

¿Trombofilia y enfermedad de Perthes?

J.M. Tusell Puigbert^a, C. Aulesa Martínez^a, M. Aguirre Canyadell^a, I. Nicolau Fusté^b, P. Valentín Valentín^b y J.J. Ortega Aramburu^a

^aHospital Materno-Infantil y ^bHospital General Vall d'Hebron. Barcelona.

(*An Esp Pediatr* 2000; 53: 12-16)

Fundamento

Se ha postulado que la causa de la enfermedad de Perthes pueda ser una trombosis intravascular condicionada por un potencial trastorno congénito de la hemostasia que conduciría a situaciones de trombofilia o hipofibrinólisis.

Pacientes y métodos

Un estudio completo de la hemostasia, que incluya factores de coagulación, estudio de la trombofilia y de la fibrinólisis en un grupo de niños con enfermedad de Perthes, podría determinar la prevalencia de trastornos de la hemostasia y fibrinólisis en este colectivo. Un grupo de 25 pacientes con edades comprendidas entre 5 y 25 años en el momento del estudio, anteriormente diagnosticados de enfermedad de Perthes, fueron sometidos a análisis de la hemostasia y trombofilia, comparando los resultados con los de un grupo control.

Resultados

Se detectaron alteraciones en la trombofilia en un solo paciente con un déficit moderado-leve de proteína S, siendo los demás casos considerados dentro de la normalidad en relación a la edad de los pacientes.

Conclusiones

Los datos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio de este grupo de pacientes pediátricos, comparados con los de un grupo control estudiado, no abonan la hipótesis de un defecto en la trombogénesis, como causante de la necrosis avascular de la cabeza del fémur en nuestro medio.

Palabras clave

Enfermedad de Perthes. Niños. Trombofilia.

THROMBOPHILIA AND PERTHES' DISEASE?

Background

It has been suggested that the cause of Perthes' disease may be intravascular thrombosis induced by a potential congenital hemostatic disorder leading to conditions of thrombophilia or hyperfibrinolysis.

Method

Complete study of hemostasis with coagulation and antithrombin factors as well as study of thrombophilia and fibrinolysis in these patients could determine the prevalence of hemostasis and fibrinolysis in this group of patients.

Patients

Twenty-five patients between the ages of 5 and 25 years during the study period and previously diagnosed with Perthes' disease underwent hemostasis and thrombophilia analysis. Results were compared with those of a control group.

Results

Alterations in hemostasis and thrombosis were detected in one patient who had moderate-to-light protein S deficiency. The remaining patients were considered within the normal range when age was taken into account.

Conclusions

Epidemiological and laboratory data from this group of pediatric patients and from the control group do not support the hypothesis that a thrombogenesis defect could be the underlying cause of avascular necrosis of the hip joint.

Key words:

Perthes' disease. Children. Thrombophilia.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Perthes (EP) es una enfermedad pediátrica idiopática de elevada morbilidad, consistente en la osteonecrosis avascular de la cabeza femoral. La etiología no es conocida. En estudios recientes se ha hecho referencia a los defectos congénitos de proteínas inhibidoras de la hemostasia y a la trombofilia que dichos déficit generan como posibles responsables de la etiología de la enfermedad de Perthes¹⁻³.

Correspondencia: Dr. J.M. Tusell Puigbert. Servicio de Hemato-Oncología. Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron. P.º Vall d'Hebron 119-129. 08035 Barcelona.
Este estudio ha sido financiado por el CAPI (Centro de Ayudas y Promoción para la Investigación) del Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron de Barcelona. Beca n.º CAPI:PR-MI-98-69.
Recibido en febrero de 2000.
Aceptado para su publicación en mayo de 2000.

Se define la trombofilia hereditaria como la tendencia genética a presentar fenómenos tromboembólicos. Los defectos congénitos de antitrombina III, proteína C y proteína S, así como la resistencia a la proteína C activada (APC-r), la presencia de anticoagulante lúpico y la hipofibrinólisis son causas bien establecidas de riesgo tromboembólico⁴⁻¹⁴. La resistencia a la proteína C activada es reconocida como la causa más frecuente de trombofilia hereditaria¹⁰. Se encuentra entre un 3 y un 7% de la población general y en un 20-50% de los pacientes con trombosis venosa⁵.

La trombofilia y la hipofibrinólisis han sido relacionadas con la osteonecrosis de la cabeza femoral y de la mandíbula en adultos, y con la enfermedad de Perthes en niños, por grupos diferentes de estudiosos del tema¹⁵⁻²⁸. En los casos pediátricos, se detectaron alteraciones de la trombofilia o de la fibrinólisis en un 50% y, en general, de la hemostasia en un 75% de los niños con dicha enfermedad²⁷. Se argumenta en estos trabajos que la trombofilia y la hipofibrinólisis, secundarias a los defectos congénitos de estas proteínas procoagulantes, originarían un estado trombofílico que podría predisponer a la oclusión trombotica de las venas en los huesos, lo que conduciría a una hipertensión y anoxia, y a la característica osteonecrosis ósea secundaria a la isquemia. Sin embargo, estos resultados no han sido confirmados por otros grupos^{29,32-34} que no atribuyen a la trombofilia un papel preponderante en la etiología de esta enfermedad en niños.

Por otra parte, cuando se produce un aumento congénito o adquirido del activador del inhibidor del plasminógeno (PAI; el mayor y más importante estimulador de la fibrinólisis), se produce una reducción de la capacidad de reducción de los trombos (hipofibrinólisis), decantando el equilibrio hacia la trombosis^{5,11,14,26-28}. La hipofibrinólisis mediada por los altos valores de PAI podría ser la causa de una inadecuada fibrinólisis y de la trombosis venosa. Por ello, se ha relacionado la hipofibrinólisis con la presencia de osteonecrosis en la cabeza de fémur^{2,5,26,27}.

El objetivo principal del presente estudio fue determinar la prevalencia de anomalías en las proteínas responsables de la inhibición de la coagulación y de las responsables de la fibrinólisis, en los casos de enfermedad de Perthes en nuestro medio. Para ello, se procedió al estudio de los valores de proteína C, proteína S, la resistencia a la proteína C activada, los valores de antitrombina III, la presencia de anticoagulante lúpico y los valores del PAI en muestras de sangre de niños previamente diagnosticados de dicha enfermedad.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Se estudiaron un total de 25 pacientes controlados en la unidad de ortopedia infantil de nuestro centro, diag-

nosticados de enfermedad de Perthes por criterios clínicos y radiológicos. Se seleccionaron de manera aleatoria los 25 pacientes que durante el período de inclusión de un año acudieron a control ortopédico. Este grupo está compuesto de 24 varones y una mujer con una media de edad, en el momento de realizar el estudio, de 10,5 años y un rango entre 5-25 años. El tiempo transcurrido desde el diagnóstico y el estudio oscila entre 3 meses y 18 años. No existen antecedentes de fenómenos tromboembólicos familiares ni personales en ninguno de los pacientes. Doce de los pacientes fueron sometidos a intervención ortopédica de corrección; en 8 casos la intervención fue del tipo osteotomía femoral, y en 4 casos de tectoplastia. No presentaron ninguna complicación tromboembólica ni en el curso del proceso operatorio ni en el período postoperatorio, y no recibieron en ningún caso profilaxis de la enfermedad tromboembólica. Paralelamente, se seleccionó un grupo control de 20 pacientes de manera aleatoria entre los controles preoperatorios para cirugía menor que presentaban normalidad del hemograma y de las pruebas de hemostasia, con unas características parecidas de edad y sexo, que fueron sometidos al mismo estudio.

Métodos

Determinaciones analíticas

Se determinaron los siguientes parámetros de actividad: proteína C, proteína S, resistencia a la proteína C activada (APC-r) y anticoagulante lúpico, utilizando la metodología coagulométrica. Para la proteína C se utilizó el método Proclot, para la proteína S el IL test tm, y para la APC-r la técnica Acelerimat. Para la determinación del anticoagulante lúpico se utilizaron los tests de Russell, Kaolin y Russell confirmatorio de Stago³⁶. La determinación de antitrombina III se realizó por técnicas colorimétricas con sustratos cromogénicos³⁷, utilizando reactivos homologados (IL Diagnostics) y el analizador de coagulación ACL 3000 (Izasa). Para la determinación antigénica y de actividad del activador tisular del plasminógeno (tPA) y del inhibidor del activador del plasminógeno, se utilizaron técnicas de enzoinmunoanálisis tipo ELISA en microplacas homologadas (Biopool Diagnostics) en el analizador de técnicas ELISA Gest-JR (A. Menarini Diag.)³⁸⁻⁴⁰. Para efectuar estas determinaciones se utilizaron tubos Stabilyte (Biopool) para la recogida de muestras⁴⁰. Finalmente, se determinaron las cardiolipinas IgG, IgM de las muestras también por técnicas de ELISA en microplaca, utilizando un equipo homologado (Cheshire Diag. Lim)⁴¹.

Los valores de normalidad de las técnicas descritas se establecieron en los individuos del grupo control (tabla 1) y los resultados considerados como bajos fueron confirmados en un segundo estudio con más de un mes de intervalo. Respecto a los rangos considerados como nor-

TABLA 1. Comparación de los resultados del grupo de niños con enfermedad de Perthes y el grupo control

	Grupo control n (x [%])	Grupo con enfermedad de Perthes n (x [%])
Antitrombina III (VN: 83-120%)	20 (100,02)	25 (102)
Proteína C (VN: 70-150%)	20 (100)	24 (103,4)
Proteína S (VN: 65-140%)	20 (87,8)	24 (90,3)
APC-r (VN: ratio 0,9-1,3)	20 (1,439)	23 (1,25)
tPA antigénico (VN: 3,8-5,8 ng/ml)	19 (4,55)	13 (4,54)
tPA activado (VN: 0,15-1,54 U/ml)	17 (0,4)	14 (0,44)
PAI-1 antigénico (VN: 8-28 ng/ml)	20 (25,5)	13 (26,51)
PAI-1 activado (VN: 8,2-15,3 U/ml)	18 (14,2)	14 (16)

APC-r: resistencia a la proteína C activada; tPA: activador tisular del plasminógeno; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno; VN: valor normal.

males y de acuerdo con Andrew³⁵, en la etapa entre 6 y 10 años fueron considerados como normales los rangos del 45-93% para la proteína C y el 41-114% para la proteína S.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado con los programas informáticos SPSS y BMDP, aplicando los tests estadísticos de análisis de variancia (ANOVA) y la t de Student a las medias de los parámetros estudiados y el coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS

En sólo un caso (3,8%) de los 25 pacientes estudiados se detectó anomalía en las proteínas de la hemostasia-trombosis, siendo los valores, en los demás casos, normales para las edades de los pacientes. En el único caso anómalo se detectó un déficit moderado de proteína S (28-30%). Se trataba de un paciente de 5 años sin otros antecedentes personales ni familiares de trombosis. En el estudio familiar no se detectó ninguna anomalía. Otro paciente presentó positividad del anticoagulante lúpico con negatividad de los anticuerpos anticardiolipina, que en un segundo estudio se negativizó de forma espontánea, catalogándose este primer anticoagulante lúpico positivo como inespecífico y posiblemente debido a un episodio postinfeccioso.

No se detectó, en los antecedentes familiares de estos pacientes, historia familiar de trombosis en ningún caso. En el caso con defecto de proteína S existía el antece-

dente de un abuelo con historia de infarto. Los 12 pacientes que fueron sometidos a intervención quirúrgica de la cadera no presentaron complicaciones tromboembólicas en el postoperatorio inmediato ni tardío.

Comparación con el grupo control

En la tabla 1 se exponen los resultados del grupo de pacientes con enfermedad de Perthes para los parámetros examinados y los del grupo control. Se ha aplicado el test de la t de Student para comparar la media de los resultados de cada parámetro del grupo control con el grupo Perthes y solamente se han encontrado diferencias significativas en la APC-r (p = 0,0094) con valores significativamente más bajos del grupo Perthes (1.268) frente al grupo control (1.439).

Seguidamente, con el fin de encontrar posibles correlaciones entre todos los parámetros determinados, se hizo un análisis de correlación de Pearson multivariante y solamente se encontró una correlación significativa entre tPA (antagónico)/tPA (actividad) (r = 0,722; p = 0,047) y entre PAI (antigénico)/PAI (actividad) (r = 0,4085; p = 0,051), correlaciones que se pueden considerar normales entre antígeno y su actividad, no encontrándose ninguna otra correlación significativa (p < 0,05) entre los demás parámetros estudiados.

Respecto a los resultados generales de tPA y PAI no se observan unas tendencias concretas, algunos pacientes tienen tPA disminuido otros PAI aumentado. Así pues, 5 de los 26 casos presentaban alguna alteración trombogénica (19,6%), resultados equiparables a otras series publicadas¹, no aportando ninguna información adicional las determinaciones de tPA y PAI. Finalmente, se encontró que la media de los resultados de APC-r (1.258) era significativamente más baja (p = 0,094) que el grupo control (1.349), sin encontrar ninguna explicación fisiológica del dato.

DISCUSIÓN

La incidencia de complicaciones tromboembólicas en niños es rara, estimándose en 0,07 por 10.000 individuos³⁵. Los pacientes con trombofilia congénita raramente presentan historia de complicaciones durante la infancia, no apareciendo éstas hasta el inicio de la edad adulta.

El papel de las alteraciones del equilibrio de los sistemas de coagulación, trombosis y fibrinólisis en el diagnóstico etiológico de la enfermedad de Perthes en niños

TABLA 2. Comparación de los resultados de la resistencia a la proteína C, los déficit de proteína C y S y de antitrombina III en niños con enfermedad de Perthes

	N.º de pacientes	Resistencia a la proteína C activada	Déficit de proteína C	Déficit de proteína S	Déficit de antitrombina III	Total (%)
Gallisti ²⁹	44	3	1	0	0	4 (9)
Thomas ³⁵	64	4	0	1	3	8 (12)
Hakey ³⁴	62	5	1	1	0	7 (11)
Hospital Vall d'Hebron	25	0	0	1	0	1 (4)

es motivo de controversia. Las observaciones de Glueck et al², con un 50% de alteraciones de la trombofilia en los niños diagnosticados de enfermedad de Perthes, contrastan con las de otros autores^{29, 32-34} que no observaron dichas alteraciones. Los resultados obtenidos en nuestro estudio están de acuerdo con estos últimos (tabla 2). De los 25 casos estudiados, sólo en uno se detecta una ligera anomalía en la concentración de proteína S, sin que se constataren antecedentes personales ni familiares de fenómenos tromboembólicos. En el estudio familiar (padres y hermanos) no se constató el defecto.

En nuestro grupo de pacientes, existe un claro predominio de los niños (25 casos) sobre las niñas (un caso), en la misma línea e incluso superior a otras series en las que hay un predominio 4 o 5 veces superior de los niños³⁰. Ello también va en desacuerdo con la hipótesis de una etiología constitucional (trombofilia) en el origen de la enfermedad ortopédica y que los trastornos congénitos de las proteínas procoagulantes (antitrombina III, proteína C y proteína S) se adquieren por herencia autosómica dominante³¹.

En la historia de estos 25 pacientes no constan antecedentes de fenómenos tromboembólicos, ni familiares, ni personales, ni siquiera después de las intervenciones quirúrgicas ortopédicas a las que fueron sometidos 12 de ellos. Este hecho también va en contra de la hipótesis del papel etiopatogénico de la trombofilia. Si esta enfermedad se originara a partir de deficiencias que indujeran tendencia a la trombosis, sería precisamente en el postoperatorio de las intervenciones ortopédicas de cadera cuando dicha tendencia al tromboembolismo podría expresarse y manifestarse en forma de fenómenos tromboembólicos.

Por todo ello, se puede afirmar que nuestro estudio no confirma la teoría de un origen constitucional con tendencia a la hipercoagulabilidad y la trombosis en la etiología de la enfermedad de Perthes. Habrá que revisar otros condicionantes de la enfermedad tromboembólica, como las mutaciones del gen del factor V (factor V Leiden) y del gen de la protrombina y otros factores de riesgo hereditario de trombosis³², para seguir avanzando en el esclarecimiento de la etiología de esta alteración y su posible relación con la trombofilia congénita.

BIBLIOGRAFÍA

1. Manco-Johnson MJ. Disorders of hemostasis in childhood: risk factors for venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1997; 78: 710-714.
2. Glueck CJ, Crawford A, Roy D, Freiberg R, Glueck H, Stroop D. Association of antithrombotic factor deficiencies and hypofibrinolysis with Legg-Perthes disease. *J Bone Joint Surg* 1996; 78 (Supl A): 3-13.
3. Glueck CJ, Brandt G, Gruppo R, Crawford A, Roy D, Tracy T et al. Resistance to activated protein C and Legg-Perthes disease. *Clin Orthop* 1997; 338: 139-152.
4. Bertina RM, Koeleman BP, Korster T, Rosendaal FR, Divan RS, De Ronde H et al. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994; 369: 64-67.
5. Hall DJ. Genetics aspects of Perthes disease: a critical review. *Clin Orthop* 1986; 209: 100-114.
6. Greengard JS, Eichinger S, Griffin JH, Bauer KA. Variability of thrombosis among homozygous siblings with resistance to activated protein C due to an Arg-Gln mutation in gene for factor V. *N Engl J Med* 1994; 331: 1559-1562.
7. Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernández JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thromboembolic patients. *Blood* 1993; 82: 1989-1993.
8. Hajjar KA. Factor V Leiden: An unselfish gene? A critical review. *N Engl J Med* 1994; 331: 1585-1587.
9. Koeleman PC, Reitsma PH, Allaart C, Bertina RM. Activated protein C resistance as an additional risk factor for thrombosis in protein C deficient families. *Blood* 1994; 84: 1031-1035.
10. Ridker PM, Hennekens CH, Lindpaintner K et al. Mutation in gene coding for factor V and the risk of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1995; 332: 912-917.
11. Rosendaal FR, Koster T, Vandenbroucke JP, Reitsma PH. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 1995; 85: 1504-1508.
12. Shen L, Dahlback B. Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. *J Biol Chem* 1994; 269: 18735-18738.
13. Voorberg J, Roelse J, Koopman R, Buller H, Berends F, Ten Cate JW. Association of idiopathic venous thromboembolism with single point-mutation at Arg 506 of factor V. *Lancet* 1994; 343: 1535-1536.
14. Zoller B, Svensson PJ, He X, Dahlback B. Identification of the same factor V gene mutation in 47 of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C. *J Clin Invest* 1994; 94: 2521-2524.
15. Boettcher WG, Bonfiglio H, Hamilton HH, Sheets RF, Smith K. Non traumatic osteonecrosis of the femoral head: 1. Relation of altered hemostasis to etiology. *J Bone Joint Surg* 1970; 52 (Supl A): 312-321.
16. Glueck CJ, Freiberg R, Glueck HI, Henderson C, Welch M, Tracy T. Hypofibrinolysis: a common, major cause of osteonecrosis. *Am J Hematol* 1994; 45: 156-166.
17. Glueck CJ, Freiberg R, Glueck HI, Tracy T, Stroop D, Wang P. Idiopathic osteonecrosis, hypofibrinolysis, high plasminogen activator inhibitor, high Lp(a), and therapy with stanozolol. *Am J Hematol* 1995; 48: 213-220.
18. Glueck CJ, Freiberg R, Tracy T, Stroop D, Wang P. Thrombophilia and hypofibrinolysis: pathophysiology of osteonecrosis. *Clin Orthop* 1997; 334: 43-56.
19. Glueck CJ, McMahon RE, Bouquot J, Tripett D, Gruppo R, Wang P. Pathophysiology of osteonecrosis of the jaw: thrombophilia and hypofibrinolysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1996; 81: 557-566.
20. Gruppo R, Glueck CJ, McMahon RE, Bouquot J, Rabinovich BA, Becker A et al. Anticardiolipin antibodies, thrombophilia and hypofibrinolysis: pathophysiology of osteonecrosis of the jaw. *J Lab Clin Med* 1996; 127: 481-488.
21. Nilsson IM, Krook H, Sternby HH, Hedner U. Severe thrombotic disease in a young man with bone marrow and skeletal changes and with a high content of an inhibitor in the fibrinolytic system. *Acta Med Scand* 1961; 169: 325-327.
22. Van Veldhuizen RI, Neff J, Murphey MD, Bodesteiner D, Skine BS. Decreased fibrinolytic potential in patients with idiopathic avascular necrosis and transient osteoporosis of the hip. *Am J Hematol* 1993; 44: 243-248.

23. Choi D, Lee DY, Chung CY, Rhyu KH, Park SY. Changes in coagulation-fibrinolysis system in Legg-Perthes disease: a preliminary report [resumen]. *Proc Pediatr Orthop Soc North Am* 1995; 2: 1.
24. Glueck CJ, Crawford A, Roy D, Freiberg R, Glueck H, Stroop D. Association of antithrombotic factor deficiencies and hypofibrinolysis with Legg-Perthes disease. *J Bone Joint Surg* 1996; 78 (Supl A): 3-13.
25. Glueck CJ, Glueck HI, Greenfield D, Freiberg R, Kahn A, Hamer T. Protein C and S deficiency, thrombophilia and hypofibrinolysis: pathophysiologic causes of Legg-Perthes disease. *Pediatr Res* 1994; 35: 383-388.
26. Glueck CJ, Glueck HI, Mieczkowski L, Tracy T, Speirs J, Stroop D. Familial high plasminogen activator inhibitor with hypofibrinolysis, a new pathophysiologic cause of osteonecrosis? *Thromb Haemost* 1993; 69: 460-465.
27. Glueck CJ, Glueck HI, Welch M, Freiberg R, Tracy T, Hamer T. Familial idiopathic osteonecrosis mediated by familial hypofibrinolysis with high levels of plasminogen activator inhibitor. *Thromb Haemost* 1994; 71: 195-198.
28. Petaja J, Rasi V, Mylly, Vahtera E, Hallman H. Familial hypofibrinolysis and venous thrombosis. *Br J Hematol* 1989; 71: 393-398.
29. Gallistl S, Reitinguer T, Linhart W, Muntean W. The role of inherited thrombotic disorders in the etiology of Legg-Calvé-Perthes disease. *J Pediatr Orthop* 1999; 19: 82-83.
30. Guille JT, Lipton GE, Szöke G, Bowen JR, Harcke HT, Glutting JJ. Legg-Calvé-Perthes disease in girls. *J Bone Joint Surg* 1998; 80 (Supl A): 1256-1263.
31. De Stefano V, Finazzi G, Mannucci PM. Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes and management. *Blood* 1996; 87: 3531-3544.
32. Arruda VR, Belangero WD, Ozeto MC, Oliveira GB, Pagnano RG, Volpon JB et al. Inherited risk factors for thrombophilia among children with Legg-Calvé-Perthes disease. *J Pediatr Orthop* 1999; 19: 84-87.
33. Hakey S, Kenet G, Lubetsky A, Rosenberg N, Gitel S, Wiencroub S. Does thrombophilia play a role in Legg-Calvé-Perthes disease? *J Bone Surg (Br)* 1999; 81 (Supl B): 686-690.
34. Thomas DP, Morgan G, Tayton K. Perthes' disease and the relevance of thrombophilia. *J Bone Surg (Br)* 1999; 81 (Supl B): 691-695.
35. Andrew M, Verh P, Johnston M. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992; 80: 1998-2005.
36. Dixon JS, Musgrove KA. Special laboratory evaluation of coagulation. En: *Clinical hematology*. Filadelfia: Lippincott, 1992; 611-615.
37. Abildgaard U, Lie M, Odegard OR. Antithrombin heparin cofactor assay with new chromogenic substrates. *Thromb Res* 1977; 11: 549.
38. Angles Cano E. Espectrofotométrico solid-phase tissue plasminogen activator activity assay (Sofia-TPA) for high-fibrin-afinity tissue plasminogen activators. *Anal Biochem* 1989; 153: 201-210.
39. Chmielewka J, Wiman B. Determination of plasminogen activator and its fast inhibitor in plasma. *Clin Chem* 1983; 32: 482-485.
40. Ranby M, Bergsdorf N, Nilsson T, Melbring G, Winblad B, Bucht G et al. Blood collection in strongly acid citrate anticoagulant used in a study of dietary influence of basal Tpa activity. *Thromb Haemost* 1989; 62: 917-922.
41. Harris NE. The second international anticardiolipin standardization workshop. The Kinston antiphospholipid group. *Am J Clin Pathol* 1990; 94: 476-484.