuticas y tóxicas. Como el TT valora un paso específico de la coagulación, se considera que si no cambia apreciablemente la concentración del fibrinógeno, se puede medir el nivel de la heparina. En nuestra experiencia por encima de las concentraciones terapéuticas, debido a la gran sensibilidad de la prueba, se dificulta medir con precisión la concentración. Penner (24) y Pizzuto (25) sugieren para obviar esta dificultad mezclar el plasma del paciente con el plasma control; así situaríamos el punto de coagulación en el intervalo de la curva del TT donde el coeficiente de correlación es 0.99 y al multiplicar por el factor de dilución se obtiene la concentración de la heparina. Esta presunción teórica se correlaciona en la práctica con los resultados de Boanameaux (26) quien encontró que el TT guarda mejor correlación con los niveles de heparina que el TTPA. Pizzuto (25) y colaboradores correlacionaron en 74 pacientes el riesgo de hemorragia con los valores del TT. Además Nyman (27) en 700 pacientes sometidos a cirugía cardiovascular y circulación extracorpórea, controlando la heparinoterapia con TT no tuvo ninguna hemorragia.

Concluimos que la tromboplastina más sensible en nuestras manos fue el Pathromtin, que cada reactivo tiene sensibilidad e intervalo terapéutico diferente; por lo que cada laboratorio debe identificar su tromboplastina más sensible y determinar con ella los parámetros terapéuticos en el paciente heparinizado.

Que el TT es una prueba sensible, con la ventaja de que su sensibilidad aumenta a partir de las concentraciones terapéuticas. Además, con esta prueba se puede medir el nivel plasmático de la heparina.

#### SUMMARY

The *in vitro* sensitivity of different commercial thromboplastins available in Co-

lombia was studied by using a pool of normal plasma with increasing concentrations of heparin (0.2 to 0.6 units/ml of plasma). The anticoagulant effect of heparin was also assessed with thrombin time. It was found that Pathromtin was the most sensitive while Actin was the less sensitive of the brands tested. These results were statistically significant ( $p < 0.001$ ) and suggest that each clinical laboratory should establish the sensitivity of the thromboplastins they use in order to assure an adequate follow-up of heparin therapy.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al señor Leonardo Laredo, estadístico del proyecto de nutrición de la Universidad del Valle, por su colaboración en el presente trabajo.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.- BARRIT DW, JORDAN SC. Anticoagulant drugs in the treatment of Pulmonary Embolism: a controlled trial. *Lancet* 1960; 1: 1309-1312.
- 2.- BAUER G. Nine years experience with heparin in acute venous thrombosis. *Angiology* 1950; 1: 161-169.
- 3.- KAKKAR VV, CORRIGAN TP, FOSSARD DP. Prevention of fatal post operative pulmonary embolism by low doses of heparin. *Lancet* 1975;2: 45-51.
- 4.- SALZMAN EW, DEYKIN D, SHAPIRO RM, ROSENBERG R. Management of heparin Therapy. Controlled prospective trial. *N Engl J Med* 1975; 292: 1046-1051.
- 5.- GLAZIER RL, CROWELL EB. Randomized prospective trial of continuous versus intermittent heparin therapy. *JAMA* 1976; 236: 1365-1367.
- 6.- PORTER J, JICK H. Drug related deaths among medical inpatients. *JAMA* 1977; 237: 879-881.
- 7.- KELTON JG, HIRSH J. Bleeding associated with antithrombotic therapy. *Sem Hematol* 1980; 17: 259- 291.
- 8.- BASU D, GALLUS A, HIRSH J, CADE J. A prospective study of the value of monitoring heparin treatment with the activated partial thromboplastin time. *N Engl J Med* 1972; 287: 324-327.
- 9.- PITNEY WR. Control of heparin therapy. *Br Med J* 1970; 4: 139-141.
- 10.- BELKO JS, WARREN R. The recalcification time of blood. Its use as a measure of clinical effect of heparin. *Arch Surg* 1958;76: 210-218.
- 11.- DEGNAN TJ, KARASIK S, LENAHAN J. Laboratory Control of Heparin therapy with the activated Partial Thromboplastin Time Test. *Curr Ther Res* 1969; 11: 390-396.
- 12.- MABRY CD, THOMPSON BW, READ RC. Activated Clotting Time (ACT) monitoring of intraoperative heparinization in peripheral vascular surgery. *Am J Surg* 1979; 138: 899-900.
- 13.- SCHATZ I, HATHAWAY J. Heparin Therapy and thrombin times. *JAMA* 1963; 186: 740.
- 14.- TEIEN AN, LIE M, ABILDGAARD U. Assay of heparin in plasma using a chromogenic substrate for activated Factor X. *Thromb Res* 1976; 8: 413-416.
- 15.- GRANN VJ, HORNEWOOD K, GOLDEN W. Polybrene neutralization as a rapid means of monitoring blood heparin. *Am J Clin Pathol* 1972; 58: 26-32.
- 16.- GODAL HC. A comparison of two heparin-neutralizing agents: protamine and polybrene. *Scand J Clin Lab Invest* 1960 ; 12: 446-449.
- 17.- BANEZ EI, TRIPLETT DA, KOEPKE J. Laboratory monitoring of heparin therapy-the effect of different salts of heparin on the activated partial thromboplastin time. An analysis of the 1978 and 1979 CAP Hematology Survey. *Am J Clin Pathol* 1980;74: 569-574.
- 18.- BRANDT JT, TRIPLETT DA. Laboratory Monitoring of Heparin effect of reagents and instruments on the activated partial thromboplastin time. *Am J Clin Pathol* 1981; 76 (suppl): 530-537.
- 19.- SOLOWAY HB, CARNETT BM, GRAYSON JW Jr. Comparison of various activated partial thromboplastin reagents in the Laboratory control of Heparin therapy. *Am J Clin Pathol* 1973; 59: 587-590.
- 20.- TSAO CH-H, GALLUZO T, LO R, PETERSON K. Whole Blood clotting time, Activated Partial Thromboplastin time, and whole blood recalcification time as heparin monitoring tests. *Am J Clin Pathol* 1979; 71: 17-21.
- 21.- ADAR R, SALZMAN E. Treatment of thrombosis of veins of the lower extremities. *N Engl J Med* 1975; 292: 348-350.
- 22.- COCCHETO D, BJ RNSSON T. Progress toward an understanding of the anticoagulant effect and Pharmacokinetics of Heparin. *Pharm Internat* 1984; 5:7-11.
- 23.- SCIALLA SJ. Heparin Monitoring by activated partial thromboplastin time. Comparison of *ex vivo* measurement and *in vitro* standardization. *Am J Clin Pathol* 1985; 84: 351-354.
- 24.- PENNER J. Experience with a thrombin clotting time assay for measuring heparin activity. *Am J Clin Pathol* 1974; 61: 645-653.
- 25.- PIZZUTO J, GARCIA S, REYBA M, MORALES M, AVILES A. Utilidad clinica de un nuevo metodo para el control terapeutico de la heparina. *Arch Inst Cardiol Mex* 1978;48: 373-386.
- 26.- BOUNAMEAUX H, MARBERT G, L MMLE B, EICHLISBERGER R, DUCKERT F. Monitoring of heparin treatment. Comparison of thrombin time, activated Partial Thromboplastin Time and plasma heparin concentration, and analysis of the behaviour of antithrombin III. *Am J Clin Pathol* 1980;74: 68-73.
- 27.- NYMAN D, TURNHERR N, DUCKERT F. Heparin dosage in extracorporeal circulation and its neutralization. *Thromb Diath Haemorrh* 1974; 33: 102-104.