



Comparacion de los valores de fibrinógeno obtenidos por el método derivado del tiempo de protrombina (dPT) con el método de referencia gravimétrico

Marión Echenagucia E¹.

Diego Higuera².

Manuel Ruiz³.

Yacelli Bustamante⁴.

¹Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela
echenagucia23@gmail.com

²Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela

³Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela

⁴Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 21 de Octubre del 2009 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

La importancia de la medición de los niveles de fibrinógeno radica en que éstos se alteran en una gran cantidad de patologías, tales como la coagulación Intravascular diseminada CID, enfermedades cardiacas isquémicas, procesos inflamatorios, etc. Existen diferentes métodos para su determinación, entre estos tenemos el método gravimétrico, clauss, turbidimetricos, inmunológicos y el método Derivado del Tiempo de Protrombina dPT, éste es empleado ampliamente por equipos automatizados. El objetivo de este trabajo fue comparar los valores de Fibrinógeno obtenido por el método dPT con el método de referencia, en individuos sanos y en pacientes que tienen el Tiempo de Protrombina alargado, como es el caso de los pacientes anticoagulados orales, y de esta forma evaluar la precisión y exactitud del método y establecer si el mismo puede ser recomendado como método de rutina. Se estudiaron muestras de 30 individuos aparentemente sanos y 85 pacientes anticoagulados por vía oral, con diferentes grados de anticoagulación, reflejados en la razón internacional normalizada INR, por el método gravimétrico o de referencia y el método dPT. El análisis estadístico de los resultados, se determinó realizando pruebas paramétricas y no paramétricas utilizando el programa SPSS 12.0. Se realizó la prueba T con el objeto de estimar la exactitud del método dPT, dicho análisis arrojó diferencias significativas entre ambos métodos (p

PALABRAS CLAVE: Métodos para fibrinógeno, método derivado del PT, determinación de fibrinógeno

COMPARISON OF FIBRINOGEN VALUES OBTAIN BY THE METHOD DERIVED FROM PROTHROMBIN TIME (DPT) WITH THE GRAVIMETRIC REFERENCE METHOD

SUMMARY

Fibrinogen levels are altered in several diseases, such as: disseminated intravascular coagulation (DIC), ischemic heart disease, and inflammatory processes, therefore its accurate determination being very important. There are different methods for its determination, the gravimetric method, Clauss, turbidimetric, immunological and dPT, this is widely used by automated equipment. The aim of this study was to compare the values of fibrinogen obtained by the method derived from prothrombin time (dPT) to those obtained by the reference method in healthy individuals, and in patients who have prolonged PT as is the case in oral anticoagulation patients, and thus evaluate the accuracy of the method and establish whether it can be recommended as a routine method. We studied samples from 30 apparently healthy individuals with no history of bleeding or thrombotic tendency and 85 patients on oral anticoagulation, with different degrees of anticoagulation as shown by the INR, the gravimetric method (reference methods) and the dPT. Statistical analysis of results showed significant differences between both methods (p

KEY WORDS: Fibrinogen methods, derived from Prothrombin Time method, Fibrinogen determination

COMPARACION DE LOS VALORES DE FIBRINÓGENO OBTENIDOS POR EL MÉTODO DERIVADO DEL TIEMPO DE PROTROMBINA (DPT) CON EL MÉTODO DE REFERENCIA GRAVIMÉTRICO

INTRODUCCIÓN

El fibrinógeno es una glicoproteína presente en el plasma, sintetizada por las células del parénquima hepático, que participa en la hemostasia, específicamente estabilizando la agregación de las plaquetas activadas, y como precursor del coágulo de fibrina. Los estudios bioquímicos y funcionales, realizados con fibrinógeno aislado, han permitido establecer el carácter multifuncional de esta proteína de peso molecular de 340 Kd, que contiene un 3% de hidratos de carbono⁽¹⁾, cuya concentración normal es de 200-400 mg/dl y concentración mínima requerida para una hemostasia eficiente es de 60-100 mg/dl.⁽²⁾ El fibrinógeno es un reactante de fase aguda y sus niveles pueden elevarse en relación a una diversidad de variables fisiológicas y condiciones inflamatorias (TABLA 1).

FIBRINOGENO ELEVADO	FIBRINOGENO DISMINUIDO
EDAD	AFIBRINOGENEMIA
SEXO	HIPOFIBRINOGENEMIA
ESTACIONES	ENFERMEDAD HEPATICA
EMBARAZO	DESCOMPENSADA
ANTICONCEPTIVOS ORALES	HEPATITIS VIRAL
MUJER POST-MENOPAUSICA	CID
REACCION DE FASE AGUDA	HEMODILUCION
CIGARRILLO	
EJERCICIO AGUDO	
MALIGNIDAD DISEMINADA	

TABLA 1.- Factores fisiológicos, patológicos y de estilo de vida que afectan los niveles de fibrinógeno⁽³⁾

La importancia de la medición de los niveles de esta proteína radica en el hecho de que ésta se altera en una gran cantidad de patologías y su determinación permite detección y monitoreo de estas afecciones que pueden comprometer la vida del paciente. Un bajo nivel plasmático de fibrinógeno está asociado con riesgo aumentado de sangramiento. En la afibrinogenemia hay una severa disminución de la síntesis hepática de fibrinógeno, con niveles plasmáticos prácticamente indetectables, la cual origina una diátesis hemorrágica, con tiempos de coagulación prolongados y función plaquetaria anormal. En la hipofibrinogenemia, los niveles circulantes de fibrinógeno, muestran una reducción leve a moderada y los pacientes pueden estar asintomáticos o tener problemas hemorrágicos. En la disfibrinogenemia existe una función anormal del fibrinógeno, de esta manera los ensayos inmunológicos muestran discrepancia con los métodos funcionales para medir dicho parámetro. El fibrinógeno es utilizado además para monitorear la coagulación Intravascular diseminada (CID), en la que se producen depósitos de fibrina y/o plaquetas dentro de los vasos sin finalidades hemostáticas⁽¹⁾. Durante esta patología se observa un cuadro hemorrágico debido en parte, al consumo de factores de la hemostasia, entre los que se encuentra el fibrinógeno; esta proteína tiende a disminuir durante este proceso, ya que se genera una activación anormal de las proteínas de la coagulación, produciéndose así pequeños trombos a lo largo de los vasos sanguíneos. Concentraciones elevadas de

fibrinógeno son también clínicamente relevantes; siendo la proteína plasmática más abundante, una pequeña elevación en los niveles de la misma puede tener un gran impacto en la viscosidad del plasma, y de esta manera modificar la reología de la sangre. Un aumento de la viscosidad del plasma, ha sido asociada con el riesgo aumentado al tromboembolismo⁽³⁾. En años recientes una gran variedad de estudios prospectivos ha mostrado que los niveles de fibrinógeno son predictores de una diversidad de eventos cardiovasculares. A razón de lo antes expuesto, es importante que para esta gran variedad de patologías puedan ser supervisadas a partir de los valores de la concentración de fibrinógeno, se cuente con metodologías que puedan evaluar los niveles de esta proteína y que nos permita obtener resultados confiables y reproducibles. En la actualidad existen diferentes métodos para su determinación basados en diferentes principios y que miden del fibrinógeno diferentes características propias de su naturaleza, entre ellas su condición como proteína, el hecho de ser el único factor coagulable, así como también sus propiedades antigenicas. Entre las primeras técnicas usadas y que en la actualidad es la metodología de referencia, se encuentra el método gravimétrico que se basa en convertir el fibrinógeno en fibrina, mediante la adición de cloruro de calcio y/o trombina. Una vez que el coágulo se ha formado se seca, se pesa y se deduce la concentración de fibrinógeno según el peso del coágulo y el volumen del plasma utilizado, sin embargo este es un método que consume mucho tiempo por lo que es raramente requerido en la práctica clínica⁽⁴⁾. Entre otras metodologías se encuentra el método funcional de Clauss, este mide el tiempo de coagulación de un plasma diluido al agregarle una cantidad estandarizada de trombina, lo que quiere decir que posee una concentración baja en fibrinógeno que actúa como sustrato, y una alta concentración de trombina, esto lo hace muy sensible a cambios en la concentración de fibrinógeno, pero relativamente insensible a los cambios de concentración de trombina, siendo entonces los tiempos de coagulación inversamente proporcional a la concentración de fibrinógeno. Este método permanece como metodología de rutina para la investigación y monitoreo del tratamiento de desórdenes de sangramiento con bajas concentraciones de fibrinógeno plasmático.⁽⁴⁾⁽⁵⁾ También existen los llamados métodos turbidimétricos y métodos inmunológicos, el primero mide la cantidad de fibrinógeno que precipita por acción de sales como sulfato de amonio o sulfato de sodio, se determina turbidimétricamente a una longitud de onda determinada y se compara con el grado de turbidez producida por un patrón tratado en iguales condiciones que el plasma, mientras que en el segundo, se detectan determinantes antigenicos relacionados con el fibrinógeno, en presencia de anticuerpos anti-fibrinógeno, detección que se realiza por nefelometría, inmunoelectroforesis o metodologías tipo Elisa.⁽⁵⁾ Actualmente una de las metodologías disponibles y frecuentemente empleada es el método Derivado del Tiempo de Protrombina (dPT), este no mide directamente la concentración de fibrinógeno, pero la calcula a través de una curva de coagulación a partir del PT en coagulómetros foto-ópticos, esta determinación la realiza midiendo la diferencia de la luz dispersada al final de la reacción y antes de la transformación de fibrinógeno en fibrina, esto proporciona los valores de la curva de calibración que son correlativos con la cantidad de fibrinógeno presente en la muestra. Los ensayos derivados del PT son ampliamente usados, debido a que son menos costosos y además no añaden un costo adicional al generado por el Tiempo de Protrombina. Sin embargo diferentes estudios han demostrado que sus resultados varían ampliamente con los analizadores y reactivos, mostrando discrepancias con los ensayos

de tiempo de coagulación para muestras con niveles de fibrinógeno altos o bajos. Tomando en cuenta que este parámetro es calculado a partir de la cinética de coagulación que presenta otra prueba de laboratorio como es el Tiempo de Protrombina, que puede estar alterado a su vez en una serie de condiciones entre las que cabe mencionar deficiencias de algún factor de la coagulación o el tratamiento con anticoagulantes orales, se decidió comparar los niveles obtenidos de fibrinógeno por esta metodología ampliamente usada en nuestros laboratorios con la metodología de referencia, en el caso de pacientes bajo tratamiento con anticoagulantes orales.

Objetivos

General: Comparar los valores de fibrinógeno obtenidos por el método derivado del PT con los valores de fibrinógeno obtenidos a través del método gravimétrico o de referencia, en personas aparentemente sanas y en pacientes que se encuentran bajo tratamiento con anticoagulantes orales.

Específicos: Evaluar la exactitud de los valores de fibrinógeno obtenidos con el método derivado del PT en individuos normales y en pacientes bajo tratamiento anticoagulante oral.

Determinar la precisión de los valores de fibrinógeno obtenidos con el método derivado del PT en personas normales y en pacientes bajo tratamiento anticoagulante oral.

Establecer si el método derivado del PT puede ser recomendado como método de rutina para la determinación de la concentración de fibrinógeno en pacientes bajo tratamiento de anticoagulantes orales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se conformaron dos muestras de pacientes: 30 individuos aparentemente sanos sin antecedentes de haber padecido trastornos hemorrágicos y/o trombóticos, estudiantes de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela; y 85 pacientes con antecedentes trombóticos que se encontraban bajo tratamiento con anticoagulantes orales, con niveles de anticoagulación dentro del rango esperado (INR entre 2 y 4) y con niveles por encima y por debajo de dicho rango, todos ellos pacientes que acudieron a la consulta de trombosis del Banco Metropolitano de Sangre del D.C. y edades similares al grupo control. A cada uno de ellos se le extrajo sangre venosa, utilizando como anticoagulante el citrato trisódico 0,109M en proporción de 1 volumen de anticoagulante por 9 volúmenes de sangre; posteriormente se centrifugaron las muestras de sangre a 1500 g por 15 min con el fin de obtener plasma pobre en plaquetas. En todos los casos descritos anteriormente, previo a la toma de muestra se explicó a las personas acerca del alcance de la investigación y se le suministró para su firma el debido consentimiento informado.

Metodologías: Todas las muestras fueron procesadas por duplicado utilizando ambas metodologías de estudio. Para la realización de la técnica de fibrinógeno derivado del tiempo

de protrombina se empleó el equipo ACL 100 de la casa IL, para su funcionamiento se siguieron las recomendaciones del fabricante de reactivos; para su calibración se utilizó el calibrador suministrado por la casa comercial y cada día era chequeada la reproductibilidad de la metodología a través de un control comercial igualmente suministrado por la compañía fabricante de los productos. En relación al método de referencia o gravimétrico: Un mililitro de plasma pobre en plaquetas se hizo coagular con la adición de 1 ml de cloruro de calcio 0,025M, luego de 30 minutos de incubación a 37 grados centígrados, se procedió a la remoción de la fibrina formada con la utilización de varillas de vidrio. Posteriormente el coágulo se lavó en agua destilada, se separó de la varilla, se secó y se colocó en acetona por 10 minutos para su deshidratación. Por último se pesó y se dedujo la concentración de fibrinógeno. Para pesar los coágulos se utilizó una balanza analítica d=0,1 mg. Explorer Chaus. USA, dicha balanza fue previamente calibrada y chequeada por el Fondo de Desarrollo Metrológico adscrito al Servicio Autónomo Nacional de Normalización, Calidad, Metrología y Reglamentos Técnicos (SENCAMER), organismo encargado por el estado para las calibraciones metrológicas. El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa SPSS 12.0 y Hoja de Calculo en Excel, todos bajo ambiente Windows. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para verificar la normalidad de los diferentes grupos en estudio. Seguidamente se utilizaron dos herramientas estadísticas para medir la exactitud y precisión del método a investigar, realizando la Prueba T de Student para la exactitud y la prueba Anova para medir precisión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la concentración de fibrinógeno determinada por los métodos en estudio se obtuvieron de los dos grupos, el primero comprendía 30 individuos aparentemente sanos sin antecedentes de haber padecido trastornos hemorrágicos y/o tromboticos, y un segundo grupo de 85 pacientes que se encontraban bajo tratamiento con anticoagulantes orales, los cuales se agruparon a su vez en tres subgrupos en base a el nivel del INR, que comprendían a 33 pacientes con $\text{INR} < 2,00$, 50 pacientes con INR de 2,00 a 4,00 y 2 pacientes con $\text{INR} > 4,00$. Con respecto a este último subgrupo, los resultados obtenidos se excluyeron del estudio debido a que se consideró de bajo interés estadístico el tamaño muestral, ya que se hizo muy difícil obtener muestras de pacientes anticoagulados orales con un rango por arriba de los valores de INR terapéutico. En la Tabla 2, se resume en estadísticos descriptivos, los valores obtenidos de fibrinógeno en individuos aparentemente sanos y en pacientes anticoagulados oralmente, realizados por el método derivado del PT y el método gravimétrico.

Tabla 2. Indicadores descriptivos de los valores de Fibrinógeno en individuos sanos y en pacientes anticoagulados orales realizado por el Método Derivado del PT y el Método Gravimétrico

ESTADÍSTICO	Concentración de fibrinógeno (g/L)			
	IAS		TPBTA	
	FDPT	FR	FDPT	FR
Media	3.4073	2.8060	4.4786	3.5774
Desviación Estándar	± 0.7336	± 0.4771	± 1.2529	± 0.8573

IAS= Individuos aparentemente sanos, TPBTA= Total de pacientes anticoagulados.
PBTA FDPT= Fibrinógeno Derivado del PT FR= Fibrinógeno de Referencia

Al observar los resultados obtenidos entre los dos grupos se observó que los valores de los indicadores descriptivos conseguidos por el método derivado del PT son mayores que los del método de referencia, diferencia que puede evidenciarse al observar los Gráfico 1 y Gráfico 2. En ambos Gráficos se observa que los valores de fibrinógeno obtenidos por el método derivado del PT son sobreestimados con respecto a los valores de fibrinógeno obtenido por el método de referencia. Estas diferencias son más notorias en pacientes bajo tratamiento anticoagulante que en individuos aparentemente sanos.

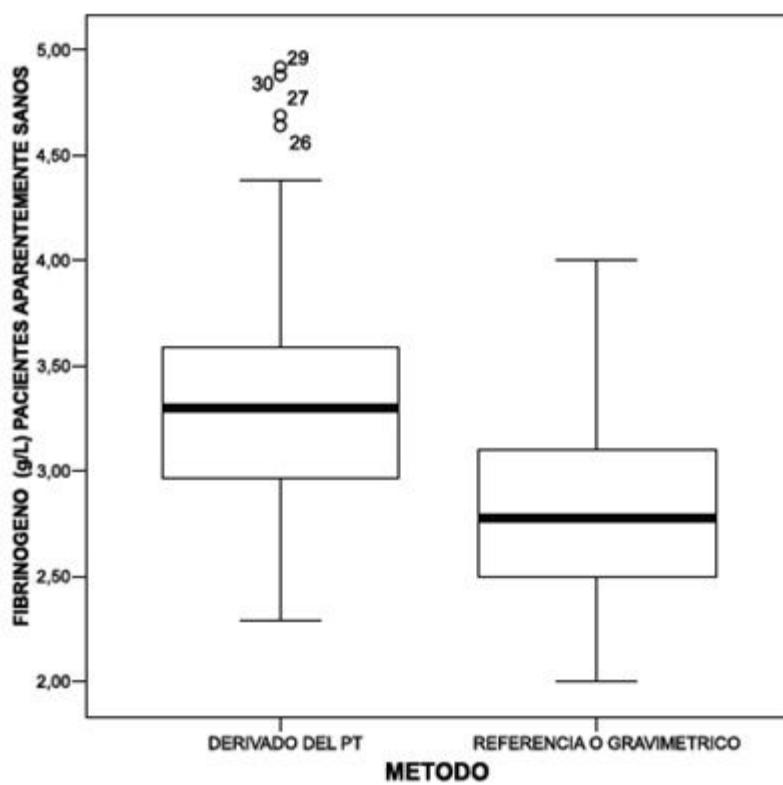
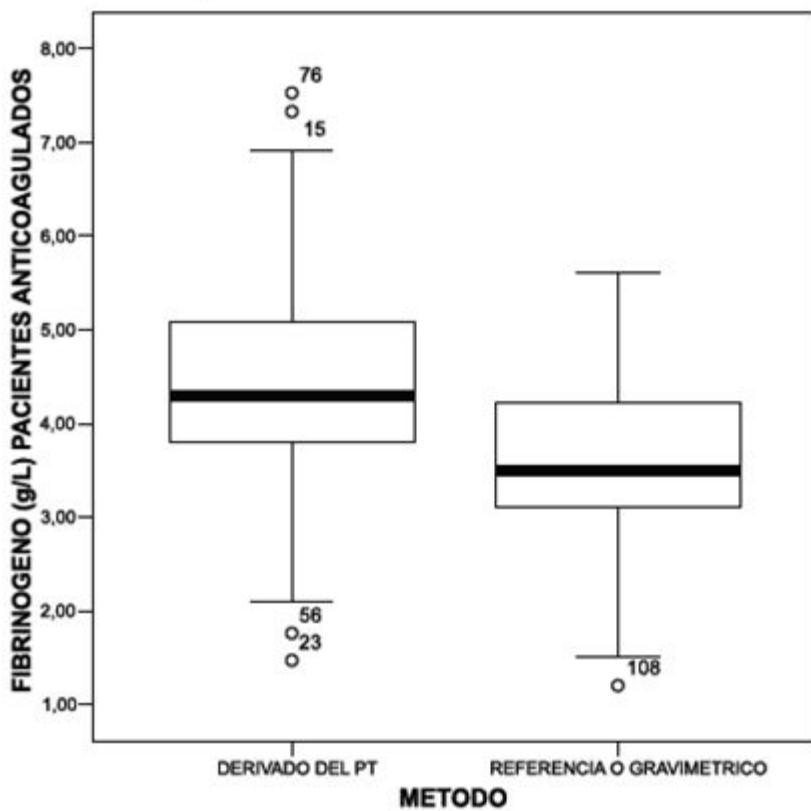


Gráfico 1. Fibrinógeno Derivado del PT (g/L) vs Fibrinógeno referencia (g/L) en individuos aparentemente sanos

Grafico 2. Fibrinógeno Derivado del PT (g/L) vs Fibrinógeno referencia (g/L) en pacientes anticoagulados orales



Con la intención de conocer la normalidad de las distribuciones de datos, se aplicó la prueba Kolmogorov-Smirnov, para decidir el uso de estadística paramétrica o no paramétrica en las sucesivas comparaciones. En la Tabla 3 se presentan los resultados del p valor obtenido. Según esto, todos los grupos presentan un $p > 0.05$ lo que nos indica que se ajustan a esta condición de normalidad, permitiendo de esta forma aplicar las pruebas paramétricas en esta investigación.

Tabla 3. Prueba de Kolmogorov-Smirnov aplicada a los diferentes grupos en estudio

PACIENTES	n	p Valor	
		FDPT	FR
IAS	30	0.363	0.895
TPBTA	85	0.306	0.692
PBTA INR < 2,00	33	0.961	0.699
PBTA INR 2,00 a 4,00	50	0.238	0.994

n= Número de individuos, IAS= Individuos aparentemente sanos, TPBTA= Total de pacientes anticoagulados, PBTA INR < 2 = Pacientes anticoagulados con INR<2 , PBTA INR 2 a 4 = Pacientes anticoagulados con INR de 2 a 4 FDPT= Fibrinógeno Derivado del PT FR= Fibrinógeno de Referencia

Para comparar ambos métodos se empleo en primer término la prueba t, con el objeto de estimar la exactitud del método derivado del PT comparado con el método gravimétrico de referencia. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos al comparar el fibrinógeno por ambos métodos en todos los grupos de individuos de este estudio.

Tabla 4. Fibrinógeno Derivado del PT (g/L) vs Fibrinógeno referencia (g/L) en individuos y pacientes en estudio, por diferente métodos estadísticos

ESTADÍSTICO	p Valor		
	PBTA		IAS
	INR <2,00	INR 2,00 a 4,00	
Prueba T	0,000	0,000	0,000

n= número de Individuos, IAS= Individuos aparentemente sanos, PBTA= Pacientes bajo tratamiento anticoagulante, INR=Razón Internacional Normalizada

Para todos los grupos de individuos de este estudio (individuos aparentemente sanos, pacientes anticoagulados con INR <2,00 y pacientes anticoagulados con INR entre 2,00 a 4,00) se obtuvo un p=0,00, lo que significa que existe diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos por ambos métodos (p<0,05). Esta diferencia habla de la inexactitud de la determinación de fibrinógeno derivado del PT por el equipo ACL 100 con respecto al fibrinógeno determinado por el método de referencia en individuos aparentemente sanos y en pacientes anticoagulados con INR menor a 4,00. Sucesivamente, utilizamos Anova con el objeto de estimar la precisión del método derivado del PT comparado con el método de referencia. La Tabla 5 resume nuestros resultados.

Tabla 5. Fibrinógeno Derivado del PT (g/L) vs Fibrinógeno referencia (g/L) en individuos y pacientes en estudio, por diferente métodos estadísticos

ESTADÍSTICO	p Valor		
	PBTA		IAS
	INR <2,00	INR 2,00 a 4,00	
Anova	0,000	0,052	0,000

IAS= Individuos aparentemente sanos, PBTA= Pacientes bajo tratamiento anticoagulante, INR=Razón Internacional Normalizada

Para los grupos de individuos aparentemente sanos y pacientes anticoagulados con INR <2,00 se obtuvo como resultado un p=0,000, por lo que el Fibrinógeno derivado del PT revela diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) con respecto a la variabilidad del fibrinógeno calculado por el método de referencia, lo que hace pensar que además de inexacto el fibrinógeno derivado del PT es poco preciso, al ser comparado con el método de referencia en individuos aparentemente sanos y en pacientes anticoagulados con INR menor a 2,00. En pacientes anticoagulados con INR entre 2,00 a 4,00 obtuvimos un p=0,052, revelando que no existía diferencia estadísticamente significativa (p>0,05) entre ambos métodos (Tabla 5), pero al encontrarse el valor estadístico justo en el valor critico, se puede considerar que el método posee poca precisión, además de ya haber sido declarado como inexacto. Este estudio coincide con los resultados obtenidos por A. Chitolie y colaboradores, Sobas y colaboradores y por P. Llamas y colaboradores^(6,7,8) en el cual llegaron a la conclusión que en el grupo de pacientes tratados con anticoagulantes orales existía una diferencia significativa entre los dos métodos utilizados para la determinación de Fibrinógeno, conclusión a la cual se llegó porque los análisis demostraron que el método derivado del PT sobreestimaba la concentración de Fibrinógeno en comparación con el método de Clauss,

que aunque no es el método de referencia para la determinación de Fibrinógeno es el método que se usa de rutina en los laboratorios clínicos, encontrando de esta forma resultados similares a los obtenidos en este estudio. A pesar del grado de acuerdo encontrado entre este estudio y el de investigaciones que lo precedieron, se tuvo discrepancia con respecto a los resultados que ellos obtuvieron en relación a la determinación de fibrinógeno en individuos aparentemente sanos, donde encontraron que si existía en ese caso buena correlación entre ambos métodos, mientras que en este estudio los resultados fueron diferentes. Contrario a los resultados que ellos obtuvieron, en este estudio se observó una falta de exactitud y precisión del método derivado del PT con respecto al método de referencia en ambas poblaciones estudiadas, lo que hace incluso suponer que ese comportamiento del método en estudio es propio del principio empleado para la determinación del fibrinógeno y de ninguna manera parece ser el resultado de la alteración de la prueba de base (tiempo de protrombina).

Conclusiones: Un método ideal para medir la concentración de fibrinógeno debe caracterizarse por ser exacto, preciso, sensible y específico. Para que de esta manera se pueda garantizar que los resultados emitidos a un paciente sean de calidad y reflejen su condición real de salud, y aportar al clínico datos confiables para establecer un diagnóstico, monitoreo y seguimiento de alguna enfermedad de base que presente. Mediante este trabajo se comparó uno de los métodos más usado en los laboratorios clínicos actualmente para determinar la concentración de fibrinógeno como es el método derivado del PT con respecto al método de referencia, basándose principalmente en su nivel de exactitud y precisión, se demostró que el primero con respecto al segundo es un método inexacto e impreciso, tanto para individuos aparentemente sanos sin antecedentes hemorrágicos ni tromboticos, así como en pacientes que se encuentran bajo tratamiento de anticoagulantes orales con diferentes estados de anticoagulación; por lo que concluimos que no recomendamos que sea utilizado en el laboratorio de rutina sin restricciones, ya que no proporciona una medida confiable en los niveles de fibrinógeno

REFERENCIAS

- 1.- Enciclopedia Iberoamericana de Hematología. Vol III. 1^a edición: Editorial Universiada de Salamanca; 1992.
- 2.- Perez R, J.L. Hematología Basica. 2^a edición. Caracas: Editorial Calcusa; 1987.
- 3.- British society of hematology. Guidelines on fibrinogen assays. British journal of haematology, 2003. 121, 396-404
- 4.- Catedra de hematología. Guía práctica de hematología II. 1^a edición: Caracas, DC; 2006.
- 5.- Grupo Cooperativo Latinoamericano de Hemostasia y Trombosis. Manual de hemostasia y trombosis. Argentina; 1990.
- 6.- Chitolie A, Mackie IJ, Grant D, Hamilton JL, Machin SM. Inaccuracy of the 'derived' fibrinogen measurement. Blood Coagul Fibrinolysis. 1994 Dec; 5 (6):955-7.
- 7.- Sobas F, Hanss M, Ffrench P, Trzeciak MC, Dechavanne M, Negrer C. Human plasma

fibrinogen measurement derived from activated partial thromboplastin time clot formation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2002 Jan;13(1):61-8.

8.- Llamas P, Santos ABM Outeríño J, Soto C, Tomás JF. Diagnostic utility of comparing fibrinogen Clauss and prothrombin time derived method. *Thromb Res*. 2004; 114 (1):73-4.

9.- Woodward M, Hoffmeister A, Koenig W, Lowe GD. Comparison of plasma fibrinogen by Clauss, prothrombin time-derived, and immunonephelometric assays in a general population: implications for risk stratification by thirds of fibrinogen. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003 Feb;14(2):197-201.

10-. McKenzie, Shirlyn B. Hematología Clínica. 2^a edición. México, D.F: Editorial El Manual Moderno; 2000.

11.- Arguelles L. Fundamentos de Hematología 3^a Edición: Editorial Panamericana; 2003

12.- Guido, Osorio. Hematología diagnostica y terapéutica. 2^a edición: Editorial Mediterraneo; 1997.

13.- Canseco Ávila LM, Jerjes Sánchez C, Ortiz López R, Rojas Martínez A, Guzmán Ramírez D. Fibrinógeno. ¿Factor o indicador de riesgo cardiovascular?. *Arch Cardiol Mex* 2006; 76 Supl(4): 158-172.

14.- D'Angelo A, Seveso MP, D'Angelo SV, Gilardoni F, Macagni A, Manotti C, Bonini P. Comparison of two automated coagulometers and the manual tilt-tube method for the determination of prothrombin time. *Am J Clin Pathol* 1989 Sep;92(3):321-8.

15.- Palareti G, Maccaferri M, Manotti C, Tripodi A, Chantarangkul V, Rodeghiero F, Ruggeri M, Manunucci PM. Fibrinogen assays: a collaborative study of six different methods. C.I.S.M.E.L. Comitato italiano per la standardizzazione dei metodi in ematologia e laboratorio. *Clin Chem*. 1991 May;37(5):714-9

16.- Castillo JB, Farag AM, Mammen EF, Sachs RJ. Prothrombin times and clottable fibrinogen determination on an automated coagulation laboratory (ACL-810). *Thromb Res*. 1989 Jul 15;55(2):213-9