

EL USO DE REACTIVOS ESTANDARIZADOS Y EL CONTROL DE CALIDAD EN EL METODO PARA EL TIEMPO DE PROTROMBINA

Alberto Barrantes B.*

Key Words: Prothrombin time test, indications.

Resumen

La técnica del tiempo de protrombina ha sido descrita y usada desde 1935. Presenta una serie de inconvenientes que es necesario solventar para poder tener seguridad en el reporte. Tres condiciones son las responsables de las variaciones que presenta la prueba: la tromboplastina, la expresión de los resultados y la ejecución de la prueba. La tromboplastina que se debe usar para obtener resultados adecuados y confiables debe ser estandarizada contra una tromboplastina de referencia. Por otra parte, la toma y manejo de la muestra debe ser de tal forma que logre preservar el sistema de la coagulación que consiste de enzimas y proenzimas, fácilmente activadas o desnaturalizadas. Por esto, la sangre debe ser tornada cuidadosamente con jeringa de plástico y aguja de gran calibre; el plasma se debe mantener a temperatura ambiente en tubos tapados; la temperatura de reacción debe ser de 37°C. A la vez, para tener seguridad de los resultados, se debe usar citrato de sodio al 3,13 por ciento como anticoagulante, se deben hacer todas las pruebas en duplicado y se deben incluir normales cada día. (Rev. Cost. Cienc. Méd. Jun. 1982, 3(1):41 — 50).

Introducción

En 1935, Quick *et al.* (33) describieron una prueba para cuantificar protrombina, llamada por mucho tiempo prueba de Quick y ahora simplemente conocida como la prueba del tiempo de protrombina. Este trabajo de Quick sobre el tiempo de protrombina, fue enviado a ocho revistas antes de que un editor estuviera de acuerdo con publicar algo que no era congruente con las teorías de la coagulación existentes en esa época en los Estados Unidos (19).

Quick simplemente añadía una tromboplastina potente y luego calcio a plasma oxalatoado, y medía el tiempo de coagulación. Ambas etapas - la formación de trombina y la coagulación de fibrinógeno- son simultáneas. Para que coagule en un tiempo normal es necesario que los factores I, II, V, VII y X se encuentren en concentraciones normales. Por lo tanto, un tiempo de protrombina prolongado con relación al tiempo de protrombina de un plasma normal, indica disminución de uno o varios de los factores que intervienen en el sistema extrínseco, presencia de inhibidores específicos de esos factores o presencia de inhibidores tipo heparina que inhiben, entre otras, la acción de la trombina.

Los desórdenes hereditarios de la coagulación generalmente son únicos, falta un solo factor; en cambio en las deficiencias adquiridas más de un factor es el deficiente. Por otra parte, el tiempo de protrombina no demuestra la misma sensibilidad a todos los factores. Es más sensible a las deficiencias de factor VII y de factor X y menos a las de II y I.

A su vez, los anticoagulantes orales derivados de la cumarina actúan como antagonistas de la vitamina K y causan una disminución—dosis dependiente—de la actividad de los factores del complejo protrombínico. En un principio se creyó que existía un bloqueo de la síntesis a nivel hepático, pero actualmente se sabe que los factores son sintetizados en

* Laboratorio de Investigación Clínica. Hospital México, CCSS.

concentraciones normales pero en una forma biológicamente inactiva, incapaz de unir iones de calcio (27). Estos factores son los denominados PIVKA (proteína inducida por los antagonistas de la vitamina K) que actúan como inhibidores competitivos, aun cuando toman parte en ciertas interacciones con otros factores de la coagulación (16).

La ejecución del tiempo de protrombina conlleva una serie de problemas técnicos, razón por la cual es una de las pruebas que más interés ha despertado entre la gente que se dedica a la coagulación.

Desde la década de los 60 se ha intentado solventar en varias formas estos problemas llevando a cabo encuestas de control (21, 22). estandarización de las técnicas (7, 10, 23, 24), calibración de tromboplastina (3) y estudios comparativos entre diferentes tromboplastinas (20, 30, 31), lo que ha ayudado a obtener datos suficientes para evaluar la magnitud de los problemas y los inconvenientes que presenta la técnica en sí.

Existen tres condiciones que son las responsables de las variaciones que pueda tener esta prueba, tanto en su ejecución como en su reporte; a) la tromboplastina, es el principal reactivo usado y al contrario de lo que se pueda pensar no es un reactivo u uniforme; b) la expresión de los resultados, existen en este momento hasta cinco formas de expresarlos; y c) la ejecución de la prueba, influenciada en toda su extensión por diferentes factores, de origen personal, los reactivos, métodos y equipo (6).

La tromboplastina es el principal reactivo usado en la prueba, y, como se sabe, no es un reactivo uniforme. Puede ser extraída de órganos tales como cerebro, pulmón, placenta e hígado, tanto de animales como del hombre, existiendo decenas de métodos usados para su preparación. Como consecuencia de esa variabilidad, la reactividad de las tromboplastinas es muy diversa y depende de su fuente de origen y del método empleado para su producción.

Las preparaciones de pulmón son poco satisfactorias debido a que se contaminan con factor VII durante la extracción y preparación del tejido (9).

En general, las preparaciones de cerebro humano muestran mejor sensibilidad al defecto inducido por la terapéutica anticoagulante que aquellas preparaciones de cerebro de conejo (12, 29), y así se ha demostrado que es el mejor reactivo para la medición de factores extrínsecos de la coagulación (31).

Por otra parte, los inhibidores competitivos (PIVKA) dificultan la medición, evaluación e interpretación del tiempo de protrombina y afectan la valoración del estatus de la coagulación de los pacientes que reciben derivados de cumarina de tal forma que no pueden ser evaluados por medio de la curva de actividad (16). A su vez, las tromboplastinas difieren también en cuanto a su sensibilidad al PIVKA. Estos inhibidores actúan sobre el factor Xa y su efecto prolonga el tiempo de protrombina de acuerdo con la sensibilidad de la tromboplastina empleada; inhibe más las tromboplastinas de cerebro bovino, moderadamente las de cerebro humano e interfiere menos con las de cerebro de conejo.

El uso de una tromboplastina estandarizada como la tromboplastina costarricense (6)— permite que el control de los pacientes anticoagulados se pueda hacer en diferentes hospitales. Usando el rango terapéutico adecuado para cada tromboplastina -el cual se puede obtener con la tabla de Denson (10)- es posible llevar adecuadamente este control cuando se usa otro tipo de tromboplastina y se conoce la constante de calibración de esta.

Podemos afirmar, que gracias a las diferencias de sensibilidad, las distintas tromboplastinas tienden a dar resultados significativamente diferentes cuando son probadas con un mismo plasma.

Cuando se introdujo la realización del tiempo de protrombina se indicó que medía la protrombina (factor 11), y por eso se sugirió el uso de diluciones en solución salina para

expresar los resultados de la prueba, principio que también se usa ahora cuando se pretende cuantificar una sustancia única presente en un sistema, Pero posteriormente fue descubierto que nuevos factores como los I, V, VII y X son medidos por el tiempo de protrombina. Ahora se tiene no sólo un elemento, sino cinco, los cuales varían independientemente entre sí, y por lo tanto las curvas de dilución no tienen base teórica para su aplicación, aun cuando son de uso práctico más difundido.

El uso de diluciones con plasma absorbido, que pretende compensar la dilución del factor V y del fibrinógeno que sucede con el uso de salina, introduce otras variables en la prueba dependiendo de la mayor o menor absorción de los factores K dependientes (12).

Paralelamente al uso de las curvas de dilución (resultados en porcentaje) se han introducido otros métodos para expresar los resultados del tiempo de protrombina, entre ellos el cociente del tiempo de protrombina (tiempo de coagulación del paciente entre tiempo de coagulación de un control normal), el índice de protrombina (tiempo de coagulación de un control normal entre tiempo de coagulación del paciente) y el reporte en segundos. Sumando a estos los porcentajes obtenidos con curvas salinas y de plasma absorbido tenemos cinco formas de representar los resultados, cada uno expresando un tipo de dato y cada uno necesitando una interpretación diferente.

El uso del cociente del tiempo de protrombina tiene la gran ventaja de ser simple, rápido e independiente del sistema de la prueba y de los reactivos usados (16). Este cociente indica deficiencias de factor VII o factor X y define el rango terapéutico del tratamiento anticoagulante.

Los intentos de estandarización han seguido tres criterios principales -- sin llegarse a un resultado definitivo--: el suministro centralizado de un tipo único de tromboplastina, el empleo de preparaciones de referencia estables de los principales tipos de tromboplastinas y el uso de plasmas de referencia (8),

Los estudios internacionales han confirmado que con el uso del cociente del tiempo de protrombina se pueden relacionar en forma reproducible los resultados obtenidos en distintos laboratorios al medir la actividad de las tromboplastinas de referencia liofilizadas; y así se ha establecido una relación entre varias tromboplastinas ampliamente utilizadas y una sola preparación de referencia (8).

Para calibrar una tromboplastina con respecto a otra, hay que determinar la relación entre los resultados obtenidos con las dos tromboplastinas en pruebas paralelas realizadas con plasmas normales y cumarinizados (6, 11). Con este método de calibración, se determinan los tiempos de protrombina haciendo reaccionar paralelamente la tromboplastina problema y la tromboplastina de referencia con varios plasmas normales y con un número mayor de plasmas cumarinizados. Cuando se inscriben gráficamente los cocientes, del tiempo de coagulación del plasma cumarinizado entre el tiempo de coagulación normal medio - obtenidos con cada una de las dos tromboplastinas, resulta una línea recta que permite calibrar una tromboplastina en función de la otra. La manera más sencilla de obtener la línea de calibración consiste en dibujar una recta que una el punto (1,1) con el punto que representa el cociente medio obtenido con cada tromboplastina.

Para llevar a cabo este tipo de calibración, se puede usar la British Comparative Thromboplastin (BCT) que es una tromboplastina de referencia preparada por L. Poller en Manchester y que está sujeta a constantes controles de calidad por el British Committee for Standards in Haematology (17) para asegurar su estabilidad. Se usa esta BCT en Gran Bretaña para calibrar tanto las tromboplastinas comerciales como las preparadas en los laboratorios de los hospitales locales.

Como nuestro laboratorio forma parte del International Study Group for Anticoagulant Control, a partir de 1976 se comenzó a preparar una tromboplastina de acuerdo con las recomendaciones de L. Poller (6, 28). Además, se tuvo la oportunidad de contar con la BCT que sirve de tromboplastina de referencia, lo que permitió estandarizar los métodos y la tromboplastina, y participar en encuestas internacionales de control de calidad promovidas por el Grupo. Al contarse con esta tromboplastina preparada en el país, se propuso un programa de control de calidad para el tiempo de protrombina (4), para que sea desarrollado en el país y se pueda llevar a cabo la estandarización de la tromboplastina y el método, además de la uniformidad en la expresión de los resultados.

La estandarización del tiempo de protrombina es pues una necesidad, y al existir un sistema único de salud, se puede utilizar un solo tipo de tromboplastina y un solo método. Esta tromboplastina es preparada bajo las condiciones y requerimientos obligatorios, con controles periódicos para poder garantizar la sensibilidad, reproductibilidad y, en un todo, la calidad de la misma.

Asimismo, para el control de la anticoagulación oral se puede mantener al paciente dentro del rango convencional terapéutico recomendado por el British Anticoagulant Panel en 1977 —o sea, un cociente de 2 a 4 con la BCT— utilizando los cocientes correspondientes con la tromboplastina estandarizada localmente. Esto permitirá obtener buena anticoagulación y a su vez obviar los problemas de sangrado por exceso.

Las muestras de sangre para el tiempo de protrombina y para estudios de la hemostasia en general, deben ser obtenidas de tal manera que se preserve la integridad de todos los factores plasmáticos de la coagulación.

El delicado sistema de coagulación consiste de enzimas y proenzimas que son fácilmente activadas o desnaturalizadas. En la sangre que es obtenida lentamente o con dificultad, el mecanismo de la coagulación puede ser activado y las pruebas pueden demostrar una actividad de los factores muy alta y un falso número bajo de plaquetas, muchas de las cuales pueden funcionar anormalmente. Además, si hay dificultad para obtener la sangre, se puede contaminar con tromboplastina tisular, la cual activará la serie de eventos de la coagulación, invalidándose los resultados de las pruebas. Por lo tanto, una persona experimentada, preferiblemente del laboratorio de coagulación, es la que debe obtener las muestras. El método de sangrado con dos jeringas se usa para obtener la sangre para muchas pruebas de coagulación. Los primeros mililitros son recogidos en una jeringa y descartados o usados para pruebas no afectadas por la tromboplastina tisular. La sangre obtenida en la segunda jeringa se usa para llevar a cabo las pruebas de coagulación.

Se deben usar jeringas plásticas o siliconizadas para recoger la sangre. No se recomienda usar tubos al vacío pues pueden dar volúmenes no deseables y además producir espuma, accidente que desnaturaliza el fibrinógeno y los factores V y VIII. Luego de la venocleisis se debe colocar la jeringa pegada a la pared del tubo y dejar correr la sangre evitando la formación de espuma o de una turbulencia excesiva (34), y mezclar la sangre por inversión suave, ya que las proteínas de la coagulación se pueden desnaturalizar por mezcla vigorosa. La sangre para el tiempo de tromboplastina parcial (TTP) y ensayo de factores específicos —con la excepción del factor VII— se debe centrifugar a 4-10°C y mantener en hielo hasta el momento que se hagan las pruebas. El frío, sin embargo, activa la caliceína en los plasmas de muchas mujeres que toman anticonceptivos orales causando una activación del factor VII varias veces su nivel normal (13). Por lo tanto, la sangre para el tiempo de protrombina, factor VII y estudios funcionales de plaquetas se debe centrifugar y mantener tapada a temperatura ambiente hasta que se hagan las pruebas.

La sangre y el plasma se deben mantener en tubos plásticos, y todo el manipuleo se debe hacer con pipetas plásticas. Las superficies de vidrio activan la secuencia de la coagulación, invalidándose por lo tanto los resultados de muchas pruebas.

Se recomienda el uso de citrato de sodio 3,13 por ciento para anticoagular la sangre para todas las pruebas de coagulación, excepto para aquellas en las cuales se indique otra concentración. El citrato de sodio es superior al oxalato de sodio por varios motivos. Uno de los más importantes es que los factores V y VIII son más estables en citrato que en oxalato (2).

El agua destilada y desionizada se usa en las pruebas y en la preparación de los reactivos. Agua con pH alto prolonga los resultados si el sistema no está apropiadamente amortiguado (Gráfico 1). Los anticoagulantes preparados con agua que contiene amonio causan rápido deterioro del factor V, prolongando el tiempo de protrombina.

La tromboplastina, solución amortiguadora y anticoagulante se debe mantener en refrigeración: el cloruro de calcio y el agua a temperatura ambiente. Los tubos para las pruebas y para mantener el plasma deben estar limpios y sin quebraduras. El lavado ácido se considera como el mejor método para la cristalería que se utiliza en los estudios de coagulación. La cristalería debe ser luego apropiadamente lavada para remover todas las trazas de ácido debido a que puede cambiar el pH del plasma. La cristalería descartable y de plástico es muy útil. La cristalería siliconizada se debe mantener separada de la no siliconizada.

Es importante hacer en forma manual la detección del punto final, pues estudios realizados por Poller *et al.* (32) han demostrado que muchos de los instrumentos dan valores de tiempo de protrombina más cortos que usando la técnica manual. El efecto práctico de esta diferencia se reduce con el uso del cociente del tiempo de protrombina, pero esto no elimina los problemas que dan ciertas marcas de instrumentos. A su vez, en este estudio se vio que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los resultados manuales de aquellos hospitales que usaban instrumento y aquellos centros que regularmente llevaban a cabo la técnica manual. Esto confirma la validez de la diferencia entre los dos métodos en prueba.

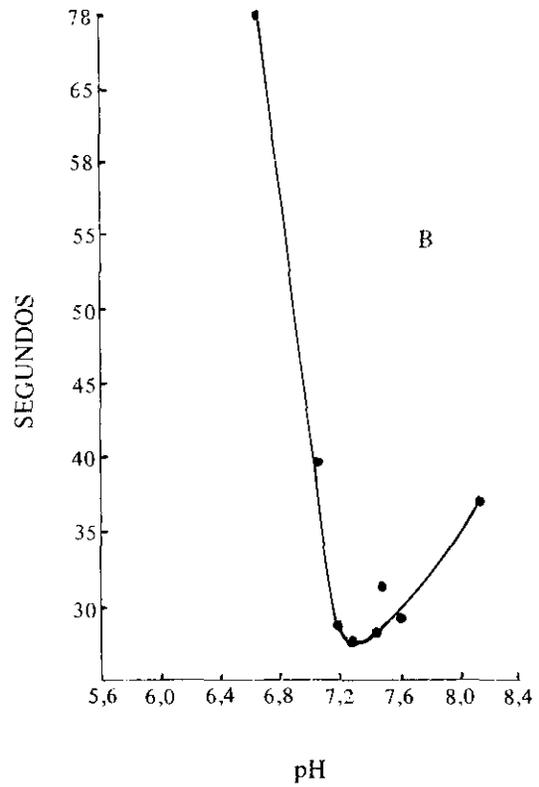
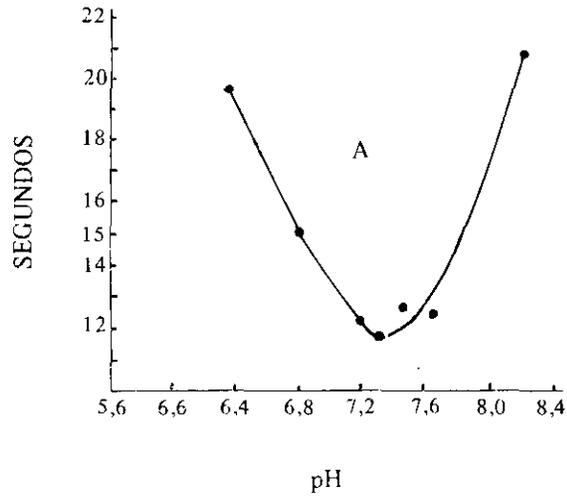
La detección del punto final requiere un baño de agua a temperatura controlada y un reloj cronómetro. La temperatura del agua debe ser de $37 \pm 1^\circ\text{C}$. La desviación de la temperatura alrededor de este rango prolonga el tiempo de protrombina de plasmas tanto normales como anormales (26) (Gráfico 2). La tasa de cambio aumenta conforme aumenta la desviación, por eso cuando el tubo con la mezcla es removido del baño, la tasa rápida de enfriamiento puede introducir grandes errores.

Muchas variaciones en los resultados de las pruebas son causadas por defectos en las técnicas. Variaciones mínimas en las técnicas, reactivos, temperatura y pH producen variación sustancial en los resultados de las pruebas (35). El tiempo de incubación y la temperatura son parámetros críticos en el tiempo de protrombina (1). El plasma no debe ser mantenido a 37°C por más de 10 minutos y la tromboplastina por un tiempo mayor de 15 minutos.

Los errores de dilución causan resultados variables. La proporción de sangre y anticoagulante debe ser exacta (9:1). Pacientes con un hematocrito muy alto tienen erróneamente tiempos de protrombina prolongados debido a la alta concentración de citrato en el plasma. Después de que las muestras son centrifugadas, el volumen de células empacadas se anota y las muestras de pacientes con un hematocrito muy alto deben ser tomadas de nuevo con una cantidad menor de citrato. Se puede usar la siguiente fórmula para calcular los mililitros de citrato necesarios para un volumen final de 5 ml: $(100-Ht)0,5/55$.

GRAFICO 1

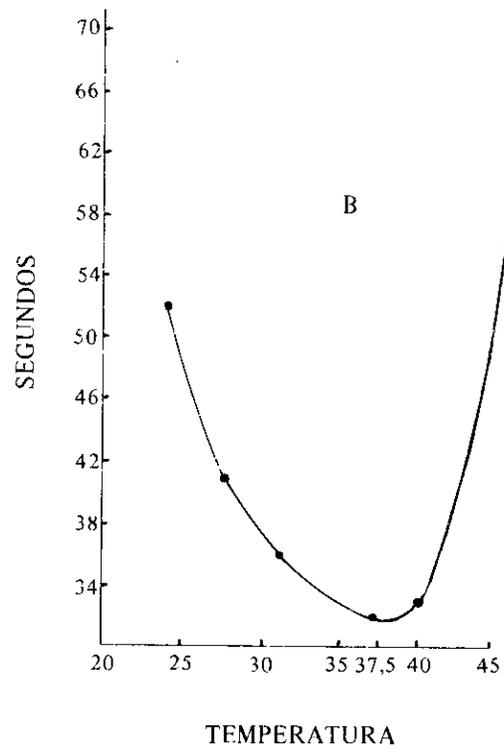
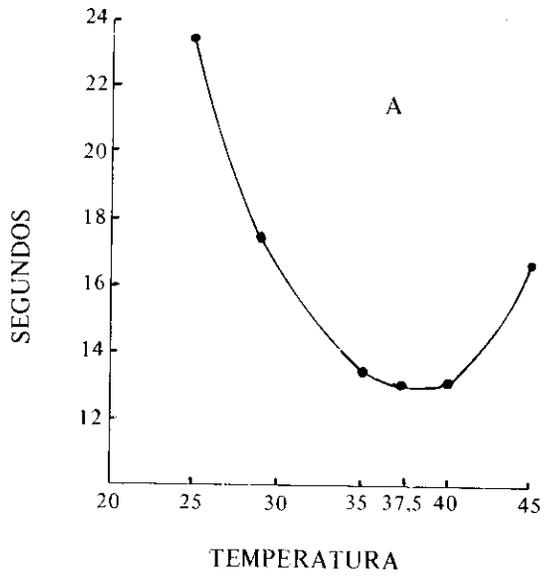
EFFECTO DEL pH DE LA MEZCLA DE REACCION SOBRE EL TIEMPO DE PROTROMBINA DE UN PLASMA NORMAL (A) Y UN PLASMA ANORMAL (B)



Modificado de:
Miale, J. B. *et al.*
Lab. Med. 10:612, 1979

GRAFICO 2

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL TIEMPO DE PROTROMBINA DE UN PLASMA NORMAL (A) Y UN PLASMA ANORMAL (B)



Modificado de:
Miale, J. B. *et al.*
Lab. Med. 10:612, 1979

A pesar de todas las precauciones, los reactivos biológicos y los plasmas cambian durante el período de trabajo. Es sensato, por lo tanto, evitar tales cambios efectuando la prueba apropiadamente (15, 18).

Controles normales y cuando sea posible controles anormales, deben ser incluidos en cada ensayo. Plasmas controles normales y anormales se encuentran en el comercio o preferiblemente se pueden preparar en el propio laboratorio. Los controles caseros deben ser frescos, congelados a -70°C o liofilizados (14). Los plasmas frescos deben ser usados inmediatamente; los plasmas congelados por 3-4 meses y los liofilizados por lo menos un año. Si se desea preparar un control normal que sea representativo se debe hacer una mezcla de plasma de 10 individuos normales, 5 hombres y 5 mujeres. Para estas últimas se debe prever que no estén tomando anticonceptivos orales, puesto que esta medicación eleva los niveles de muchos de los factores de la coagulación (25).

Si el resultado del plasma control no está dentro de lo esperado, se debe probar un nuevo control. Si los resultados todavía están fuera de los límites, se deben probar nuevos viales de cada reactivo. Si los resultados no son apropiados, se debe probar el instrumento (si se usa) y la temperatura del baño. Se debe asimismo probar el pH del plasma y los reactivos. No se debe reportar ninguna muestra hasta que la medida de control esté dentro de los valores deseables.

En resumen, las siguientes medidas de control de calidad se deben determinar (5):

1. La sangre debe ser cuidadosamente tomada con jeringa de plástico y agujas de gran calibre.
2. El plasma se debe mantener a temperatura ambiente en tubos tapados y llevar a cabo las pruebas dentro de las primeras 4 horas.
3. Se debe usar citrato de sodio 3,13 por ciento para anticoagular el plasma.
4. Las instrucciones para el manejo y uso de los reactivos deben ser seguidas al pie de la letra.
5. La temperatura de reacción debe ser a 37°C y el pH de la reacción de 7,2 -- 7,4.
6. No se deben mantener los plasmas a 37°C por más de 10 minutos y la tromboplastina por más de 15.
7. Se deben hacer todas las pruebas en duplicado.
8. Se deben incluir controles normales cada día.

ABSTRACT

The prothrombin time test has been described and used since 1935. Several inconveniences must be taken into account to provide exact results. The thromboplastin, the form of expressing the results and the execution of the test itself are the variables that must be monitored. The thromboplastin must be standardized, and the sample must be drawn in such a way that enzymes and proenzymes, that are easily deactivated or denaturalized, are preserved. Therefore, plastic syringes and proper needles are used; the plasma must remain at room temperature in sealed test tubes and the test must be carried out at 37°C . The anticoagulant chosen is sodium citrate 3,13 percent, all samples must be tested twice and normal samples must be included each day.

Bibliografía

1. Alderson, M. R., Poller, L, Thomson, J. M. Validity of the British System for anticoagulant control using the national reagent. *J. Clin. Path.* 1970; 23:281—285.
2. Bairrington, J. D., Peterson, E. W. The laboratory control of anticoagulant therapy. The one stage prothrombin-time-quality control in coagulation procedures. *Am. J. Med. Tech.* 1967; 33:296-305.
3. Bangham, D. R., Biggs, R., Brozovic, M., Denson, K. W. E. Calibration of five different thromboplastins, using fresh and freeze-dried plasma. *Thrombos. Diath. Haemorrh.* (Stuttg). 1973: 20:228- 239.
4. Barrantes, A. Programa de control de calidad para el tiempo de protrombina. *Sangre*, 1979; 24:349 -357.
5. Barrantes, A. Recomendaciones para la toma de la muestra y control de calidad en el Laboratorio de Coagulación. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1980; 1:179—184.
6. Barrantes, A., Fonseca, J. E. Preparación y estandarización de una tromboplastina costarricense. *Acta Méd. Cost.* 1978:21:213-218.
7. Biggs, R., Bangham, D. R. Standardization of the one-stage prothrombin time test for the control of anticoagulant therapy. *Thromb. Diath. Haemorrh.* (Stuttg). 1971; 27:203—204.
8. Comité de expertos de la OMS en patrones biológicos, 28° informe: Normalización de la vigilancia del tratamiento anticoagulante (oral). *Serv. Inf. Téc.* 1977: 610:49—56.
9. Denson, K. W. E. Tissue extracts and their sensitivity to factor VII and factor X. *Thromb. Diath., Haemorrh.* (Stuttg). 1964: 11: 146— 154.
10. Denson, K. W. E. International and national standardization of control of anticoagulant therapy in patients receiving coumarin and indanedione drugs using calibrated thromboplastin preparations. *J. Clin. Pathol.* 1971:24:460—463.
11. Denson, K. W. E, Thromboplastin reference preparations. *Scand. J. Haemat.* 1980; 25(Supp. 37): 9-20.
12. Denson, K. W. E., Biggs, R. Laboratory diagnosis, test of clotting function and their standardization. In: Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis, 2a. ed. (ed. R. Biggs), Blackwell. 1976: 245.
13. Gjonnaess, H. Cold promoted activation of factor VII. *Thromb. Diath., Haemorrh* 1972: 28: 155—205.
14. Goldenfarb, P. Reproducibility in coagulation assays. *Am. J. Clin. Pathol.* 1971: 55:561—564.
15. Hardisty, R, M., Ingram, G. I. C. Bleeding Disorders, Investigation and Management. E.A. Davis Co., Philadelphia. 1965, 265—266.
16. Heimburger, N., Schwinn, H. The prothrombin time test according to Quick. *Medical Lab.* 1978; 5:20-29.
17. Hills, M., Ingram, G. I. C. Monitoring successive batches of British Comparative Thromboplastin, *Brit. J. Haemat.* 1973; 25:445-451.
18. Ingram, G. I. C. Blood coagulation factor VIII: Genetics, physiological control and bioassay. *Adv.. Clin. Chem.* 1965; 8:189—236.
19. Jacques, L. B. The hemostasis paradigm in 1934 and in 1980. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1981: 370:1-4.
20. Korsan-Bengtson, K. Johsen, M., Pehrsson, N. G. Comparison between British Comparative Thromboplastin (BCT) and a factor II—VII- X determination (Simplastin A) based on fresh plasma samples from dicoumarol-treated patients. *Thrombos. Haemostas* (Stuttg). 1977: 37:98— 103.
21. Leck, I., Gowland, E., Poller, L. The variability of measurements of the prothrombin time ratio in the National Quality Control trials: a follow-up study. *Brit J. Haemat.* 1974; 28:601—612.
22. Leck, I., Thomson, J. M., Poller, L. Quality control trials in the National Reference Thromboplastin scheme. *Brit. J. Haematol.* 1973: 25:453—460.

23. Loeliger, E. A., Boekhout-Mussert, M. J., Van Halem-Visser, L. P., Habbema, J. D. E. de Jorge, H. Reliability of laboratory tests for the control of oral anticoagulation: A comparative study of homemade brain thromboplastin, the British Comparative Thromboplastin, Simplastin, Simplastin A and Thrombotest. *Thrombos. Diath. Haemorrh.* 1974; 32:483—491.
24. Loeliger, E. A., Van Halem-Visser, L. P. A simplified thromboplastin calibration procedure for standardization of anticoagulant control. *Thrombos. Diath. Haemorrh.* 1975; 33: 172— 190.
25. Miale, J. B., Kent, J. W. The effects of oral contraceptive on the results of laboratory tests. *Am. J. Obstet. Gyn.* 1974; 120:264—272.
26. Miale, J. B., Kent, J. W. Standardization of the technique for the prothrombin time test. *Lab. Med.* 1979; 10:612—615.
27. Nelsestuen, G. L., Zytovicz, T. H., Howard, J. B. Gamma-carboxy glutamic acid. Identification and distribution in vitamin K-dependent proteins. *Mayo Clin. Proc.* 1974;49:941--944.
28. Poller, L. Preparation and standardization of human brain extract thromboplastin, 1975. (Comunicación personal).
29. Poller, L. A national standard for anticoagulant therapy. *Lancet.* 1967; 1:491-493.
30. Poller, L. The British system for anticoagulant control. *Thrombos. Diath. Haemorrh.*, 1975; 33:157 -162.
31. Poller, L., Thomson, J. M. The interpretation of prothrombin results. A national survey. *Brit J. Haemat.* 1969; 16:31—37.
32. Poller, L., Thomson, J. M., Yee, K. F. Automated versus manual techniques for the prothrombin time test: results of proficiency assessment studies. *Brit. J. Haemat.* 1978,38:391 —399.
33. Quick, A. J., Stanley-Brown, M., Bancroft, F. W. A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. *Am. J. Med. Sci.* 1935; 190:501—511.
34. Tocantins, L. M., Jaques, L. B., Holburn, R. R. Processing of blood, preparation of glassware and reagents. In: *Blood coagulation, haemorrhage and thrombosis* (ed. L. M. Tocantins, L. A. Kazal), Grune and Straton, N. Y. 1955; 2—28.
35. Zucker, S., Brossious, E., Cooper, G. R. One-stage prothrombin time survey. *Am. J. Clin. Pathol.* 1970;53:340—347.