

9  
2 ej.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA**

**ESQUEMA DE CALIBRACION DE UNA  
TROMBOPLASTINA DE ORIGEN NACIONAL PARA  
EL TIEMPO DE PROTROMBINA, EN TERMINOS DE  
UNA PREPARACION DE REFERENCIA  
INTERNACIONAL**

**TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
ANGELINA CASTILLO PEREZ**



**TESIS CON 989  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# CONTENIDO

	PAG
INTRODUCCION .....	1
CAPITULO I. GENERALIDADES	
I.1 Hemostasia .....	3
I.1.1 Actividad vascular .....	3
I.1.2 Función plaquetaria .....	4
I.1.3 Coagulación o hemostasia plasmática .....	4
I.1.4 Diferencia entre suero y plasma .....	9
I.2 Anticoagulantes in vivo e in vitro...	9
I.2.1 Anticoagulantes en general...	9
I.2.2 Anticoagulantes terapéuticos.	10
I.3 Alteraciones de la coagulación ....	15
I.4 Estandarización de tromboplastinas...	17
I.4.1 Antecedentes históricos ....	17
I.4.2 Sistema de unidades tradicio- nales .....	19
I.4.3 Sistema de unidades propuesto .....	22
I.4.4 Preparaciones de referencia..	22
I.4.5 Plasmas de referencia .....	28
I.4.6 Desgloce estadístico .....	29
CAPITULO II.	
II.1 Planteamiento del problema .....	34
II.2 Objetivos .....	35
II.3 Hipótesis .....	36
CAPITULO III. PARTE EXPERIMENTAL	
III.1 Recursos .....	37
III.1.1 Material .....	37
III.1.2 Equipo .....	37

	III.1.3	Material biológico .....	38
	III.1.4	Reactivos .....	38
III.2	Métodos .....		39
	III.2.1	Obtención de la muestra .....	39
	III.2.2	Evaluación del TP. Método de Quick .....	40
	III.2.3	Calibración de tromboplastinas .....	42
	III.2.4	Curvas de referencia de factores de la vía extrínseca.	45
	III.2.5	Estandarización de tromboplastinas .....	49
III.3	Desarrollo .....		50
	III.3.1	Tromboplastinas liofilizadas.	50
	III.3.2	Tromboplastinas líquidas .....	53
	III.3.3	Evaluación de factores de la vía extrínseca .....	58

#### CAPITULO IV. RESULTADOS

IV.1	De las tromboplastinas liofilizadas...	60
IV.2	De las tromboplastinas líquidas .....	70
IV.3	De la evaluación de factores de la vía extrínseca .....	94

#### CAPITULO V.

V.1	ANALISIS DE RESULTADOS .....	101
-----	------------------------------	-----

#### CAPITULO VI.

VI.1	CONCLUSIONES .....	107
------	--------------------	-----

REFERENCIAS .....	109
-------------------	-----

APENDICES .....	112
-----------------	-----

A.	Selección de plasmas normales y anormales para la estandarización según la OMS .....	112
----	---	-----

B.	Principio operativo del Fibrintimer 10 .....	114
C.	Curvas de referencia en porcentaje de actividad .....	116

## INTRODUCCION

Hace aproximadamente 30 años, el Dr. A.J.Quick describió una prueba a la cual llamó tiempo de protrombina, siendo influenciado solamente por la concentración de protrombina. A la fecha, se han realizado modificaciones a tal prueba a fin de mejorar la sensibilidad de las tromboplastinas y disminuir variaciones interlaboratorio de las tromboplastinas en cuanto a los resultados del TP en unidades tradicionales tales como: % de actividad, segundos, radio de protrombina, etc.; se han introducido subsecuentemente una variedad de tejidos como cerebro de conejo, pulmón humano, extractos de placenta humana, tejido bovino.

La prueba puede orientar al déficit de los factores : II, V, VII y X producido en caso de enfermedad o bien, artificialmente como consecuencia de la administración de drogas anticoagulantes como la cumarina o indanediona. Por tal motivo, la necesidad de encontrar un sistema de unidad más uniforme tanto en un lugar como en otro distinto, es cada vez más apremiante.

El Comité Internacional de Hemostasia y Trombosis, de la Organización Mundial de la Salud, contribuyó enormemente para que se obtuvieran las bases y técnicas adecuadas para la estandarización de tromboplastinas, a fin de contar con una unidad de medida: el radio normalizado internacional INR.

De acuerdo a lo establecido por la OMS en 1981, se empleó el método modificado de Biggs y Denson; actualmente existen tres tipos de tromboplastinas de referencia internacional IRP. de acuerdo al tipo de tromboplastina que se desee estandarizar:

- BCT/099
- OBT/79
- RBT/79

En el presente trabajo desarrollado  
Los parámetros que se obtuvieron fueron:

- Una pendiente de calibración C.
- Un índice de sensibilidad internacional ISI, referente a la tromboplastina de trabajo.
- El error estándar del ISI,  $SE_{ISI}$
- El coeficiente de variación del ISI en por ciento,  $\%CV_{ISI}$

De todos ellos, el ISI es el parámetro clave que correlaciona a la nueva unidad de medida del TP: el INR, mediante la fórmula:

$$INR = (RP)^{ISI}$$

donde RP = radio de protrombina

De ésta forma se elaboró la estandarización de la tromboplastina comercial de cerebro de conejo: Trombolaf, por lo que el estándar a usar fué su homólogo RBT/79 quien posee un ISI de 1.4 por definición.

Se realizaron lecturas de TP en 10 días de trabajo en los cuales se necesitó de 2 plasmas frescos normales y 6 plasmas frescos anormales (8 en total para cada día), contando para la evaluación del equipo Fibrintimer Behring - Diagnostika. Al cabo de los 10 días, se aplicó el modelo estadístico del método mencionado y se encontró lo siguiente:

- Una pendiente entre el estándar y la tromboplastina comercial de 1.64, con un error estándar de 0.05.
- Un ISI de la tromboplastina comercial de 2.299, con un error estándar de 0.07 y un coeficiente de variación en % de 3.19.

Aparte de la estandarización llevada a cabo a la tromboplastina comercial, se le realizó la dosificación de factores de la vía extrínseca, tomando como referencia a otra tromboplastina comercial con ISI conocido.

---

**CAPITULO I**  
**GENERALIDADES**

---

---

## CAPITULO I

### GENERALIDADES

#### I.1 Hemostasia

La hemostasia engloba una multitud de reacciones que el organismo pone en marcha para protegerse a sí mismo de una pérdida de sangre, deteniendo una hemorragia y manteniendo la integridad de la pared vascular para finalmente reestablecer la circulación sanguínea. El fallo de los mecanismos hemostáticos conduce a la hemorragia (que es una descarga sanguínea debida a la pérdida de continuidad de los vasos de sangre) o por el contrario, puede producirse una trombosis (formación de coágulos en los vasos sanguíneos) debida a un fallo en el mantenimiento de la fluidez de la sangre.

El estudio del mecanismo hemostático es necesario en las siguientes circunstancias:

1. Pacientes que serán sometidos a cirugía y cuyo historial familiar presenta hemorragias anormales.
2. Diagnóstico de la naturaleza del efecto en enfermos con trastornos de hemostasia.
3. Control de laboratorio en enfermos que reciben terapia anticoagulante.
4. Control de laboratorio en la terapéutica de pacientes con trastornos de hemostasia. (14,28)

Los mecanismos hemostáticos están organizados de manera general en tres categorías:

##### I.1.1

##### Actividad vascular.

Involucra la calidad vascular y sus propiedades de reactividad y contractibilidad. Los vasos sanguíneos al dañarse se constriñen estrechando el paso del flujo sanguíneo debi

do a las propiedades funcionales de la pared vascular relacionadas a la hemostasia (contractibilidad, fragilidad, - permeabilidad), ya que se produce una vasoconstricción rápida seguida de una relajación, gracias a un mecanismo reflejo del organismo; posteriormente tiene lugar una vasoconstricción por estímulo químico provocada por la salida del interior de las plaquetas, de sustancias vasoactivas como la serotonina y por la síntesis de prostaglandinas en la plaqueta como el tromboxano  $A_2$ , fuertemente vasoconstrictor.

### I.1.2

#### Función plaquetaria.

Recibe el nombre de hemostasia primaria o formación del trombo plaquetario. Es un proceso en el que intervienen las plaquetas y en el cual se distinguen los siguientes eventos:

- . Adhesión a la pared vascular.
- . Cambio de forma y contracción de plaquetas.
- . Secreción de los gránulos plaquetarios.
- . Agregación de plaquetas (trombo).
- . Estabilización de la fibrina.

En cierta manera, las plaquetas protegen las superficies endoteliales o las uniones intercelulares y reparan el daño incipiente antes de que se manifieste desde el punto de vista clínico. Tienen la propiedad de adherencia al endotelio herido así como entre ellas mismas y al hacerlo, forman tapones que impiden la hemorragia de pequeños vasos.

El tiempo de hemorragia está alargado en las trombocitopenias y/o disfunción plaquetaria debida a la no producción del tapón plaquetario.

### I.1.3

#### Coagulación o hemostasia plasmática.

Su finalidad a lo largo de complejas reacciones bio -

químicas es la de generar el trombo de fibrina y la fibrinólisis o disolución del coágulo de fibrina. (2,9,26,32)

### I. Coagulación Sanguínea.

En sí, la coagulación sanguínea tiene como finalidad la formación de fibrina, que es la transformación de una proteína soluble (fibrinógeno) en una proteína insoluble (fibrina) cuyas redes constituyen la trama fundamental del coágulo.

Factores involucrados en la coagulación sanguínea.

Los factores o proteínas plasmáticas de la coagulación que hasta el presente han sido admitidos, se expresan con números romanos (I al XIII) de acuerdo al Comité Internacional para la Nomenclatura de los Factores de Coagulación de la Sangre.

A continuación se presenta un cuadro que muestra algunas de las características generales de estos factores:

FACTOR	NOMBRE	TIPO	PM	VIDA MEDIA	SINTESIS
I	fibrinógeno	glucoproteína	330 000 daltons	3.5-4 días	hígado
II	protrombina	lipoproteína	72 000 daltons	2.5-3 días	hígado
III	tromboplastina tisular. Factor hístico	lipoproteína	300-220 000 daltons	-	ampliamente distribuido en organismo
IV	calcio	ión sanguíneo	40.08 g	-	"
V	proacelerina	proteína	300 000 daltons	15.0 hrs	hígado
VI	este término no se usa; fue anulado de esta secuencia de factores debido a que ya había sido empleado como activador de protrombina.				
VII	proconvertina, factor estable, antitrombina I, SPCA*	globulina	45 000 daltons	5 - 7 hrs	hígado
VIII	factor antihemofílico, globulina antihemofílica	glucoproteína	110 000 daltons	10-12 hrs	céls endotelio vascular
IX	factor de Christmas, factor B antihemofílico, PFC**	glucoproteína	57 000 daltons	25 hrs	hígado
X	factor de Stuart Prower	glucoproteína	64 000 daltons	40 hrs	hígado
XI	factor Rosenthal PTA***	glucoproteína	160 000 daltons	45 hrs	hígado
XII	factor de Hageman	glucoproteína	75 000 daltons	50 hrs	hígado
XIII	factor de Laki Lorand, fibrinasa, factor estabilizante de la fibrina	glucoproteína	-	5-10 días	hígado

TABLA No. 1 Características generales de los factores de la coagulación.

\* Acelerador de la conversión de la protrombina sérica.

\*\* Componente trombotástico del plasma.

\*\*\* Antecedente trombotástico del plasma.

Como se observa, la mayor parte de los factores de la coagulación se sintetizan en el hígado encontrándose cuanto que requieren para su síntesis de la vitamina K: factor VII, IX, X y II.

Los factores de la coagulación excepto los fosfolípidos de las plaquetas, son factores que una vez activados se comportan como enzimas proteolíticas sobre otros activándolos a su vez, constituyendo así una reacción concatenada llamada cascada de la coagulación. Clásicamente se distinguen dos vías de activación: vía intrínseca, en la que sólo participan factores plasmáticos y vía extrínseca mucho más rápida, que se desencadena por la presencia en el torrente circulatorio de un factor extrínseco a la sangre llamado factor histico. (14,27,29)

#### Vía intrínseca

Todo lo necesario para activar el factor X existe en el plasma normal aunque en forma inactiva; un estímulo inicial conveniente pone en movimiento la cascada de factores activados recibiendo el nombre de vía intrínseca porque todos sus componentes están en la sangre. Se inicia con la activación del factor XII mediante una fase de contacto como por ejemplo el complemento, las quininas, etc.

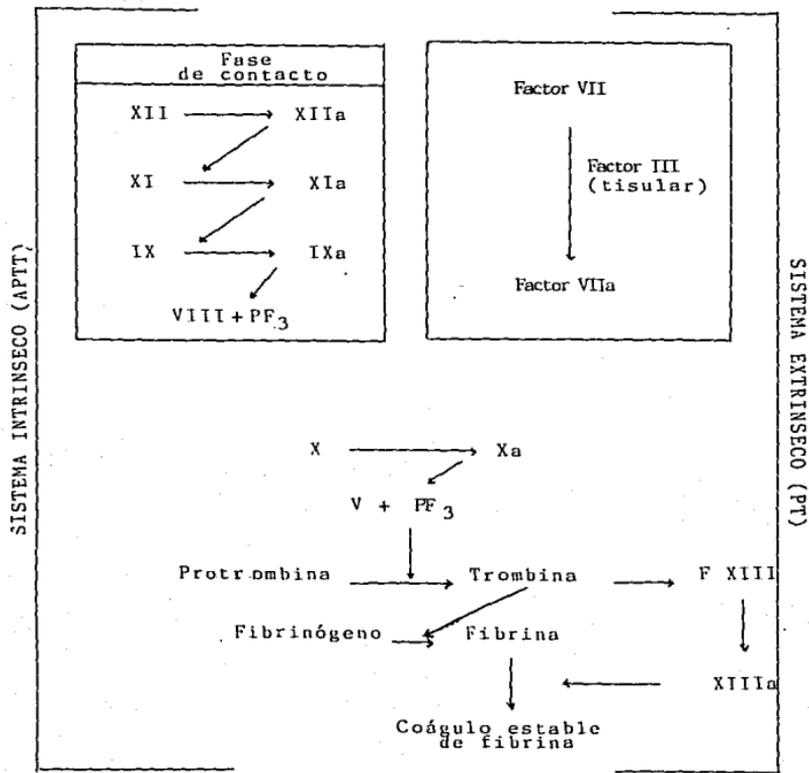
El tiempo de tromboplastina parcial evalúa de manera general dicha vía. (27,29)

#### Vía extrínseca

Se refiere al mecanismo por el que la trombina es producida en el plasma tras la adición de extractos histicos.

El modo como se combinan el factor VII, el calcio y la tromboplastina tisular para activar el factor X es tal-

que no hay fallo, igualmente la significación fisiológica - del sistema extrínseco en su conjunto parece ser una alternativa para el objetivo común de activar el factor X, pero en un sentido clínico estas vías no son sustitutos una de otra. La medición de esta vía a nivel laboratorio es mediante el tiempo de protrombina. El factor X puede activarse también con veneno de serpiente o tripsina en el laboratorio. (14)



ESQUEMA No. 1 Cascada del sistema de la coagulación.

## II. Sistema fibrinolítico.

La fibrinólisis es el proceso responsable de la degradación enzimática del coágulo de fibrina; es la etapa final de la hemostasia que elimina los depósitos de fibrina formados en la etapa de coagulación cuando han cumplido su función en la detención de la hemorragia y al mismo tiempo restaura el flujo sanguíneo. Es importante en la fisiología de la hemostasia el que exista un balance adecuado entre el sistema de coagulación y el sistema de fibrinólisis. (2,9,23,40)

### I.1.4

#### Diferencia entre suero y plasma.

El plasma es la parte líquida de la sangre, fuera del sistema vascular la sangre puede mantenerse líquida eliminando el fibrinógeno o añadiendo anticoagulantes, la mayoría de los cuales evitan la coagulación por su modo de unión sobre los iones calcio. El plasma recién extraído contiene todas las proteínas presentes en la sangre circulante a medida que el tiempo de conservación del plasma aumenta, la actividad de los factores V y VIII disminuye gradualmente. El suero es el líquido producido cuando la sangre ha coagulado; la coagulación convierte todo el fibrinógeno en fibrina sólida y consume en este proceso los factores VIII, V y II. Las otras proteínas de coagulación, así como las no relacionadas con la hemostasia permanecen en el suero a la misma concentración que tenían en el plasma. La absorción del plasma con sulfato de bario elimina los factores dependientes de la vitamina K. (27,29,42)

### I.2 Anticoagulantes in vivo e in vitro

#### I.2.1

##### Anticoagulantes en general.

Algunos de ellos son:

- Sales neutras. La coagulación puede impedirse mediante la adición de una cantidad suficiente de sales neutras a la sangre, tales como el oxalato o citrato de

- sodio inmediatamente después de su extracción.
- Resinas de intercambio iónico. Pasando la sangre a través de la resina amberlita IR100 -que ha sido situada en el ciclo del sodio- se produce una extracción del calcio de la sangre y se impide la coagulación.
  - Secuestrenc. Conocida como la sal disódica del EDTA es un anticoagulante debido a su capacidad de unirse a los iones calcio, es muy útil en el estudio de las plaquetas.
  - Licudod. In vitro destruye completamente y evita la fagocitosis de bacterias por las células, mientras que in vivo es una sustancia tóxica.
  - Colorantes anticoagulantes. Referidos a los anticoagulantes azul de chicao el cual actúa mediante la neutralización de la tromboplastina y, el rosa pálido que no se ha definido bien su funcionamiento, - pero ambos tienen grupos éster de tal manera que - son semejantes a la heparina.
  - Semilla de soja. Su acción es debida a una antitripsina funcionando como un agente tromboplastínico.
  - Venenos de serpiente. Los venenos de la mayoría de las serpientes son coagulantes debido a sus acciones similares a la trombina y al activador del factor X; el veneno de cobra es una excepción, ya que es un anticoagulante que aparentemente retrasa la formación de trombina interfiriendo la acción de la tromboplastina cerebral y de las plaquetas.
  - Hirudina. Presente en las glándulas cervicales de la sanguijuela, interviene en la interacción de los factores VIII y IX. (2,9,24,25)

### I.2.2

#### Anticoagulantes terapéuticos.

Los anticoagulantes que inhiben la formación de fibrina in vivo se usan en la clínica desde hace aproximadamente cuatro décadas y ocupan un lugar bien establecido en el tra

tamiento de las trombosis venosas. Los medicamentos anticoagulantes más empleados son: heparina y antagonistas de la - vitamina K.

#### Heparina

Es un mucopolisacárido sulfatado portador de una intensa carga negativa, posee un PM de 6 000 a 25 000 daltons ; su efecto anticoagulante es inmediato, se ha mostrado eficaz en la prevención de trombosis venosa y embolismo pulmonar, tanto a nivel experimental como clínico. Tiene una vida media de una hora y se inactiva en el hígado en forma - sulfatada excretandose por vía renal en forma menos activa, es ineficaz en ausencia de antitrombina III.

#### Antagonistas de la vitamina K

Son conocidos como anticoagulantes orales (cumarínicos y derivados de la indanediona), interfieren con la síntesis hepática de los factores II, VII, IX y X. Actualmente se conoce que durante el tratamiento con anticoagulantes - orales se sintetizan moléculas anormales de dichos factores son de efecto terapéutico retardado y el descenso factorial tiene lugar a las 36-48 hrs.

Este tipo de anticoagulantes tiene una ventaja sobre - la heparina: su absorción por vía digestiva y, por tanto, - pueden ser administrados oralmente sin embargo, su efecto - como agente antitrombótico es menor que el de la heparina.

La siguiente tabla muestra el efecto terapéutico de - los cuatro antagonistas de la vitamina K más empleados en - la clínica; todos ellos se absorben muy bien y su eficacia - como anticoagulante es similar. No obstante, la warfarina - es la preferida por su baja incidencia de efectos secundarios. Una de las complicaciones más graves de la fenindiona es la agranulocitosis; la warfarina y la fenindiona tienen un período de acción intermedio y su efecto terapéutico tiene lugar a las 36-48 hrs. El etilbiscumato tiene un efecto - terapéutico muy corto y el fenprocumón un período de acción

muy largo, lo que hace que sean poco útiles en la terapéutica anticoagulante.

MEDICAMENTO	EFFECTO TERAPEUTICO	VELOCIDAD DE ACCION	EFFECTOS SECUNDARIOS
Warfarina	36-48 hrs	intermedio	escasos
Fenindiona	" "	" "	muchos
Etilbiscu macetato	18-30 "	corto	escasos
Fenprocumón	48-60 "	largo	"

TABLA No. 2 Antagonistas de la vitamina K más usados y sus efectos.

Gran número de factores afectan la respuesta terapéutica a los anticoagulantes orales y pueden interferir en su control. Los factores son de tipo exógeno y endógeno. Mucho medicamento como aspirina, fenilbutazona, sulfamidas, antibióticos orales y sulfimpirazona aumentan el efecto de los antagonistas de la vitamina K. Actúan desplazando a los dicumarínicos de la proteína que los transporta en el plasma que es la albúmina y como consecuencia, lo hacen más disponibles para la inhibición de la vitamina K a nivel hepático. Todos ellos son peligrosos y pueden dar lugar a manifestaciones hemorrágicas si se administra a un paciente que está bajo control de los anticoagulantes. Alguno de ellos como la aspirina, sulfimpirazona y fenilbutazona inhiben la agregación plaquetaria lo cual aumenta el riesgo hemorrágico. (27,28)

También hay medicamentos que inhiben el efecto de los antagonistas de la vitamina K como los barbitúricos y otros sedantes lo que puede incrementar la dosis de los anticoagulantes orales y resultar peligroso, sobre todo cuando se suspende bruscamente ya que desorganizan el control terapéutico. Hay otros factores que interfieren en el control de los anticoagulantes potenciando su acción como son ingesta de alcohol, insuficiencia hepática, diarrea, alteración en la absorción de la vitamina K y la anemia en la dieta de la vitamina K.

En otras situaciones se inhibe la respuesta de los antagonistas de la vitamina K ya sea por un aumento en la ingestión de la misma como sucede en las neoplasias, o en la resistencia hereditaria a los antagonistas orales.

La hemorragia durante la terapéutica con anticoagulantes orales es relativamente poco frecuente cuando las pruebas de control se mantienen en el valor terapéutico sin embargo, existe un mayor peligro de hemorragia durante el periodo postoperativo y en otras circunstancias como: carcinoma, úlcera gástrica y litiasis renal en los que se puede producir hemorragia local. Cuando se produce hemorragia grave durante la terapéutica con heparina, el antídoto a usar es el sulfato de protamina que es una sustancia fuertemente básica que se combina con la heparina y la inactiva de inmediato. Esta se neutraliza con la protamina mg a mg; la dosis de protamina que se debe dar depende de la vía de administración de la heparina y del tiempo que haya transcurrido desde la última inyección.

La sobredosis de anticoagulantes orales puede ser absoluta generalmente por mal control o poco cuidado en la administración o bien, relativa por la ingesta de medicamentos que aumenten el efecto anticoagulante. La hemorragia asociada a sobredosis de dicumarínicos suele ser espontánea y a veces grave, por lo que se debe administrar vitamina K intravenosa a dosis de 25 mg; si la hemorragia que se produce

afecta a órganos vitales, se debe administrar concentraciones de factores II, VII, IX y X.

HEMORRAGIA	ANTIDOTO
heparina	sulfato de protamina (1 mg/100u)
antagonistas de la vitamina K	vitamina K <sub>1</sub> (25 mg IV) <sup>1</sup>

TABLA No. 3 Antídotos de los anticoagulantes terapéuticos.

El control de la terapéutica con anticoagulantes ora - les se realiza con el tiempo de protrombina (TP), el objeto es mantener el tiempo de coagulación de éstas pruebas en - dos veces aproximadamente de los niveles de control. Si el control se realiza con el tiempo de protrombina representa - del 15 al 30% y, si se hace con el trombotest , el valor te - rapéutico debe mantenerse entre el 5 y el 15%. Estas prue - bas han de realizarse tres veces durante la primera semana - del tratamiento anticoagulante, luego semanalmente y por ú - l - timo, cuando ya se ha establecido la dosis de mantenimiento basta realizarlas cada quince o treinta días. (25,26,27,32,42)

### I.3 Alteraciones de la coagulación.

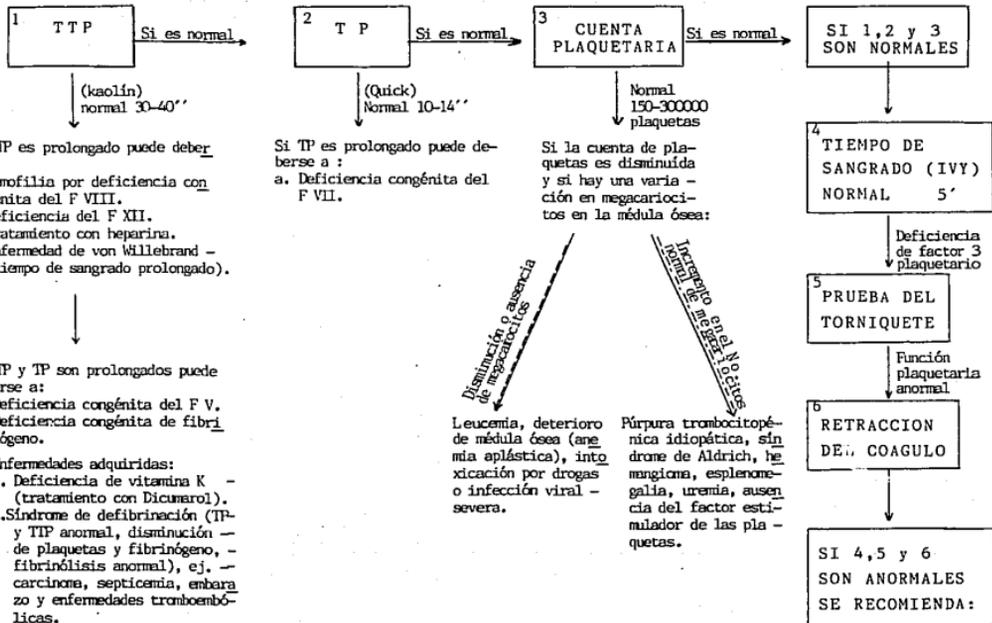
Existen dos clases de pacientes que requieren pruebas selectivas de la hemostasis, para determinar de modo genérico si sufren algún trastorno de ésta. Tales son:

1. El paciente preoperatorio común, que no presenta pruebas clínicas evidentes de hemostasis perturbada, pero en quien conviene una valoración selectiva básica antes de intervención.
2. El paciente cuyos hallazgos despierten sospechas de defecto hemostático generalizado y que, por tanto, requiere una valoración selectiva más completa. (9,24)

Al realizar la exploración física se buscan particularmente señales de hemorragia en la piel tales como equimosis o petequias, elasticidad anormal de la piel, estigmas de enfermedad hepática crónica, etc.

Si la historia y la evaluación física que se han descrito resultan completamente negativas; se requiere una prueba de laboratorio como: frotis de sangre periférica, TTP, TP u otros de acuerdo a lo que se obtenga. Cuando se procede al estudio de un paciente porque su historia o hallazgos clínicos muestran indicios de hemostasis anormal o porque una valoración preoperatoria mínima ha señalado un aspecto sospechoso, se requiere una valoración selectiva de laboratorio más estricta de cada fase de la hemostasia.

En el siguiente esquema se ha tratado de representar de manera global los pasos a seguir en el laboratorio ante una muestra de sangre:



ESQUEMA No. 2 Diagnóstico de las alteraciones de la coagulación.

## I.4 Estandarización de tromboplastinas

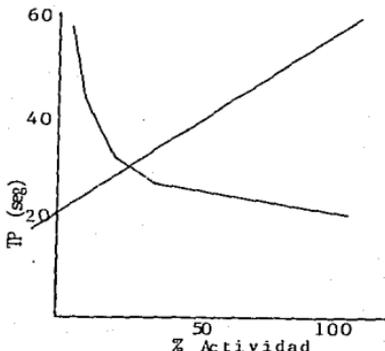
### I.4.1

#### Antecedentes históricos.

La necesidad de aceptar universalmente un procedimiento de estandarización a fin de controlar la dosis de anti-coagulantes orales ha sido obvia por algunos años, pero la solución ha sido acosada con técnica y dificultades organizadas, finalmente ha sido resuelto por medio de un proyecto - colaborativo internacional. Sin embargo, no deja de surgirnos la siguiente pregunta: ¿porqué se tomó en la resolución de éste problema más de 40 años para lograr alcanzar - un consenso internacional con respecto a la estandarización del tiempo de protrombina en el control de la terapia - anticoagulante, si desde entonces se tenía esa inquietud? ; la respuesta estaba en base al predominio de las ideas de - Armando Quick tan arraigadas en la profesión médica que, de alguna manera, impidieron un avance rápido y satisfactorio - de tal cuestionamiento. Quick propagó enérgica y exitosamente su procedimiento del ensayo del TP hasta cerca de los - años 70's, siendo estandarizado como tal en un rango terapéutico entre 10 a 30% de actividad del TP. (1,18,22)

Aunque hubo quienes refutaron tales procedimientos, no fue hasta finales de los años 60's cuando Poller por un lado, y Biggs y Denson (dos expertos del Comité Internacional en Trombosis y Hemostasis) por el otro, sugirieron de manera conjunta el principio de la estandarización del tiempo - de protrombina mediante los promedios de la calibración de tromboplastina. Ellos demostraron de manera irrefutable que el procedimiento de estandarización de Quick disminuía de la normalización de los resultados obtenidos al hacer modificación al ensayo de TP, y éste problema no podía ser resuelto en la práctica clínica, sino que requería de una evaluación más profunda; por lo tanto, hubo la necesidad de -

implementar un método de referencia con el fin de obtener un sistema más uniforme para reportar el tiempo de protrombina. Estudios internacionales revelaban esta urgente necesidad de estandarización, tanto de metodología como de reactivos, sistema de reporte y rangos terapéuticos a causa de la inquietante variación en los resultados del tiempo de protrombina. Desde hace cerca de 30 años se observaba que si se llevaba a cabo una prueba de TP en una fase con diluciones de plasma, y se registraban gráficamente, los valores del tiempo de coagulación y de las concentraciones, se obtenía una curva hiperbólica.



GRAFICA No. 1 Representación gráfica del TP en una fase, empleando diluciones de plasma humano normal con solución salina 0.85%

Esta curva podía transformarse en una línea recta mediante el trazo de la recíproca de la concentración respecto al tiempo de coagulación. El haber logrado tal transformación se debía a las aportaciones de Biggs y Warcfarlane (1949), los cuales habían enfatizado que la curva de dilución podía ser expresada de manera lineal y no hiperbólica, disminuyendo así errores al trazarla. (38,39)

El hecho de que no pasara por el cero se debía al retraso inicial en la producción de suficiente cantidad de trombina a fin de obtener un coágulo. Es preciso añadir que las curvas de dilución tal como la anterior, no indicaban la medida de la protrombina sino que daban un aspecto general de los efectos de la reducción de los tres factores extrínsecos simultáneamente (II, VII y X), sin embargo, la gráfica recibió frecuentemente el nombre de curva de dilución de la protrombina en una fase. (11,21,30)

Las curvas de dilución se usan frecuentemente para medir la cuantía de la anomalía de los pacientes tratados con drogas cumarínicas y proporcionan distintos resultados, ya que los reactivos de tromboplastina utilizados en los distintos centros difieren en su sensibilidad para reducir los tres factores. Las tromboplastinas comerciales en su mayoría proveen instructivos, los cuales aportan las indicaciones de su uso y propiedades así como una curva de calibración para convertir el valor del plasma a % de actividad. (3,4)

#### I.4.2 Sistema de unidades tradicionales.

El sistema de unidades que se empleaba para reportar los resultados de los plasmas de pacientes eran:

- Actividad de protrombina. Expresada como un porcentaje de varios tipos de la curva de dilución.
- Índice de protrombina. Expresada como la recíproca del radio de protrombina en porciento:

$$\frac{\text{TP plasma normal (s)}}{\text{TP plasma paciente (s)}} \times 100 = \text{IP}$$

- Radio de protrombina. Indicado como:

$$\frac{\text{TP plasma paciente (s)}}{\text{TP plasma normal (s)}} = \text{RP}$$

Al respecto, Biggs en 1965 mostró que se podía trazar - los radios de protrombina de manera lineal, tal y como lo - propusieron tiempo atrás ella y Marcfarlane en 1947. La ventaja de usar radios de protrombina era que el tiempo normal-siempre estaría expresado como la unidad en todos los méto - dos y lugares de laboratorio; la evidencia acumulada en el - Sistema Británico de control anticoagulante, mostró que el - método del radio reducía los efectos de las variaciones in - terlaboratorios de las técnicas. Desgraciadamente el reporte del TP de esta manera no garantizaba la uniformidad de los métodos interlaboratorio y, más aún de un lugar a otro, debi - do a que existía variación en el plasma de referencia emplea - do (pool de plasma citratado fresco o bien, plasma normal - liofilizado) y el tipo de diluyente. Se requería pues de una simple escala que fuera propiamente aplicada a diferentes - centros, con el fin de garantizar seguridad y uniformidad en la dosificación de un paciente en diferentes laboratorios.(16,19)

Esto no fue una tarea fácil, incluyó una serie de estudios y ensayos en muchos laboratorios de diversos lugares y, la cooperación del Comité Internacional de Estandarización - en Hematología y el Comité Británico Europeo para finalmente llegar a un acuerdo para reportar el TP en el control anti - coagulante oral. Con la introducción de una estandarización - de tromboplastina, se pudo obtener una nueva unidad para re - portar el TP; los primeros que consiguieron de alguna manera implementar y dar las bases de un nuevo procedimiento de ca - libración fueron: Rosemary Biggs y K.W.L. Denson, a raíz de esto se han observado esfuerzos en varios lugares del mundo - como es el caso del Colegio de Patólogos Americanos en - Estados Unidos, Poller en Inglaterra, entre otros.

El término de Radio Calibrado Internacional (ICR) fué - introducido, siendo éste el radio obtenido con el material - de referencia primario de la OMS: 67/40. Este nuevo sistema - dependió del sistema del radio; para cada tromboplastina, su radio de sensibilidad relativo fue el rango terapéutico usan

do otra tromboplastina. El radio de coagulación fué propues-  
to por Biggs y Denson; éste último propuso que la reactivi-  
dad de la tromboplastina dada podía ser comparada con la  
tromboplastina de referencia semejante a la Tromboplastina  
Comparativa Británica, comparando el radio de coagulación de  
una con la otra y expresado esto como el radio de sensibili-  
dad de tromboplastina = INR = radio normalizado internaconal.  
Así pues, el INR fue designado para monitorear el efecto del  
anticoagulante oral a largo plazo. Se definió como el tiempo  
de protrombina del paciente entre el tiempo de protrombina  
normal usando una Preparación de Referencia Internacional  
primaria o secundaria. En la práctica es simple el cálculo  
del INR del plasma de un paciente dado, conociendo el Índice  
de Sensibilidad Internacional (ISI) obtenido mediante la  
calibración de la tromboplastina a usar y aplicando una sim-  
ple fórmula:

$$\text{INR} = (\text{RP})^{\text{ISI}}$$

o bien, más práctico

$$\text{INR} = \text{antilog} (\text{ISI} \times \log \text{RP})$$

Con esto se construye una tabla de sensibilidad relati-  
va y el radio de coagulación arbitrario de 2.0, es tomado co-  
mo referencia.

La variación de los tiempos de protrombina mostrada en  
torno a la desviación de la correlación lineal es muy grande  
cuando las tromboplastinas de diferentes especies y de dife-  
rente composición son probadas en base a otra. (15,20,21,33)

#### I.4.3

##### Sistema de unidades propuesto.

Ha habido confusiones en reportes publicados concernientes al término tradicional del radio corregido británico, ya que éste es obtenido por la calibración de otras tromboplastinas (preparaciones de referencia nacional, - reactivos comerciales y extractos de cerebro humano) contra la tromboplastina comparativa británica, usando el método de calibración original. (7,10)

En la práctica se observó que para un INR conocido - (ej. 5.0) el comportamiento en radio, empleando dos tromboplastinas distintas difería debido a sus sensibilidades:

<u>Tromboplastina</u>	<u>RP</u>	<u>ISI</u>	<u>INR</u>
1	3.1	1.413	5.0
2	2.0	2.4	5.0

Por lo cual se dedujo que la calibración exacta de las preparaciones es requerida cuando los radios son seleccionados con los INR, aunque tengan valores de ISI diferentes. (15,18,20)

#### I.4.4

##### Preparaciones de referencia.

Al tratar de estandarizar la uniformidad de los resultados, se creó la necesidad de realizar preparaciones estándar de tromboplastinas y por lo tanto, partir de un punto de referencia; el objeto de las preparaciones estándar fue en un principio, el de emplearlas conjuntamente con la tromboplastina y métodos rutinarios, y con un mínimo de muestras normales y de pacientes tratados con anticoagulantes orales. Se requería que las preparaciones fueran sensibles, es decir, que detectaran el efecto anticoagulante ante drogas cumarínicas para así obtener resultados satisfactorios.

En particular, se observaba que las tromboplastinas de diversas especies podían tener sensibilidades totalmente diferentes ante estos defectos inducidos por los

anticoagulantes orales. El fracaso que se observó en un principio, aún contando con las preparaciones estándar, se debió más que otros factores a que la calibración tenía más atención a la dilución de la curva del plasma normal que a la sensibilidad para el defecto hemostático, inducido por drogas cumarínicas; sin embargo, ésto fue un buen principio para llegar a la estandarización actual de las tromboplastinas.

Patrocinado por el Comité Internacional en Trombosis y Hemostasis (ICTH) y, más recientemente por la Sociedad Internacional en Trombosis y Hemostasis, se ha discutido el problema de la estandarización en varias reuniones internacionales: Washington en 1967, Bath en 1969, Montreal y Munich en 1970 y, la OMS en 1973. La meta ha sido el obtener una estandarización internacional del TP con ensayos de materiales de referencia, abarcando técnicas usadas por la mayoría de los laboratorios en el occidente; en dicha estandarización participaron finalmente 199 laboratorios.

Después de mucha discusión, el Subcomité de Estándares de Tromboplastina del Comité Internacional en Hemostasia y Trombosis decidió en 1969, evaluar 5 tipos de reactivos de tromboplastina y designarlas tromboplastinas de referencia. Posteriormente su disponibilidad, uso y almacenaje estuvieron a cargo del Instituto de Investigación Médica en Inglaterra y el Instituto Nacional de Estándares Biológicos y Control (NIBSC) en Londres. (14,15,17,34,36)

A continuación se muestran las características de dichas tromboplastinas evaluadas:

TROMBOPLASTINA	1	2	3	4	5
CODIGO	69/223	67/40	68/434	70/115	70/178
TIPO	pura	combinada	combinada	combinada	pura
ORIGEN	cerebro humano	cerebro humano: F I, V.*	cerebro bovino: F I, V, cefalina**	cerebro conejo: F I, V.	cerebro conejo
PM EN SECO (mgms)	2.114	2.051	2.200	2.207-2.213	1.029
RECONSTITUCION	1.0 ml H <sub>2</sub> O dest.	2.2 ml CaCl <sub>2</sub> 3.2mM	2.2 ml CaCl <sub>2</sub> 3.2mM	2.2 ml H <sub>2</sub> O dest.	1.0 ml H <sub>2</sub> O dest.
USO	0.1 ml tromb 0.1 ml plasm 0.1 ml CaCl <sub>2</sub>	0.4 ml tromb 0.05 ml plas	0.4 ml tromb 0.05 ml plasm	0.25 ml tromb 0.01 ml plas	0.1 ml tromb 0.1 ml plas 0.1 ml CaCl <sub>2</sub>
No. AMPOLLETAS APORTADAS	3 000	-	-	4 000	1 800

TABLA No. 4 Propiedades de las tromboplastinas evaluadas

\* Plasma bovino absorbido, buffer y CaCl<sub>2</sub> (reactivo Oxford).

\*\* Thrombotest.

Dos de ellas han sido caracterizadas para el procedimiento de la estandarización: 67/40 y 68/434, siendo aceptada y disponible su distribución.

Por lo anterior se concluyó que:

- . Para la preparación 67/40 correspondía un radio de sensibilidad de 2.0 por definición.
- . Para la preparación 68/434 correspondía un radio de sensibilidad de 2.0 en términos de la preparación 67/40.

Por lo cual, las otras tromboplastinas podían ser cali-bradas en términos de la preparación 67/40. (1,3,4)

Una década después, en 1977 el Comité Internacional de Hemostasia y Trombosis de la OMS propuso un estudio de cali-bración de cinco tromboplastinas de referencia; para ello participaron 7 laboratorios europeos y 3 laboratorios ameri-canos. De dichas tromboplastinas se tenía que:

- a) Tres eran materiales de referencia del Departamento Comunitario de Referencia (BCR)
  - 1. BCT/099 Humana. Liofilizado de BCT por cortesía del Dr. L. Poller, del Laboratorio de Referencia Nacional de Reactivos y Control en Manchester, U.K.
  - 2. RBT/79 Conejo. Liofilizado de BCT pura de cerebro de conejo, por cortesía del Dr. K.W.E. Denson, de Reactivos de Diagnóstico Ltd. Thame, Oxfordshire.
  - 3. OBT/79 Bovino. Liofilizado de BCT de buey bovino (thrombotest), por cortesía de Nyegaard & Co.; Oslo Noruega.
- b) Dos eran preparaciones de referencia internacional secundaria de la OMS:
  - 1. 68/434 bovina.
  - 2. 70/178 conejo. (11,21,35)

Tal estudio fué debido a que la constante de calibración del material de referencia de conejo de la OMS difirió del valor originalmente publicado de 0.5 ISI. En este estudio se calibró a dichas tromboplastinas contra una IRP primaria de la OMS 67/40, resultando un valor de sensibilidad de 1.1 para la BCT/099; 1.0 para la OBT/79 y, 1.4 para la RBT/79. (17,37,38,39)

La BCR bovina y humana (materiales de referencia) tienen casi la misma sensibilidad, como el material de referencia

primario de la OMS, el cual, es particularmente importante en vista de la unión entre el sistema de la OMS y el sistema británico de estandarización que ha sido adoptado por muchas ciudades. La sensibilidad de la RBT es mucho más baja que la de las otras tromboplastinas, aunque la OBT es considerablemente más sensible a la de las demás. (14,36)

La calibración de tromboplastina es, en general, más precisa cuando las preparaciones son hechas entre preparaciones similares, de la misma especie; por tal razón, la OMS ha establecido IRP's de bovino, humano y conejo, calibradas en términos de la IRP humana 67/40.

El procedimiento de calibración implica la determinación de una serie de tiempos de protrombina, empleando 20 plasmas normales y 60 de pacientes cumarínicos, repartidos en 10 días diferentes y empleando plasmas diferentes para cada día, siendo muestras frescas de plasmas citratados o bien, de tipo liofilizado o congelado debiéndose probar con ambas tromboplastinas. Cuando los laboratorios tienen acceso a un gran número de pacientes se requieren las muestras de pacientes anticoagulados, de los más diversos niveles de anticoagulación, teniendo un INR de 1.5 a 5.0. Cuando los laboratorios tienen un número limitado de pacientes disponibles, se toman las muestras anormales sin tomar en cuenta los niveles de anticoagulación, evitando que sean los mismos en cada ocasión. (36,37)

Para la calibración se requiere que tales pruebas sean repetidas en 10 días diferentes, empleando plasmas diferentes: 2 normales y 6 anormales para cada día. No necesariamente debe realizarse en días consecutivos, pero deben ser completados lo más rápido posible y, ser la misma persona quien lo lleve a cabo a fin de disminuir el porcentaje de error experimental.

El orden de los pacientes en el ensayo es al azar, pero de la manera siguiente:

MUESTRA	IRP	WRP
Normal 1	I	II
Paciente 1	III	IV
Paciente 2	V	VI
Paciente 3	VII	VIII
Paciente 4	IX	X
Paciente 5	XI	XII
Paciente 6	XIII	XIV
Normal 2	XV	XVI

La estimación del ISI del lote, tomando en cuenta la precisión de la calibración para la preparación de referencia trabajada o nacional(WRP), debe tener un coeficiente de variación del 5.0% o menor. Trabajos sumamente satisfactorios admiten el 3% o menos. (7,10,38,39)

#### I.4.5

##### Plasmas de referencia.

Los plasmas de referencia que se emplean en la calibración, o bien, en el uso rutinario pueden ser de dos tipos básicamente:

1. Liofilizados. Los cuales manejan valores normales y anormales.
2. Frescos. Es decir, de donadores humanos sanos, en el caso de plasmas normales y, anticoagulados en el caso de plasmas anormales.

Las condiciones que debe reunir un plasma normal es: ser obtenido de adultos sanos, cumpliendo los requerimientos de la OMS (por lo menos dos pools de plasmas diferentes, entre 2.0-4.0 INR siendo necesarios para el procedimiento de calibración). El pool de plasma debe ser obtenido de humanos sanos; de la misma forma se obtienen los plasmas cumarínicos de por lo menos 10 pacientes diferentes, quienes han sido estabilizados a largo plazo con anti-coagulantes orales de por lo menos 6 semanas.

Cuando se emplea un pool de plasma liofilizado, éste debe haberse realizado de por lo menos 30 donadores diferentes, de tal forma que la preparación final sea plasma pobre en plaquetas el cual, se congela a  $-30^{\circ}\text{C}$  en recipientes apropiados; además, debe tener una estabilidad de por lo menos un año y poder emplearse como control de calidad rutinario. El primer lote de plasmas de referencia están - dar liofilizado fué preparado en septiembre de 1967. (38,39)

##### Reconstitución de plasma liofilizado.

El pH no debe exceder de 7.8 y la preparación no debe mostrar un tiempo de coagulación acortado o alargado en un lapso de tiempo de 2 horas a temperatura ambiente.

#### 1.4.6

##### Desgloce estadístico.

El método original fue basado en observaciones empíricas para los radios de protrombina en una serie de plasmas de pacientes, usando dos tromboplastinas diferentes argumentando una relación lineal al trazar su respectiva ecuación lineal:  $Y - 1 = b(X - 1)$ , donde X y Y eran referidas en radios de protrombina (horizontal y vertical respectivamente); la pendiente b se determinó como una constante de calibración internacional: icc la cual, para la IRP primaria 67/40, fue definida como 1.0 con el fin de tener un eje de referencia y de ahí partir para posteriores estandarizaciones. Las estandarizaciones posteriores requerían de una preparación de referencia secundaria para emplearse en lugar de la IRP en la calibración de otras preparaciones de trabajo, por lo tanto la fórmula a usar era:

$$icc_w = b_{ws} \cdot icc_s$$

Sin embargo, este modelo no parecía ser válido para todos los casos; además, se requería de definir los requerimientos estadísticos para la operación del esquema de la OMS, comparable a los de las aplicaciones de otras áreas de estandarización biológica. Las dificultades estadísticas en el original esquema de calibración fueron principalmente del hecho de que se tenían que emplear radios de protrombina, lo cual estaba sujeto a error por los plasmas normales empleados para el TP. La modificación básica de dicho modelo fue: emplear una escala logarítmica de los tiempos de protrombina en lugar de los radios de protrombina; ésta exitosa observación fue propuesta por Murphy, Denson y M. Hills. (38,39,41)

Por lo anterior, la ecuación para los TP's del esquema de calibración modificado quedaba de la siguiente manera:

$$NPTv = \text{antilog}(c \log NPT_h + d)$$

donde NPT = tiempo de protrombina del plasma normal  
 v = representa el valor del eje vertical  
 h = representa el valor del eje horizontal

Luego entonces, haciendo las sustituciones pertinentes se tenía que:

$$y = PTv / *NPTv$$

tomando el valor inicial de NPTv se tenía que

$$y = \text{antilog}(c \log P^h + d) / \text{antilog}(c \log N^h + d)$$

$$y = \text{antilog}[(c \log P^h + d) - (c \log N^h + d)]$$

$$y = \text{antilog}[c \log(P^h - N^h)]$$

$$y = (P^h / N^h)^c$$

y si:

$$x = RP = \frac{TP \text{ paciente}}{TP \text{ normal}}$$

entonces tenemos que:

$$y = x^c$$

donde: c = ISI

Con dicha modificación se observó en el trazo lo siguiente:

1. La gráfica mostró claramente el número y dispersión tanto de -  
plasmias de pacientes como de normales.
2. Aún tratándose de una observación empírica (como lo habían toma  
do Biggs y Denson) se observó este comportamiento.
3. Estos datos trazados fueron independientes de observaciones úni  
cas; además, se empleó una estimación para el trazo de las -  
rectas.
4. Otro aspecto que se tomó en cuenta fué el de utilizar nuevos -  
términos para evitar confusiones con el lenguaje anterior:  
- Índice de Sensibilidad Internacional (ISI), para denotar la  
pendiente c de la línea de calibración trazada en logTP, em-  
pleando como IRP a la 67/40 en el eje vertical.

-Radio o Razón Normalizada Internacional (INR), para denotar el radio del TP en base al ISI apropiado. (31,37,43)

Cuando se empleaba una IRP secundaria en el modelo modificado, se tomaba la ecuación:

$$ISI_w = C_{ws} \cdot ISI_s$$

donde:

w = preparación de trabajo

s = preparación de referencia secundaria

La imprecisión estadística del  $ISI_w$  era debida a la variación estadística en la pendiente de calibración  $C_{wt}$ , así como de algún error en la calibración de la preparación de referencia. Al emplear una regresión ordinaria se observaban serios problemas en la ecuación, pues el  $ISI_s$  y la  $C_{ws}$  se obtenían subestimados de los valores verdaderos y el  $ISI_w$  resultaba doblemente reducido debido a tal situación; esto condujo a obtener el análisis estadístico de otra forma, con otro tipo de regresión que no fuera la ordinaria para obtener la pendiente. ¿En qué consistía la nueva estimación estadística?. Se empleó un método más versátil de estimación de la línea de calibración empleando técnica de regresión ortogonal. Entonces, ¿cuál era la diferencia entre una y otra?. La regresión lineal empleaba la suma de cuadrados de las desviaciones de manera perpendicular a la línea, ocasionando desviaciones minimizadas de los valores; además, era el hecho en donde las varianzas de los logaritmos tanto del TPv como del TPh resultaban siendo iguales. Así pues, el usar el método de regresión ortogonal resultaba una estimación simétrica completamente de la relación lineal y, por modificaciones de las técnicas de regresión ordinarias, estimadores de precisión y pruebas de linealidad que podían ser derivadas. Otra ventaja que se observaba era que dicho método suprimía de manera implícita, el error estadístico en ambos ejes. Se hizo hincapié para la obtención del RP y calcular el INR respectivo mediante el valor de la obtención del TP normal. (5,8,35)

En lugar de emplear una media aritmética ordinaria como:

$$TP_N = (t_1 + t_2 + \dots + t_n) / n$$

se hizo uso de la media geométrica:

$$TP_N = \left\{ \text{antilog} \left[ (\log t_1 + \log t_2 + \dots + \log t_n) / n \right] \right\}$$

la diferencia entre una y otra era que:

$$\Sigma \text{ aritmética} < \Sigma \text{ geométrica}$$

Una vez obtenido el  $TP_N$  y sabiendo el ISI de la trombo-plastina a usar, el cálculo del INR quedaba así:

$$INR = (RP)^{ISI}$$

o bien:

$$INR = \text{antilog} (ISI \log RP)$$

Las estimaciones para la pendiente  $b$  e intercepción  $a$ , quedaban así:

$$b = m + \sqrt{m^2 + 1}$$

con

$$m = \frac{\Sigma (y - \bar{y})^2 - \frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{2r}}{2 \Sigma (x - \bar{x})(y - \bar{y})} = \frac{1 \cdot S_y - S_x}{2r S_x S_y}$$

y

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

donde:  $r$  = coeficiente de correlación lineal

$S_x, S_y$  = desviaciones estándar

$\bar{y}, \bar{x}$  = valores promedio

Esta línea de regresión ortogonal estima la relación entre los logaritmos del TP por segundo de la trombo-plastina

de referencia o reactivo local y la casa estándar.

Los cambios principales del modelo fueron:

- . La relación de calibración fue empleando log de TP en lugar de RP.
- . Dicha relación se invirtió, quedando la IRP en el eje vertical.
- . La pendiente de la línea de calibración se determina como el ISI de la tromboplastina de trabajo (eje horizontal) vs la IRP primaria 67/40 (eje vertical).\* (6,12,38,39,41)

\* Si se trata de una preparación de referencia secundaria, el ISI se calculará como el ISI de la pendiente de la línea de calibración - y el ISI de la preparación de referencia secundaria. La ecuación -  $y = x^c$  es usada para convertir un RP (x) mediante el ISI de la - tromboplastina a usar (c) en un equivalente radio normalizado internacional (y).

---

**CAPITULO II**

---

## CAPITULO II

### II.1. Planteamiento del problema.

En el presente trabajo se reprodujo el modelo de Biggs y Denson modificado, en el cual, se emplearon 20 plasmas de pacientes sanos y 60 plasmas de pacientes - anticoagulados repartidos en 10 días de trabajo. A dichos plasmas se les determinó su tiempo de protrombina empleando el método de Quick; se obtuvo asimismo su % de actividad mediante la construcción de la curva de referencia de las tromboplastinas comerciales empleadas se les determinó su radio de protrombina, así como también se obtuvo el parámetro fundamental de la calibración: el índice de sensibilidad internacional ISI, empleando una tromboplastina de referencia internacional secundaria de cerebro de conejo: RBT/79, con un ISI de 1.4 por definición. Esta cifra se calculó empleando el método de regresión ortogonal, para finalmente obtener el radio normalizado internacional INR de los plasmas problema.

Por otro lado, se manejó también la dosificación de factores de la vía extrínseca, evaluando cada uno de los factores involucrados: II, V, VII y X; se construyeron sus respectivas curvas de referencia empleando la tromboplastina calibrada, así como otra de referencia comercialmente disponible, a fin de observar su sensibilidad y reproducibilidad.

1. Validar el método de Biggs y Denson modificado, empleando una preparación de referencia internacional.
2. Agrupar plasmas normales y anormales para el proceso de calibración, obteniendo el respectivo ISI para así calcular el INR.
3. Construir curvas de referencia de las tromboplastinas empleadas mediante el método de Quick.
4. Construir las curvas de referencia de cada uno de los factores de la vía extrínseca y extrapolarlas a plasmas de pacientes problema para observar su comportamiento.

### II.3 Hipótesis

El método de Biggs y Denson modificado y aceptado por el Comité Experto de Estandarización Biológica de la OMS, es reproducible en un laboratorio de Coagulación Sanguínea tomando como referencia una trombo - plastina que reúne las condiciones de una IRP

---

**CAPITULO III**  
**PARTE EXPERIMENTAL**

---

## CAPITULO III

### Parte experimental.

#### III.1 Recursos.

##### III.1.1

##### Material.

Agujas estériles calibre 22 x 32 mm.  
Gasas  
Gradilla de metal con capacidad para 90 muestras  
Hielo en trozos  
Jeringas estériles de plástico con capacidad de 5 ml  
Papel logarítmico  
Papel milimétrico  
Perilla de plástico  
Pipeta graduada de: 0.1, 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0 ml  
Pipeta pasteur  
Recipiente para gradilla  
Torundas de algodón  
Tubos de ensaye de 12 x 75 mm  
Tubos de vidrio aforados a 5.0 ml  
Tubos de ensaye de 8 x 60 mm  
Vasos de precipitado de: 250 y 500 ml

##### III.1.2

##### Equipo.

Cronómetro manual  
Centrífuga refrigerada, modelo EC PRI Davon/EC DIVISION  
Fibrintimer Behring 10 (para evaluación del tiempo de coagulación)  
Incubadora de aire caliente con capacidad para 60 muestras  
Congelador modelo. REVCO, con temperaturas de -20°C.

### III.1.3

#### Material biológico.

- Plasma humano normal citratado fresco
- Plasma humano anormal (anticoagulado) citratado fresco
- Plasma liofilizado, deficiente en factor II
- Plasma liofilizado, deficiente en factor V
- Plasma liofilizado, deficiente en factor VII
- Plasma liofilizado, deficiente en factor X
- Tromboplastina cálcica liofilizada de placenta humana:
  - Trombocálcica
  - Thromborel S
- Tromboplastina no cálcica líquida de cerebro de conejo:
  - Trombolaf
- Tromboplastina de referencia internacional de cerebro-de conejo:
  - RBT/79

### III.1.4

#### Reactivos.

- Agua destilada
- Agua estéril
- Alcohol etílico al 70%
- Citrato trisódico al 3.8% (0.11 mol/l)
- Cloruro de calcio estéril al 0.025 M (25 mmol/l)
- Solución salina al 0.9%
- Solución tampón de dietilbarbiturato-acetato a pH entre 7.4 y 7.6 (veronal)

## III.2 Métodos.

### III.2.1

#### Obtención de la muestra.

##### 1. Plasmas normales:

- a) El plasma se obtuvo de pacientes sanos, ambulantes y preoperatorios de ambos sexos y presentando una edad entre los 15 a 45 años; sus antecedentes de coagulopatía fueron nulos y sus valores de TP que presentaron estuvieron arriba del 70% de actividad (datos recopilados de banco de sangre).
- b) La proporción manejada para la recolección de la muestra fué de 1:10, en dónde se empleó una parte de citrato trisódico al 3.8% con 9 partes de sangre venosa, en condiciones estériles, evitando la formación de espuma o coágulo de la muestra.
- c) La muestra fué centrifugada 15 minutos a 3000 rpm en centrifuga refrigerada.
- d) Se separó el paquete celular conservándose el plasma en baño de hielo hasta el momento de su uso, siéndo este tiempo no mayor de 2 hrs.

##### 2. Plasmas anormales:

- a) Sus condiciones en cuanto a edad y sexo fueron las mismas, variando su etiología pues éstos presentaron antecedentes de terapia anticoagulante oral que fué a corto (2-3 semanas) y a largo plazo (más de tres meses), empleando anticoagulantes derivados de la indanediolona o cumarínicos (fenindiona, warfarina, etc.).
- b) El rango que se manejó en términos de TP fué mayor al 1% de actividad pero menor al 70%.
- c) Su obtención y tratamiento fué el mismo que en el caso de un plasma normal.

### 3. Pool de plasma normal:

- a) El procedimiento de obtención fué exactamente el mismo que en el caso de un plasma normal, la única diferencia es que para hacerlo se contó con 8-10 plasmas, los cuales se mezclaron probándose como una sola unidad.

De manera global, para la obtención de este tipo de plasmas fué más recomendable el uso de citrato de sodio debido a que los factores lábiles V y VIII fueron más estables en dicho anticoagulante que empleando oxalato de sodio. Cuando la muestra apareció hemolizada o lipémica se descartó, lo mismo cuando la punción venosa se vió dificultada por problemas técnicos. (30)

### Evaluación del TP. Método de Quick.

Principio. Al adicionar una cantidad en exceso de un factor tisular (tromboplastina cuyo origen puede ser: cerebro de conejo, placenta humana, etc.) al plasma problema citratado, se provoca la activación de la vía extrínseca que involucra los factores II, V, VII y X, originando con ello, el coágulo de fibrina.

### Procedimiento.

1. Pipetear dentro de una fibrocopa (automatizado) o tubo de ensaye (manual), precalentado a 37°C, 0.1 ml de plasma citratado.
2. Incubar mínimo un minuto el plasma a 37°C y no más de tres minutos, ya que un tiempo prolongado provoca lecturas erróneas.
3. Adicionar al sistema 0.2 ml de reactivo de tromboplastina recalcificada, y precalentada a 37°C por lo menos 10 minutos.
4. Simultáneamente accionar el cronómetro deteniéndolo en el momento en que se haya formado un coágulo sólido visible. Este tiempo será el tiempo de coagulación del plasma en segundos.

Interpretación. El tiempo de protrombina es sensible en detectar aún, mínimas reducciones en las actividades de los factores II, V, VII y X, pero detectará sólo reducciones mayores en la concentración de fibrinógeno (por lo general, menos de 80 mg/dl).\*

Cuando se valora el TP en un plasma normal, sus valores de referencia van de 10 a 14 segundos o bien, en un % de actividad mayor del 70%, aunque cada laboratorio establezca sus propios rangos de acuerdo al tipo de reactivos y plasma que emplee.

Las causas de alargamiento y/o alteración del TP pueden deberse a:

- Colección defectuosa de la muestra, de modo que se ha producido una coagulación parcial y se examina suero en lugar de plasma.
- Déficit congénito de uno o más de los factores de la vía extrínseca.
- Déficit del fibrinógeno.
- Enfermedad del hígado.
- Enfermedad hemorrágica del recién nacido.
- Errores técnicos tales como temperatura, tromboplastina o cloruro contaminado, concentración inapropiada de sangre o anticoagulante, sincronización del tiempo, etc.
- Exceso de anticoagulante o bien, insuficiente cantidad de sangre es decir, que haya una proporción incorrecta de anticoagulante en relación con la sangre.

\*El TP es sensible al factor V el cual, siendo lábil, puede parcialmente decaer antes de que la prueba sea llevada a cabo, resultando un TP prolongado por esa contingencia; la pérdida del factor V rara vez ocurre si el plasma es mantenido en refrigeración mientras se lleva a cabo la prueba. Se sabe que la sangre recolectada en citrato en vez de oxalato, impide en gran parte la pérdida de ese factor.

- Hematócrito muy alto, que conduce a que haya menos plasma que en sangre normal, con el consiguiente exceso de anticoagulante.
- Ictericia obstructiva.
- Pérdida de las proteínas de la coagulación procedentes de la sangre a través del riñón y/o por insuficiencia renal.
- Terapéutica con heparina o con drogas de tipo cumarínico o indanediona.
- Uso de anticoagulante no apropiado. (9,20,29)

### III.2.3

#### Calibración de tromboplastinas.

Principio. Es siguiendo el método de Quick para la evaluación de los tiempos de protrombina.

Procedimiento. Se realizan 80 determinaciones en 10 días de trabajo, de los cuales 6 son de plasmas de pacientes anticoagulados y 2 de pacientes normales para cada día de trabajo, de acuerdo con el siguiente orden:

<u>PLASMA</u>	<u>IRP</u>	<u>WRP</u>
Normal 1	I	II
Paciente 1	III	IV
Paciente 2	V	VI
Paciente 3	VII	VIII
Paciente 4	IX	X
Paciente 5	XI	XII
Paciente 6	XIII	XIV
Normal 2	XV	XVI

La finalidad de realizar éstas 60 determinaciones anormales y 20 normales es para obtener una precisión de  $\approx$  3%, aunque es aceptable hasta un porcentaje menor al 5% considerando que las condiciones no sean tan óptimas. (14)

De acuerdo al origen de la tromboplastina a estandarizar, se tiene:

- A. Para la IRP (preparación de referencia internacional) bovina recalcificada, cuyo código es OBT/79:

- a. Transferir 0.4 ml de tromboplastina a los tubos de prueba.
  - b. Incubar por dos minutos.
  - c. Adicionar 0.05 ml de plasma no precalentado al tubo prueba, mezclar y accionar el cronómetro de manera simultánea.
  - d. Leer el punto final de la coagulación según se acostumbre en el laboratorio de trabajo.
- B. Para la IRP humana y de conejo no recalificadas, cuyos códigos son BCT/253 y BCT/099 para la humana y RBT/79 para la de conejo, tenemos:
- a. Transferir 0.1 ml de tromboplastina al tubo de prueba.
  - b. Incubar por dos minutos.
  - c. Adicionar 0.1 ml de plasma no precalentado.
  - d. Mezclar completamente con la tromboplastina.
  - e. Esperar un minuto la incubación para alcanzar la temperatura óptima de reacción (no pasando-se de tres minutos como máximo).
  - f. Recalcificar con 0.1 ml de  $\text{CaCl}_2$  cuya concentración sea de 25 mmol/l y previamente se haya incubado.
  - g. Leer la coagulación en su punto final con la técnica que se acostumbre en el laboratorio de trabajo.

La técnica puede extrapolarse también a equipo semiautomático; asimismo, para obtener las lecturas de la WRP - (preparación de referencia de trabajo) se realiza el mismo procedimiento de acuerdo al tipo de que se trate.

Interpretación. Una vez obtenidos los 80 valores de los 10 días de evaluación, los datos son graficados en papel milimétrico y sometidos a un análisis de regresión ortogonal con el fin de obtener el ISI correspondiente a la tromboplastina trabajada, para finalmente obtener el INR de cada plasma evaluado, con el cual, se puede visualizar el grado de anticoagulante que requiere el paciente de acuerdo a su padecimiento (problema pulmonar, cardíaco, hepático, etc.). (11,38,39)

Curvas de referencia de factores de la vía extrínseca.

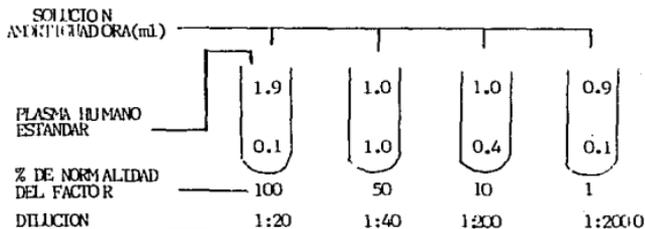
**Principio.** El porcentaje de actividad del factor  $Z^*$  en el plasma, puede ser determinado por el grado de corrección obtenido cuando se realiza una incubación del plasma del paciente diluido con un substrato de plasma deficiente en -- factor  $Z$  y adición de tromboplastina tisular recalcificada y previamente incubada, la cual activa los factores de la vía extrínseca de la coagulación. Se mide el tiempo transcurrido hasta la formación de un coágulo de fibrina, determinado por el método de Quick y mediante una curva de referencia trazada con el plasma humano estándar diluido (o bien, pool humano fresco normal) se determina el contenido del factor  $Z$  en el plasma del paciente.

**Procedimiento.** Se realiza en dos etapas:

A. Trazo de curvas de referencia.

1. Realizar diluciones de un plasma humano estándar o pool de plasma fresco citratado humano normal - con una solución amortiguadora, ya sea de dietilbarbiturato-acetato con pH de 7.4-7.6 (Veronal) o de Imidazol o bien, de tris(hidroxymethyl)aminomethane al mismo pH.

La manera de llevar a cabo éstas diluciones es como sigue:



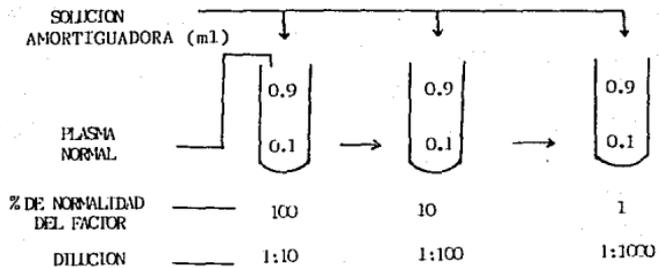
\*El factor  $Z$  representa al factor II, V, VII o X de la coagulación sanguínea.

2. Incubar la tromboplastina comercial a usar a una temperatura de 37°C por un tiempo mínimo de 15 - minutos, así como tubos de ensaye de 8 x 60 mm.
  3. Colocar en cada tubo de ensaye (previamente incu bado) 0.1 ml de substrato de plasma deficiente - en factor Z y agregarle 0.1 ml de cada una de - las diluciones realizadas (1:20, 1:40, 1:200 y 1:2000).
  4. Incubar a 37°C durante 60 segundos (lo más exa - cto posible).
  5. Añadir 0.2 ml de la tromboplastina a usar prein - cubada y determinar los tiempos de coagulación - con la ayuda de un cronómetro accionado de mane - ra simultánea.
  6. Trazar la curva de referencia del factor defi - ciente con las lecturas de TP obtenidas en papel logarítmico doble; los tiempos de coagulación ob tenidos (ordenadas) se trasladan al papel, en - función de la actividad del factor Z (abcisa) en % de la normalidad.
- B. Obtención del contenido del factor Z en un plasma - problema.
1. El procedimiento es prácticamente el mismo que para el trazo de las curvas, salvo que sólo se realiza al plasma problema en cuestión. A dicho plasma se le realiza una dilución 1:20 la cual - corresponderá al 100% de la normalidad de acuer - do a la construcción de la curva en el 100%.
  2. Extrapolar el valor obtenido a la curva realiza da previamente y, obtener de ésta forma el % - del factor Z del plasma problema.

Interpretación. El esquema y la serie de diluciones indicados son sólo un ejemplo de cómo construir tal curva, pero, dado que los tiempos de coagulación pueden variar según el método y aparato empleados así como el tipo de diluciones, cada laboratorio debe de realizar necesariamente sus propias curvas de referencia. Los valores deben de controlarse de período en período, especialmente después de usar un nuevo lote de reactivos. (33,35,37)

Aclaraciones:

- Las pruebas de diluciones dentro de los 30 minutos de su elaboración, son realizadas con buenos resultados.
- El exceso de agitación de los tubos de reacción pueden prolongar los tiempos.
- Las pruebas tratadas por duplicado deben ser exactamente semejantes realizandolas con el mayor cuidado posible.
- Llevar incubación, técnica y tiempo exactos nos dá resultados satisfactorios.
- Una nueva curva debe ser hecha cuando el reactivo , substrato de plasma o lote sean cambiados.
- Si una nueva curva de referencia no es determinada a una dilución 1:10 por ejemplo, de un plasma normal (correspondiente al 100%) debiera ser probado siempre con un control, así como con el desconocido. El tiempo obtenido debe checar entre  $\pm 1$  segundo del de la curva existente.
- Con la experiencia y confianza adquiridas, es válido y satisfactorio para determinar la curva normal, el usar solamente el 100. 10 y 1% de los puntos con diluciones más concentradas de acuerdo a la esquematización siguiente:



18.

### III.2.5

#### Estandarización de tromboplastinas.

Principio. Es el mismo que para el método de Quick.

Procedimiento. Se realizan 8 determinaciones para cada uno de los 10 días de prueba, de los cuales 6 son plasmas de pacientes anticoagulados y 2 de pacientes normales toman do en cuenta el siguiente orden:

<u>PLASMA</u>	<u>IRP</u>	<u>WRP</u>
Normal 1	I	II
Paciente 1	III	IV
Paciente 2	V	VI
Paciente 3	VII	VIII
Paciente 4	IX	X
Paciente 5	XI	XII
Paciente 6	XIII	XIV
Normal 2	XV	XVI

Cada una de las muestras de plasmas son evaluadas si -  
guiendo el procedimiento del método de Quick.

• Interpretación. Una vez obtenidos los 80 valores de -  
los 10 días de evaluación, los datos son graficados IRP vs-  
WRP, y sometidos a un análisis de regresión ortogonal, a -  
fin de obtener el ISI correspondiente a la tromboplastina -  
trabajada para finalmente calcular el INR de cada plasma -  
que se evalúe. Con ello se puede visualizar el grado de an-  
ticoagulación que el paciente requiere y/o si su terapia es  
la correcta de acuerdo al padecimiento que presente. (10,11,38,39)

Primeramente se contó con tres lotes de tromboplastina cálcica liofilizada procedente de placenta humana, marca Lafon; a dichas tromboplastinas se les realizó sus respectivas curvas de referencia (% de actividad vs tiempo - de protrombina) tomando como patrón a una tromboplastina de la misma presentación y origen pero con ISI conocido y de tipo comercial: Thromborel S de la marca Química --- Hoechs't. La construcción de las curvas fué empleando un pool de plasma fresco citratado y solución salina estéril al 0.9%.

Debido a la variabilidad en el trazo de las curvas , se realizaron a cada tromboplastina a evaluar, una serie de curvas en diferentes días de trabajo eligiéndose la - curva más representativa y con menor variación, la cual - nos sirve para evaluar plasmas de pacientes en este caso - pertenecientes al Hospital General del Centro Médico La Raza. Como no se encontró un comportamiento homogéneo y constante en las tres tromboplastinas a evaluar, se descartaron para el procedimiento de estandarización, a pesar de que - se contaba con la tromboplastina de referencia internacional BCT/253. En vista de lo obtenido, se proporcionaron - dos lotes más de tromboplastina de la misma marca, pero de diferente origen y presentación (cerebro de conejo y líquida sin recalcificar)\*: Se les realizó exactamente lo - mismo, con el mismo patrón de referencia y en diferentes - días de trabajo llegándose a la conclusión de que ésta presentación era la más apta por -

\*En vista de que el instructivo presentaba la siguiente recomendación: "Esta mezcla no debe incubarse hasta el momento de usarse", hubo confusión en el modo de incubación por lo cual, se hicieron pruebas a T ambiente y a 37°C para observar si existía diferencia, como no se encontró significancia por éste detalle, se trabajó como normalmente se hace con las liofilizadas.

presentar resultados más homogéneos y semejantes a la tromboplastina de referencia por lo que, cualquiera de los dos lotes eran buenos candidatos para ser estandarizados. Se tomó uno de los lotes para someterlo al proceso de calibración empleando una WRP que en éste caso fué el Thromborel S y contando con 60 plasmas anticoagulados y 20 normales en 10 días de trabajo. El siguiente paso era realizar la calibración con una IRP, sin embargo, no fue posible disponer más de este lote por razones internas del laboratorio Lafon por lo que hubo la necesidad de prolongar el tiempo, evaluando un lote líquido más el cual, se comportó semejante a los dos anteriores evaluados llevando finalmente a consumar el proceso de calibración con una IRP que en el caso concreto fué de cerebro de conejo: RBT/79; se pretendió también la realización de una calibración indirecta empleando una WRP con el Thromborel S, se realizó en un sólo día de trabajo debido a que no se contó con los 80 plasmas requeridos, finalmente se le realizó la dosificación de los factores de la vía extrínseca tomando como referencia al Thromborel S y se construyeron sus curvas respectivas para cada uno de éstos factores.

### III.3.1

#### Tromboplastinas liofilizadas.

Para la evaluación de las tromboplastinas liofilizadas cuyo origen fue de placenta humana se contó con lo siguiente:

A.	<u>Tromboplastina</u>	<u>Lote</u>	<u>Caducidad</u>	<u>ISI</u>
	Trombocálcica	TL261	31 Oct 88	-
	Trombocálcica	TL263	30 Dic 88	-
	Trombocálcica	TL264	30 Nov 89	-
	Thromborel S	505521A	31 Dic 89	1.14

- B. Plasma  
 Pool de plasma fresco citratado humano  
 Plasma de pacientes fresco citratado

C. Reactivo

Solución salina fisiológica estéril, al 0.9%

D. Equipo

Fibrintimer 10, de la marca Behring Diagnostika

Se construyeron curvas de referencia empleando el método de Quick y diluciones de pool de plasma fresco de la siguiente manera:

<u>% actividad</u>	<u>Pool plasma</u>	<u>sol.salina</u>
100	1 parte	-
50	5 partes	5 partes
25	1 parte	3 partes
12.5	1 parte	7 partes
10	1 parte	9 partes

El valor obtenido de las diluciones (TP en seg), se graficó en papel milimétrico haciéndolo de dos formas:

- lineal (obteniéndose una curva hiperbólica)
- recíproca (obteniéndose una curva lineal)

Con la ayuda del equipo Fibrintimer se trazaron de una manera estilizada ambas formas.

Una vez construidas las curvas, se evaluaron plasmas de pacientes:

- a) Se evaluaron 12 pool de plasmas frescos como con-  
troles normales, esto con el fin de obtener el va-  
lor de TP normal y extrapolarlo a RP. Para calcu-  
lar el valor del TP normal, fué necesario recurrir  
a una media geométrica a fin de disminuir errores,  
donde:

$$TP_{N\text{geom}} = \left[ \text{antilog} \left( \frac{\log t_1 + \log t_2 + \dots + \log t_n}{n} \right) \right]$$

$$TP_{N\text{geom}} < TP_{N\text{arit}}$$

- b) Asimismo, se evaluaron 105 pacientes de diferente-  
etiología a los cuales se les determinó su TP en -  
seg, % de actividad para cada una de las trombo -

plastinas empleadas, radio de protrombina en base al  $TP_N$  obtenido e indice de protrombina medido en porciento.

### III.3.2

#### Tromboplastinas liquidas

De acuerdo a la evaluaci3n sometida, fueron divididas en dos partes:

##### 1. Calibraci3n con WRP.

Se cont3 con dos lotes liquidos no recalificados cuyo origen era de cerebro de conejo.

A.	<u>Tromboplastina</u>	<u>Lote</u>	<u>Caducidad</u>	<u>ISI</u>
	Trombolaf	280	30 May 89	-
	Trombolaf	281	30 Jun 89	-
	Thromborel S (referencia)	505521A	31 Dic 89	1.14

##### B. Plasma

Pool de plasma fresco citratado  
Plasma de pacientes fresco citratado  
Plasma fresco normal citratado (20)  
Plasma fresco anormal citratado (60)

##### C. Reactivo

Soluci3n salina fisiol3gica est3ril al 0.9%  
Cloruro de calcio est3ril al 0.02M

##### D. Equipo

Fibrintimer 10

Se procedi3 a evaluar con 3stas presentaciones, sus respectivas curvas de referencia. Esta presentaci3n liquida cont3 con dos tipos de reactivos: suspensi3n y cloruro de calcio 0.02M, los cuales se mezclaron a partes iguales para obtener la tromboplastina recalificada. Se conto con:

- 8 pool de plasmas frescos para la obtenci3n del  $TP_N$ .
- Fueron manejados 62 plasmas de pacientes determi

nándose los mismos parámetros que para el caso anterior.

- c) Debido a que su comportamiento fue estable para ambos lotes, se tomó al lote 281 para la calibración; inicialmente se recolectaron los 80 plasmas requeridos, mismos que se evaluaron con una WRP que en éste caso fue el Thromborel S, ya que posee un ISI conocido, se realizó en 10 días de trabajo sin ningun percance, por lo que se recolectaron otros 80 plasmas para emplear una IRP, desgraciadamente no fue posible hacerlo con éste lote. Para la realización del análisis estadístico fue necesario recurrir a un programa de computación ya que eran considerables los datos obtenidos y las operaciones a realizar.

La herramienta estadística requerida fue:

$$C_{WRP,b} = m + (m^2 + 1)^{1/2}$$

$$\text{donde } m = \frac{\sum (LPT_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})^2 - \sum (LPT_b - \overline{LPT}_b)^2}{2 \sum [(LPT_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})(LPT_b - \overline{LPT}_b)]}$$

$LPT_{WRP}$  = logaritmo del TP individual, empleando WRP

$\overline{LPT}_{WRP}$  = media de los logaritmos del TP, empleando WRP

$LPT_b$  = logaritmo del TP individual, empleando el lote experimental

$\overline{LPT}_b$  = media de los logaritmos del TP, empleando el lote experimental

$\sum$  = denota la sumatoria de los términos de todos los plasmas

El índice de sensibilidad internacional del lote experimental  $ISI_b$  es calculado como sigue:

$$ISI_{WRP,b} = ISI_{WRP} \cdot C_{WRP,b}$$

El error estándar del  $ISI_{WRP}$  se calcula como:

$$SE_{(ISI_{WRP})} = ISI_{WRP} \cdot SE_{(C_{WRP,b})}$$

La fórmula para calcular el  $SE_{(CWRP,b)}$ , usando la regresión ortogonal es:

$$SE_{(CWRP,b)} = \left[ \frac{(1 + C^2)U + VC - VC}{nU^2} \right]^{1/2}$$

donde:

$n$  = No. total de plasmas probados (pacientes y normales)

$C$  =  $C_{WRP,b}$

$U$  =  $(LPT_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})(LPT_b - \overline{LPT}_b)/n$

$V$  =  $\left\{ \sum (LPT_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})^2 - C (LPT_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})(LPT_b - \overline{LPT}_b) \right\} / (n - 2)$

El coeficiente de variación en por ciento es:

$$\%CV_{ISI_{WRP}} = 100 \cdot SE_{ISI_{WRP}} / ISI_{WRP}$$

Como el  $ISI_{WRP}$  y la  $C_{WRP,b}$  son determinadas en ejercicios de calibración independiente, el error estándar del  $ISI_b$ , tomando en cuenta la imprecisión del lote, el  $ISI_{WRP}$  y la  $C_{WRP,b}$  pueden ser calculados como:

$$SE_{(ISI_b)} = \left[ \left\{ ISI_{WRP} \cdot SE_{(CWRP,b)} \right\}^2 + \left\{ C_{WRP,b} \cdot SE_{(ISI_{WRP})} \right\}^2 \right]^{1/2}$$

El coeficiente de variación del  $ISI_b$  será entonces:

$$\%CV_{ISI_b} = 100 \cdot SE_{(ISI_b)} / ISI_b *$$

\* Esto es aplicable cuando se trabaja con una WRP en lugar de una IRP en el procedimiento de calibración de la tromboplastina. (38,39)

Con los resultados de TP de los 80 plasmas, se construyó un diagrama de dispersión correspondiente a la calibración del lote 281 de Trombolaf, en términos del Thromborel S y empleando herramienta estadística para ajustar los datos a una recta por mínimos cuadrados: (8,12,41)

$$\hat{y} = b\hat{x} + a$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$b = SP_{xy}/SC_x$$

$$SC_x = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$SC_y = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

$$SC_{xy} = \sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}$$

$$r = \frac{SP_{xy}}{\sqrt{SC_x SC_y}} \quad r^2 = \frac{SP_{xy}^2}{SC_x SC_y}$$

donde:

- a, b = constantes de calibración
- y = promedio de los valores de la WRP (Thromborel S)
- x = promedio de los valores de la b (Trombolaf)
- SP = sumatoria del producto
- SC = sumatoria de los cuadrados
- r = índice de correlación lineal
- r<sup>2</sup> = índice de correlación lineal cuadrática

2. Calibración con IRP y WRP.

Se contó con otro lote líquido no recalificado - de tromboplastina:

A. Tromboplastina	Lote	Caducidad	ISI
Trombolaf	284	30 Jul 89	-
Thromborel S	505534	Oct 90	1.09
RBT/79	W1051999	-	1.4
B. Plasma			
Fué igual que para el caso anterior			

C. Reactivo

Igual que para el caso anterior

D. Equipo

El mismo

Se realizó la evaluación de las curvas de referencia de los dos lotes comerciales empleados en varios días de trabajo, obteniéndose la más idónea en cada caso. Se obtuvo un TP normal contando con 10 pool de plasmas frescos; así también, para la evaluación de los plasmas de pacientes, se contó - con una población de 100 pacientes a los cuales se les determinaron los mismos parámetros anteriores, además del INR.

Una vez realizado lo anterior, se procedió a la calibración del trombolaf lote 284, empleando su homóloga IRP cuyo código es RBT/79 más los 80 plasmas señalados y empleados en 10 días de trabajo; con los valores de TP de esos 80 plasmas se obtuvo el diagrama de dispersión IRP vs WRP, y se manejó-herramienta estadística muy semejante a la empleada en la calibración indirecta del lote 281 para el cálculo del ISI, su diferencia estriba en emplear IRP en lugar de WRP, por lo cual se obtiene:

$$C_{IRP,WRP} = m + (m^2 + 1)^{1/2}$$

donde:

$$m = \frac{\sum (LPT_{IRP} - \overline{LPT}_{IRP})^2 - \sum (LPT_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})^2}{2 \sum [(LPT_{IRP} - \overline{LPT}_{IRP})(LPT_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})]}$$

El índice de sensibilidad internacional de la WRP se calcula como:

$$ISI_{IRP,WRP} = ISI_{IRP} \cdot C_{IRP,WRP}$$

El error estándar del ISI<sub>WRP</sub>:

$$SE_{ISI,WRP} = ISI_{WRP} \cdot SE_{CIRP,WRP}$$

Para la obtención del SE<sub>CIRP,WRP</sub> se tiene lo siguiente:

$$SE_{CIRP,WRP} = \left\{ \frac{[(1 + C^2)U + VC] \cdot VC}{n U^2} \right\}^{1/2}$$

Su coeficiente de variación se obtiene como:

$$\%CV_{ISIWRP} = 100 \cdot SE_{ISIWRP} / ISI_{WRP}$$

Para realizar el diagrama de dispersión  $y$  en  $\underline{x}$ , fue necesario calcular el ajuste de la recta por mínimos cuadrados teniendo el comportamiento de cada uno de los 10 días, así como el del global.

Se pretendió realizar además, la estandarización indirecta con éste lote, empleando una WRP, pero debido a que sólo se contó con 11 plasmas normales y 31 plasmas anticoagulados, se valoraron en un sólo día de trabajo obteniéndose su respectivo diagrama de dispersión e ISI. (38,39)

### III.3.3 Evaluación de factores de la vía extrínseca

Su determinación se hizo con trombolaf lote 284, empleando la técnica de Quick y siguiendo el principio mencionado para ésta evaluación.\* La construcción se llevó paralelamente con una tromboplastina de referencia: ThromborelS

\*Cabe mencionar que, aunque se puede llevar a cabo una curva de referencia con otras diluciones diferentes a las mencionadas en la técnica, esto dependerá de la facilidad del ejecutor, así como de la dilución que se le dé al plasma en el 100% del normal.

Para ésta evaluación se contó con lo siguiente:

A.	<u>Tromboplastina</u>	<u>Lote</u>	<u>Caducidad</u>	<u>ISI</u>
	Trombolaf	284	30 Jul 89	-
	Thromborel S	505521A	31 Dic 89	1.14
B.	<u>Plasma</u>	<u>Lote</u>	<u>Caducidad</u>	
	Pool fresco citratado	-	-	
	Fresco, de paciente	-	-	
	Estándar normal ORKL	502509B	30 Jun 88	
	Control anormal:			
	Pathoplasma I	502860A	Oct 89	
	Control anormal:			
	Pathoplasma II	502949A	31 Dic 88	
	Deficiente en F II	CF <sub>2</sub> -56	29 Sep 88	
	Deficiente en F V	503529A	31 Dic 88	
	Deficiente en F VII	500736B	31 Dic 88	
	Deficiente en F X	504224A	31 Dic 88	
C.	<u>Reactivos</u>			
	Solución tampón de veronal a pH 7.4			
	Cloruro de calcio 0.02 M			
D.	<u>Equipo</u>			
	Baño de aire Adams Bath Incubator			
	Lámpara de luz blanca			
	Cronómetros			

Una vez trazadas las curvas, sólo fué posible valorar 6 plasmas problema, tres de los cuales fueron controles liofilizados y los otros tres, de pacientes con coagulopatía no definida.

---

**CAPITULO IV**  
**RESULTADOS**

---

## CAPITULO IV

### Resultados

#### IV.1

##### Tromboplastinas liofilizadas

##### A. Curvas de referencia.

A continuación se muestran las curvas obtenidas para los tres lotes liofilizados de tromboplastinas - evaluadas y la de referencia.

##### B. TP normal.

Para la obtención del TP normal se tuvo lo siguiente:

Tiempo de protrombina (seg)				
Promedio	505521A	TL261	TL263	TL264
geométrico	10.99	14.70	13.84	10.41
aritmético	11.01	14.91	13.93	10.43

##### C. Evaluación de pacientes.

Fueron evaluados 105 de diferente etiología:

Paciente	No.	%Global de pacientes
Preoperatorio	54	51.42
Hospitalizado	31	29.52
Anticoagulado	20	19.06

TRONBOPLASTINA CALCICA LIOFILIZADA: THROMBOREL S  
 LOTE : 505521A  
 PLASMA : PLASMA FRESCO CITRATADO

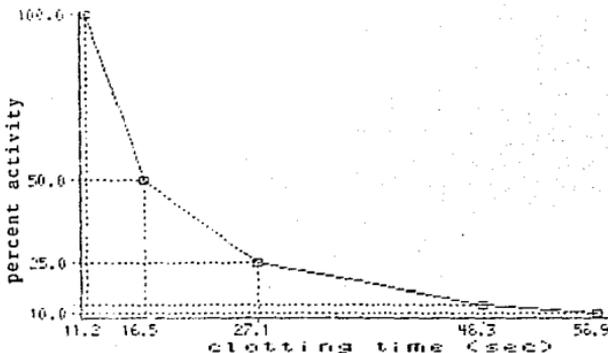
Prog. 10

calibration procedure

graph. 341

11.2	11.2
16.5	16.5
27.1	27.1
48.3	48.3
58.9	58.9

T	SEC
10.0	58.9
12.5	48.3
15.0	27.1
50.0	16.5
100.0	11.2
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0



aktor : 5W

WORK SCREEN

$$\text{FACTOR} = \frac{58.9 - 11.2}{1/10 - 1/100} = 530$$

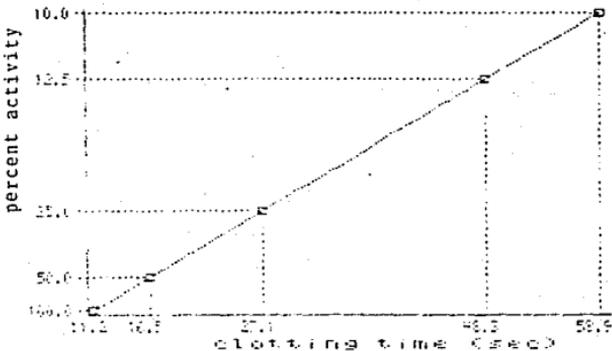
Prog. 10

calibration procedure

graph. 341

11.2	11.2
16.5	16.5
27.1	27.1
48.3	48.3
58.9	58.9

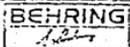
T	SEC
10.0	58.9
12.5	48.3
15.0	27.1
50.0	16.5
100.0	11.2
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0



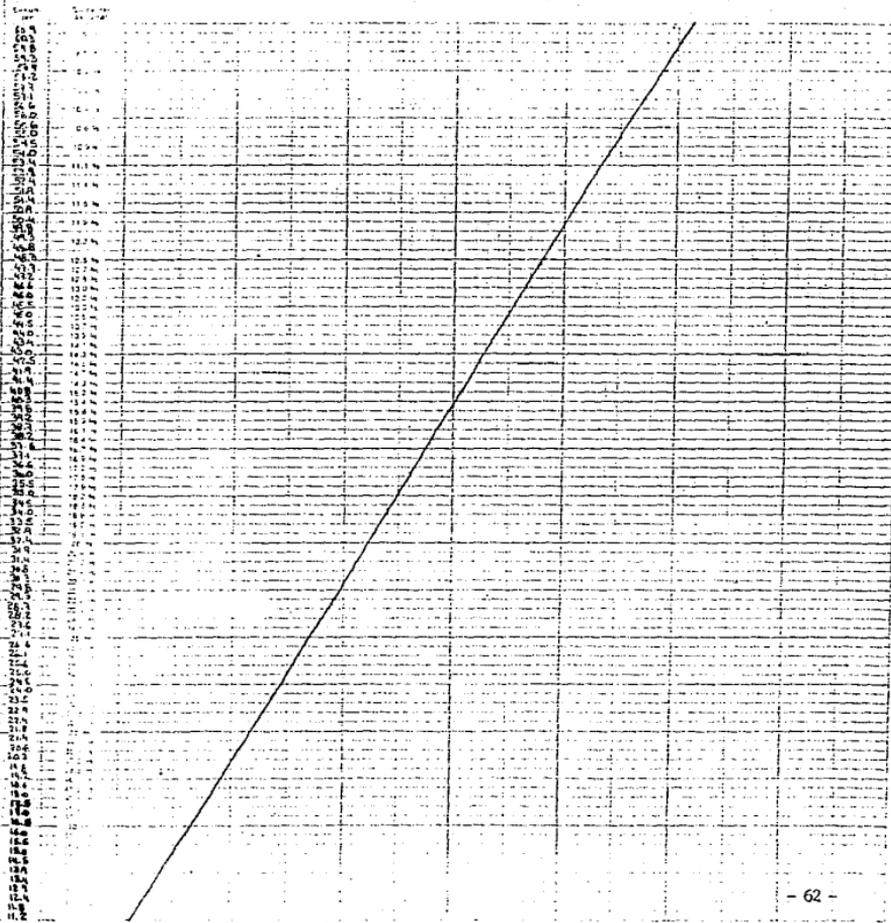
faktor : 5W

WORK SCREEN

# Bezugskurve zur Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick



Thromborel S                      K. Nr. LOJE: 505521A                      Datum CAD: 31 DIC 89  
 Standardhuman-Plasma        K. Nr. PLASMA: PRESCD                      Untersucher: S/N



GRAFICA No. 3 Curva de referencia del Thromborel S 505521A

TRONHOPLASTINA CALCICA LIQUIDIZADA: TROMBOCAL  
 LOTE : TL 261  
 PLASMA : POOL FRESCO CITRATADO

reg. 10

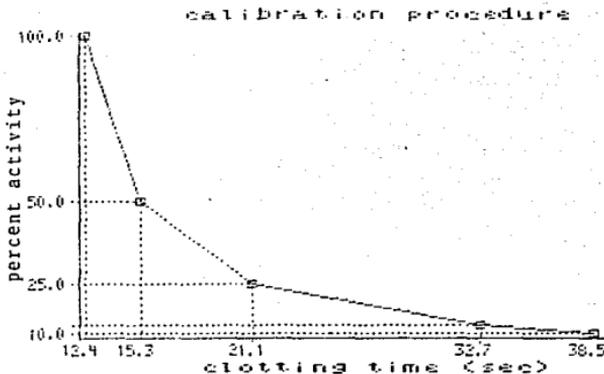
graph. sel

1.0 1.0

rec: rec:

log log

%	sec
10.0	38.5
25.0	21.1
50.0	15.3
100.0	12.4
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0



factor : 20

WORK SCREEN

$$CIOR = \frac{38.5 - 12.4}{1/10 - 1/100} = 200$$

reg. 10

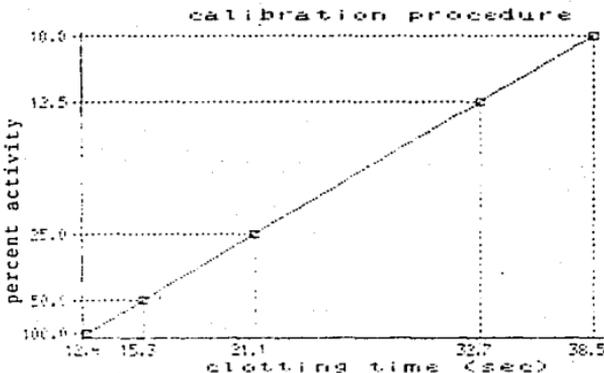
graph. sel

1.0 1.0

rec: rec:

log log

%	sec
10.0	38.5
25.0	21.1
50.0	15.3
100.0	12.4
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0



factor : 20

WORK SCREEN

GRAFICA No. 4 Curva de referência de Trombocal TL 261

# Bezugskurve zur Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick

**BEHRING**  
*Frankfurt*

Thromborel S

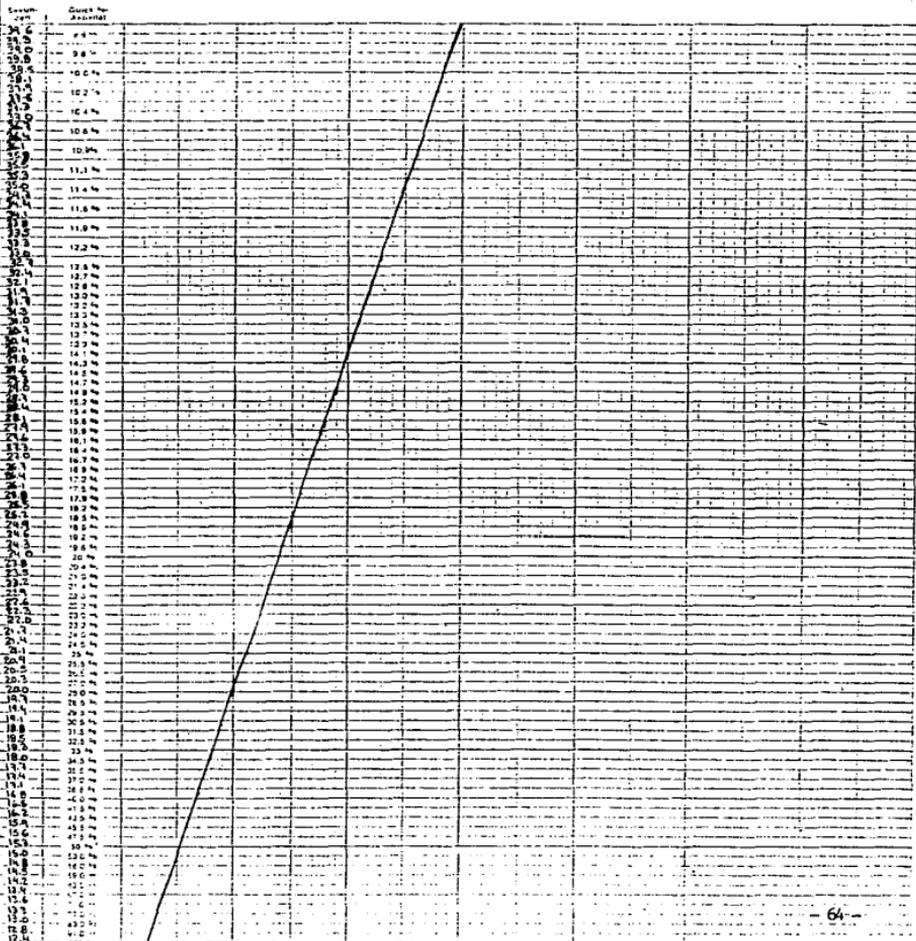
K. Nr. LOTIE: TL 261

Datum CAD: 31 OCT 88

Standard-Human-Plasma

K. Nr. FLASMA: FRESOD

Untersucher S/N



GRAFICA No. 5 Curva de referencia de Trombocel TL 261

TRONBOPLASTINA CALCICA LIOFILIZADA: TROMBOCAL

LOTE : TL 263

PLASMA : POOL FRESCO CITRATADO

Prog. 10

calibration procedure

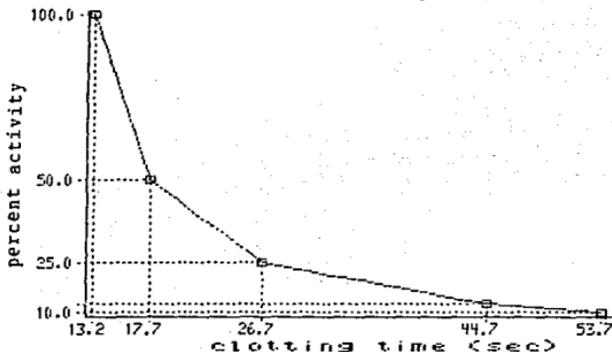
graph. sel

lin lin

reci reci

log log

%	sec
10.0	53.7
12.5	44.7
25.0	26.7
50.0	17.7
100.0	13.2
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0



aktor : 45

$$\text{AKTOR} = \frac{53.7 - 13.2}{1/10 - 1/100} = 450$$

work screen

Prog. 10

calibration procedure

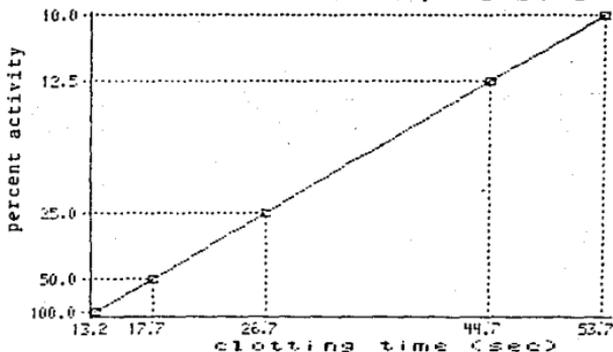
graph. sel

lin lin

reci reci

log log

%	sec
10.0	53.7
12.5	44.7
25.0	26.7
50.0	17.7
100.0	13.2
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0



aktor : 45

work screen

# Bezugskurve zur Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick



(Thromborel S)

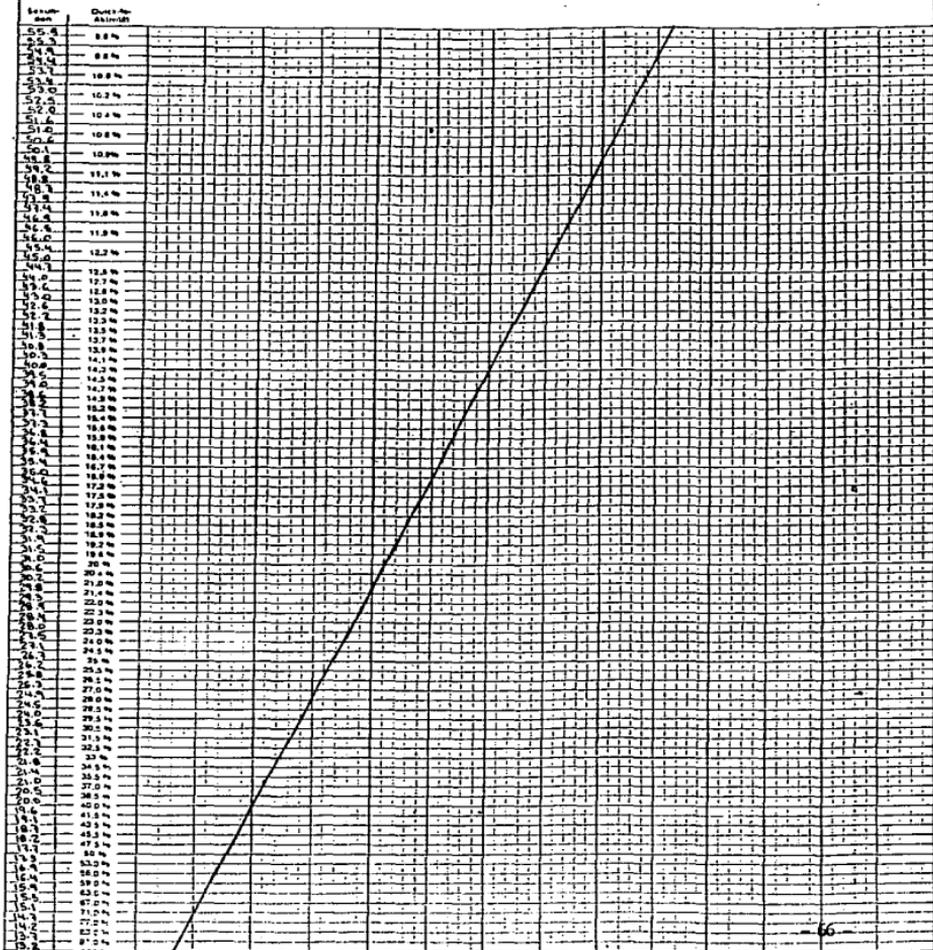
K. Nr. LOTE: TL 263

Datum CAD: 30 DIC 88

(Standard-Human-Plasma)

K. Nr. PLASMA: PRESCO

Untersucher S/N



TROMBOPLASTINA CALCICA LIOFILIZADA: TROMBOCAL  
 LOTE : TL 264  
 PLASMA : POOL FRESCO CITRATADO

reg. 10

calibration procedure

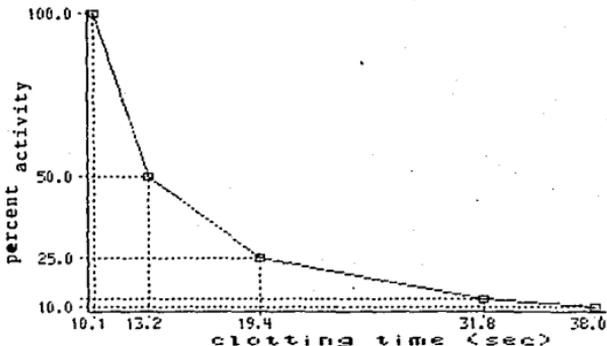
graph. sel

lin lin

reci reci

log log

%	sec
10.0	38.0
12.5	31.8
25.0	19.4
50.0	13.2
100.0	10.1
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0



faktor : 31

work screen

$$MOR = \frac{38.0 - 10.1}{17/10 - 17/100} = 310$$

reg. 10

calibration procedure

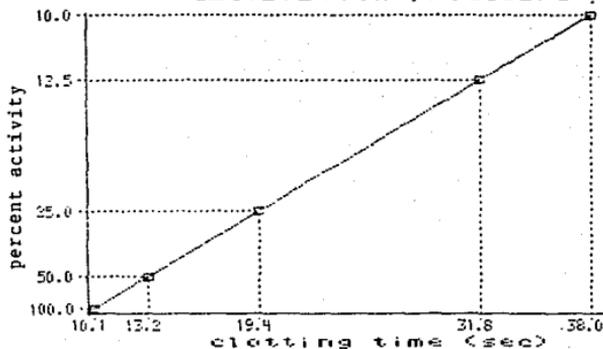
graph. sel

lin lin

reci reci

log log

%	sec
10.0	38.0
12.5	31.8
25.0	19.4
50.0	13.2
100.0	10.1
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0



faktor : 31

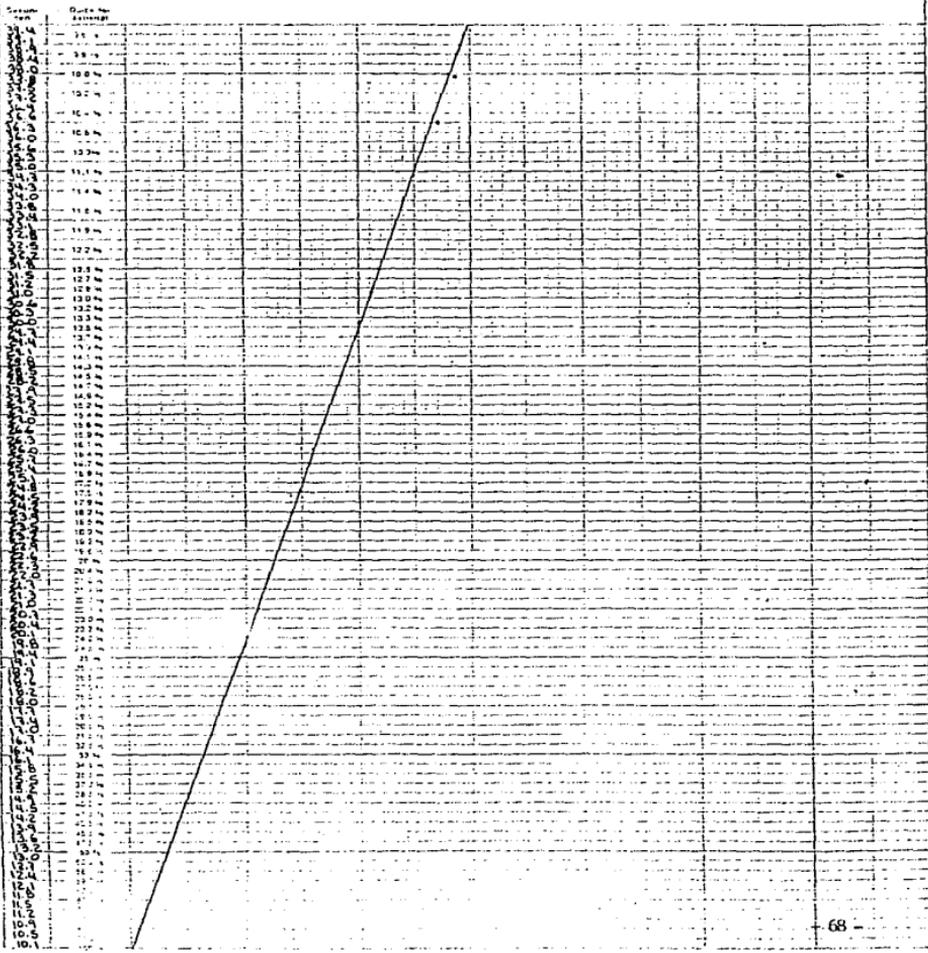
work screen

GRAFICA No. 8 Curva de referencia de Trombocal TL 264

# Bezugskurve zur Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick



(Thromboplastin) K. Nr. LOJE: TL 264 Datum CAD: 30 NOV 89  
 Standard-Human-Plasma K. Nr. PLASMA: FRESCO Untersucher S/N



GRAFICA No. 9 Curva de referencia de Tromboplast TL 264

Su comportamiento, empleando cada una de las tromboplastinas es como sigue:

Lote	Parámetro	Tipo de paciente		
		Preoperatorio	Hospitalizado	Anticoagulado
505521A	TP	11.62 ± 1.13	13.06 ± 2.50	27.72 ± 17.01
	% Activ	91.06 ± 10.57	79.14 ± 18.48	45.59 ± 32.49
	RP	1.06 ± 0.10	1.19 ± 0.23	2.52 ± 1.55
	IP	95.39 ± 9.11	86.75 ± 14.30	56.07 ± 30.13
TL 261	TP	13.88 ± 2.97	16.34 ± 4.45	25.01 ± 11.62
	% Activ	76.80 ± 26.30	55.6 ± 27.93	30.81 ± 21.72
	RP	0.94 ± 0.20	1.11 ± 0.30	1.70 ± 0.79
	IP	109.85 ± 19.31	95.22 ± 21.07	69.26 ± 25.98
TL 263	TP	14.70 ± 1.39	15.86 ± 2.43	26.22 ± 10.18
	% Activ	78.68 ± 14.99	69.78 ± 21.07	36.65 ± 22.34
	RP	1.06 ± 0.10	1.14 ± 0.18	1.89 ± 0.74
	IP	94.97 ± 8.51	89.13 ± 12.81	60.49 ± 22.06
TL 264	TP	10.70 ± 0.87	10.96 ± 1.37	17.69 ± 7.50
	% Activ	85.56 ± 12.17	83.13 ± 18.26	46.54 ± 30.50
	RP	1.03 ± 0.08	1.05 ± 0.13	1.70 ± 0.72
	IP	97.90 ± 8.21	96.24 ± 10.59	68.01 ± 24.32

TABLA No. 5 Evaluación de tromboplastinas liofilizadas.

## IV.2

Tromboplastinas líquidas

## 1. A. Curvas de referencia.

Se obtuvieron para éstos dos lotes: 280 y 281-tomándose como referencia a la curva del Thromborel S, lote 505521A, su trazo se observa en la página siguiente.

## B. TP normal.

Los valores obtenidos fueron:

Promedio	Tiempo de protrombina (seg)		
	505521A	280	281
geométrico	11.006	12.466	11.321
aritmético	11.040	12.490	11.340

## C. Evaluación de pacientes.

Para éstos lotes en particular, se evaluaron - 62 pacientes:

Paciente	No.	%Global pac.
Preoperatorio	31	50.00
Hospitalizado	14	22.58
Anticoagulado	17	27.42

TROMBOPLASTINA NO CALCICA LIQUIDA: TROMBOLAF  
 LOTE : 280  
 PLASMA : FOOO FRESCO CITRATADO

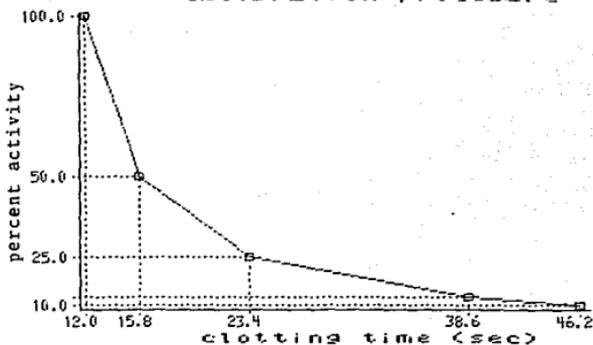
Prog. 10

calibration procedure

graph. set

lin	lin
reci	reci
log	log

%	sec
10.0	46.2
12.5	38.6
25.0	23.4
50.0	15.8
100.0	12.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0



faktor : 38

$$\text{ACTOR} = \frac{46.2 - 12.0}{1/10 - 1/100} = 380$$

WORK SCREEN

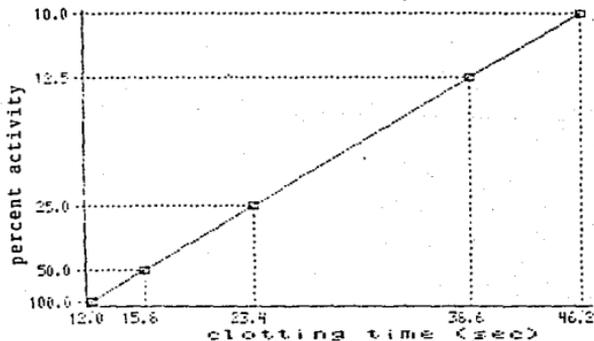
Prog. 10

calibration procedure

graph. set

lin	lin
reci	reci
log	log

%	sec
10.0	46.2
12.5	38.6
25.0	23.4
50.0	15.8
100.0	12.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0



faktor : 38

WORK SCREEN

GRAFICA No. 10 Curva de referencia de Trombolaf L 280

# Bezugskurve zur Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick



(Thromborel S)

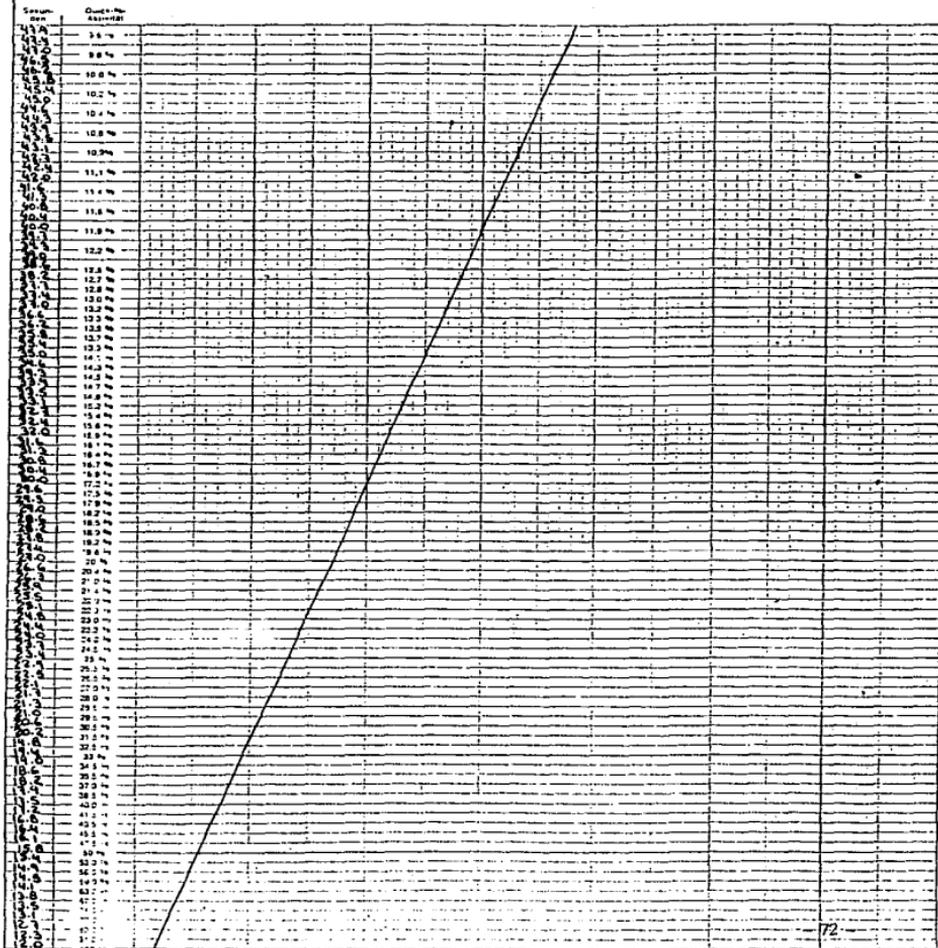
K. Nr. LOTE: 280

Datum CAD: 30 MAY 89

Standard-Human-Plasma

K. Nr. PLASMA: FRESKO

Untersucher S/N



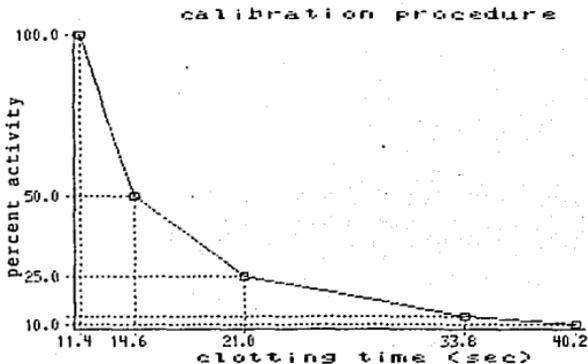
TROMBOPLASTINA NO CALCICA LIQUIDA: TROMBOLAF  
 LOTE: 281  
 PLASMA : POOL FRESCO CITRATADO

Prog.10

graph. sel

lin	lin
reci	reci
log	log

%	sec
10.0	40.2
12.5	33.8
25.0	21.0
50.0	14.6
100.0	11.4
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0
0.0	0.0



faktor : 32

work screen

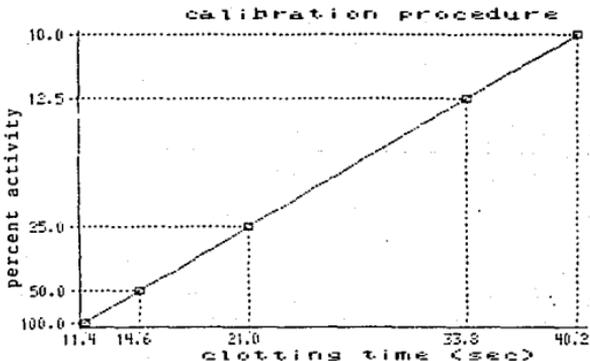
$$\text{ACTOR} = \frac{40.2 - 11.4}{1/10 - 1/100} = 320$$

Prog.10

graph. sel

lin	lin
reci	reci
log	log

0	%	sec
1	10.0	40.2
2	12.5	33.8
3	25.0	21.0
4	50.0	14.6
5	100.0	11.4
6	0.0	0.0
7	0.0	0.0
8	0.0	0.0
9	0.0	0.0

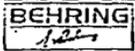


faktor : 32

work screen

GRAFICA No.12 Curva de referencia de Trombolaf L 281

# Bezugskurve zur Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick



(Thromborel S)

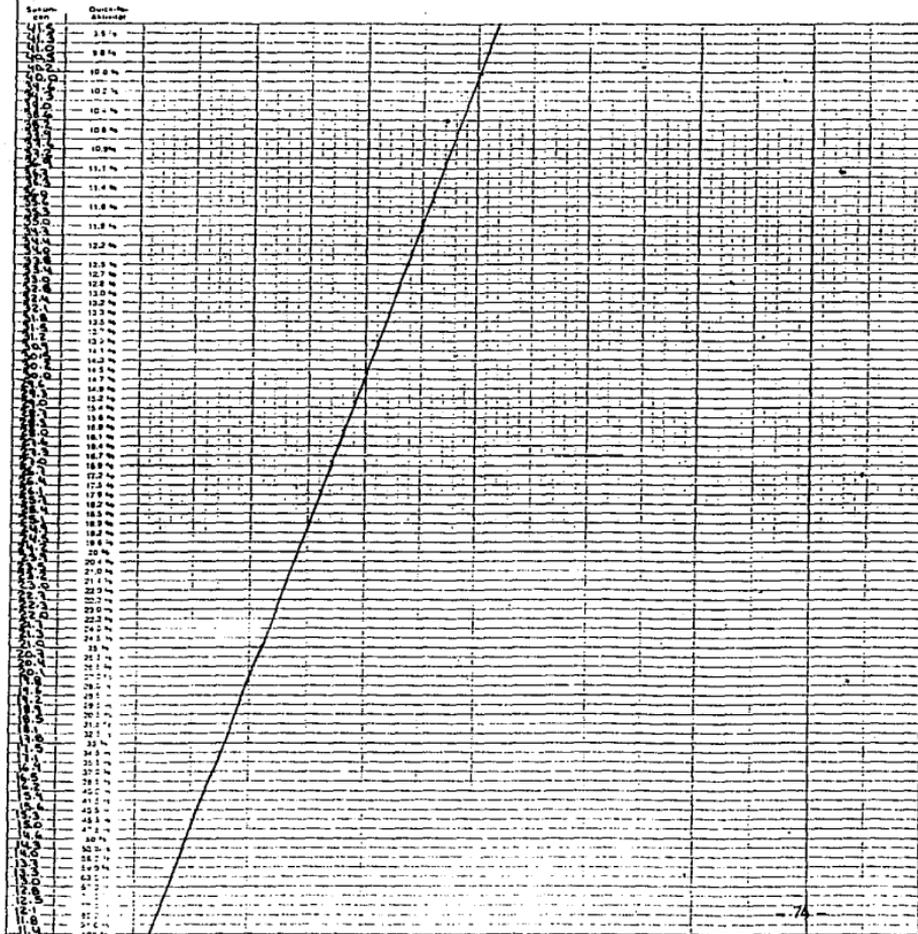
K. Nr. LDTE: 261

Datum CAD: 30 JUN 89

Standard-Human-Plasma

K. Nr. PLASMA: FRESOO

Untersucher S/N



Los tiempos de coagulación encontrados en los plasmas de pacientes con cada una de las tromboplastinas fue:

Lote	Parámetro	Tipo de paciente		
		Preoperatorio	Hospitalizado	Anticoagulado
505521A	TP	12.90 ± 2.10	13.24 ± 1.88	22.04 ± 9.70
	%	79.96 ± 17.35	70.84 ± 16.71	43.66 ± 21.68
	RP	1.17 ± 0.19	1.20 ± 0.17	2.00 ± 0.88
	IP	87.23 ± 12.29	84.59 ± 10.89	57.76 ± 20.21
280	TP	13.79 ± 1.43	14.04 ± 1.23	17.92 ± 4.09
	%	70.48 ± 15.42	66.51 ± 12.35	44.34 ± 15.57
	RP	1.10 ± 0.11	1.13 ± 0.10	1.44 ± 0.33
	IP	91.28 ± 8.72	89.40 ± 7.22	72.61 ± 14.34
281	TP	12.53 ± 1.19	12.88 ± 1.11	15.91 ± 3.35
	%	77.46 ± 16.07	72.56 ± 16.38	49.04 ± 18.80
	RP	1.11 ± 0.11	1.14 ± 0.10	1.40 ± 0.30
	IP	91.14 ± 8.45	88.49 ± 7.34	73.85 ± 13.67

TABLE No. 6 Evaluación de tromboplastinas líquidas, empleando una liofilizada de referencia.

D. Estandarización indirecta.

Fué realizado con el lote 281 del trombolaf-  
en 10 días de trabajo encontrándose lo si -  
guiente:

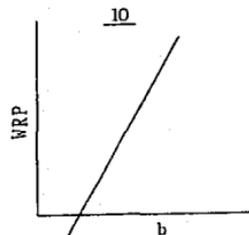
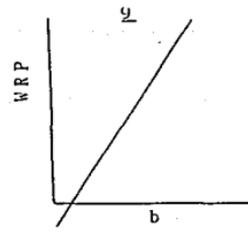
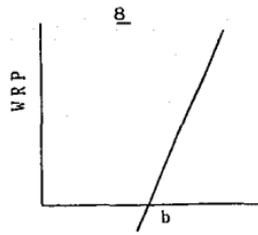
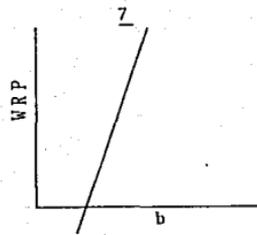
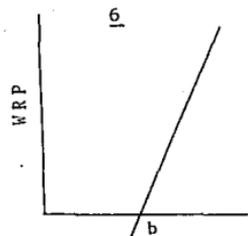
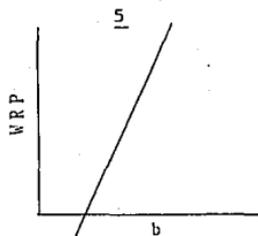
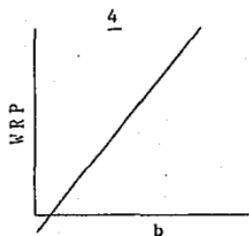
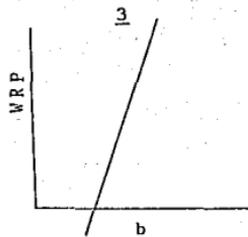
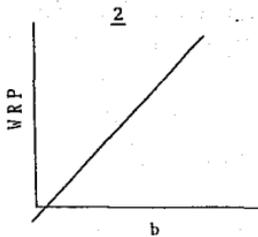
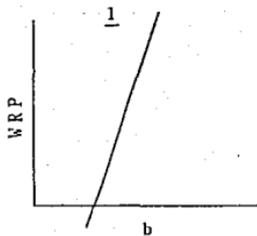
Día	Tiempo de protrombina				Día
	WRP	b	WRP	b	
1	12.1	12.4	11.0	12.3	6
	19.5	15.3	46.5	25.3	
	89.6	34.5	21.1	16.8	
	15.2	13.6	45.6	24.3	
	33.4	19.7	16.1	16.2	
	22.6	19.5	21.5	18.4	
	19.0	16.5	20.5	17.0	
	12.1	12.7	11.5	12.2	
	10.9	11.8	11.8	11.6	
	15.2	14.2	16.0	14.8	
2	21.4	25.7	27.7	17.8	7
	25.7	18.4	15.9	15.2	
	17.1	15.2	106.3	44.0	
	35.3	19.6	15.8	14.5	
	17.8	15.1	21.7	17.7	
	13.7	13.0	11.8	12.4	
	11.4	11.8	10.9	12.4	
	46.2	20.7	23.4	18.4	
3	19.2	14.1	32.5	20.4	8
	19.6	15.5	28.8	18.8	
	24.2	17.0	22.3	17.3	
	16.0	14.8	23.8	17.1	
	19.0	15.9	35.4	22.8	
	12.5	12.0	11.3	12.4	
	12.5	12.3	12.2	12.7	
	21.4	15.5	17.1	15.9	
	18.8	15.2	24.1	17.1	
	4	23.6	19.9	17.3	
33.2		26.7	29.6	21.4	
15.5		14.9	17.9	16.1	
14.5		13.6	35.5	23.4	
12.0		12.5	12.0	12.2	
11.9		12.5	10.6	12.1	
28.3		18.3	31.2	20.4	
5	23.4	16.3	33.7	20.7	10
	22.0	16.7	22.2	17.4	
	35.1	21.8	30.6	21.7	
	30.7	19.7	13.4	14.3	
	29.8	20.4	28.2	19.6	
	12.0	12.3	11.5	12.4	

TABLA No. 7 Valores de TP obtenidos en el procedimiento de calibración del Trombolaf L 281.

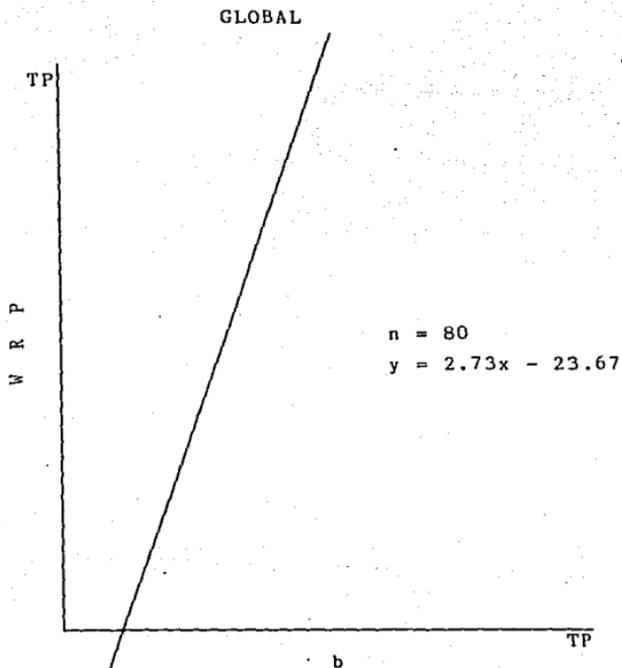
El diagrama de dispersión obtenido mediante el ajuste a una recta por mínimos cuadrados, fué considerando cada uno de los 10 días de trabajo así como el total de acuerdo a la recta  $y = a + b(x - \bar{x})$  que es igual a  $y = bx + a$

Día	a	b	$\bar{x}$	$r^2$	$y = bx + a$	$P_2(x, y)$	$P_4(x, y)$	$P_6(x, y)$
1	-35.35	3.51	18.03	0.96	$3.51x - 35.35$	15.3 18.4	13.6 12.4	19.5 33.1
2	1.51	1.09	16.63	0.40	$1.09x - 1.51$	14.2 17.0	18.4 21.6	19.6 22.9
3	-33.97	3.61	15.23	0.88	$3.61x - 33.97$	20.7 40.8	15.5 22.0	14.8 19.5
4	-4.41	1.43	16.33	0.94	$1.43x - 4.41$	15.5 17.8	19.9 24.0	14.9 16.9
5	-17.60	2.42	17.25	0.98	$2.42x - 17.60$	18.3 26.7	16.7 22.8	19.7 30.1
6	-26.35	2.84	17.81	0.96	$2.84x - 26.35$	25.3 45.5	24.3 42.7	18.4 25.9
7	-27.49	3.02	18.50	1.00	$3.02x - 27.49$	14.8 17.2	15.2 18.4	14.5 16.3
8	-19.04	2.44	17.45	0.98	$2.44x - 19.04$	18.4 25.9	18.8 26.8	17.1 22.7
9	-15.12	2.12	16.90	0.96	$2.12x - 15.12$	15.9 18.6	16.4 19.6	16.1 19.0
10	-19.43	2.43	17.33	0.96	$2.43x - 19.43$	20.4 30.1	17.4 22.9	14.3 15.3
Σ 10	-23.67	2.73	17.14	0.88	$2.73x - 23.67$	19.7 30.1 15.1 17.6	15.2 17.8 17.0 22.7	17.8 24.9 17.4 23.8

TABLA No. 8 Parámetros obtenidos mediante el ajuste a una recta de los valores de TP correspondientes a la calibración del Trombolaf L 281



GRAFICA No.14 Trazo de los valores de TP's de WRP vs b de los 10 días de - trabajo de la calibración del Trombolaf L 281



GRAFICA No. 15  
 Diagrama de dispersión global correspondiente a la  
 estandarización indirecta de trombolaf, lote 281

La calibración final fue:

Día	n	m	C <sub>WRP, b</sub>	ISI <sub>WRP, b</sub>	SE <sub>CWRP, b</sub>	SE <sub>ISIWRP</sub>	%CV <sub>ISIWRP</sub>	SE <sub>ISIB</sub>	%CV <sub>ISIB</sub>
1	8	0.74	1.98	2.77	0.15	0.20	7.22	0.57	20.72
2	8	0.52	1.65	2.31	0.57	0.80	34.63	1.86	80.52
3	8	1.01	2.43	3.40	0.28	0.39	11.47	1.34	39.41
4	8	0.31	1.35	1.89	0.17	0.23	12.17	0.45	23.81
5	8	0.73	1.96	2.75	0.13	0.18	6.55	0.50	18.18
6	8	0.78	2.04	2.86	0.13	0.19	6.64	0.54	18.88
7	8	0.58	1.73	2.43	0.09	0.12	4.94	0.30	12.35
8	8	0.79	2.06	2.88	0.13	0.19	6.60	0.54	18.75
9	8	0.60	1.76	2.47	0.15	0.20	8.10	0.51	20.65
10	8	0.78	2.04	2.86	0.12	0.16	5.59	0.47	16.43
10	80	0.68	1.89	2.65	0.07	0.09	3.40	0.25	9.43

Tabla No. 9 Parámetros obtenidos de la estandarización del Trombolaf L 281.

2. A. Curva de referencia.

Se obtuvo tanto para el lote 284 de trombolaf como para el lote 505534 de thromborel S.

Su comportamiento fue el siguiente.

B. TP normal.

Se obtuvo de 10 pool de plasmas dando:

	Tiempo protrombina (seg)	
Promedio	505534	284
geométrico	11.756	11.379
aritmético	11.760	11.390

C. Evaluación de pacientes

Se contó con una población de 100 pacientes - de diversa etiología:

Paciente	No.	%Global pacientes
Preoperatorio	49	49.0
Hospitalizado	42	42.0
Anticoagulado	9	9.0

TROMBOPLASTINA CALCICA LIOFILIZADA: THROMBOREL S

LOTE : 505534

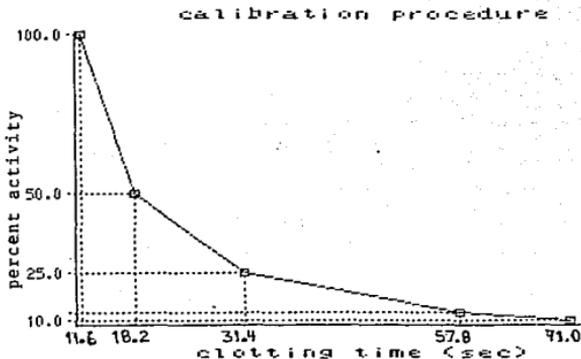
PLASMA : FOOI FRESCO CITRATADO

Prog. 10

graph. sel

lin	lin
rec1	rec1
log	log

no	%	sec
1	10.0	71.0
2	12.5	57.8
3	25.0	31.4
4	50.0	18.2
5	100.0	11.6
6	0.0	0.0
7	0.0	0.0
8	0.0	0.0
9	0.0	0.0



faktor : 66

WORK SCREEN

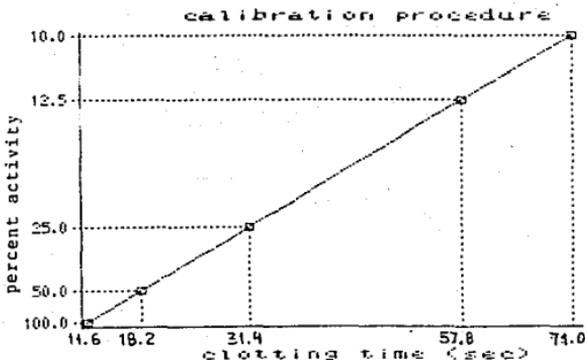
$$\text{FACTOR} = \frac{71.0 - 11.6}{1/10 - 1/100} = 660$$

Prog. 10

graph. sel

lin	lin
rec1	rec1
log	log

no	%	sec
1	10.0	71.0
2	12.5	57.8
3	25.0	31.4
4	50.0	18.2
5	100.0	11.6
6	0.0	0.0
7	0.0	0.0
8	0.0	0.0
9	0.0	0.0



faktor : 66

WORK SCREEN

# Grüzugskurve zur Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick

**BEHRING**  
*Pharma*

Thromborel S

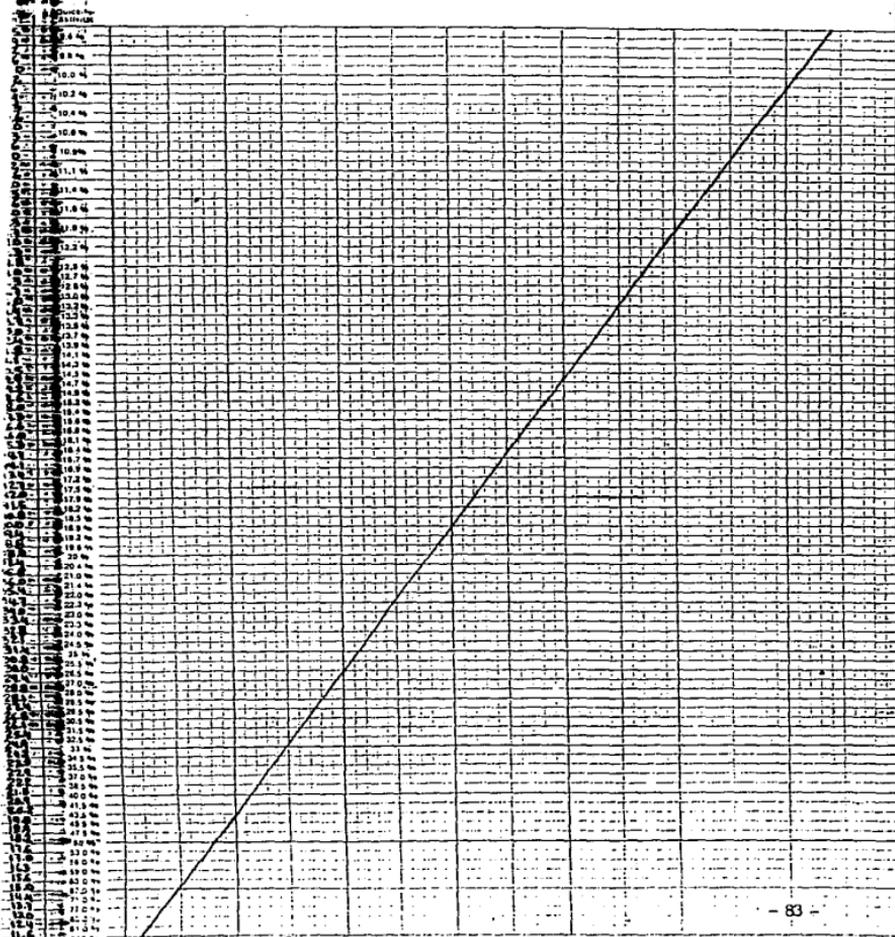
K. Nr. LOTE: 505534

Datum: OAD: OCT 90

Standard-Human-Plasma

K. Nr. PLASMA: FRESCO

Untersucher S/N



TROMBOPLASTINA NO CALCICA LIQUIDA: TROMBOLAF

LOTE : 284

PLASMA : POOL FRESCO CITRATADO

Prog. 10

calibration procedure

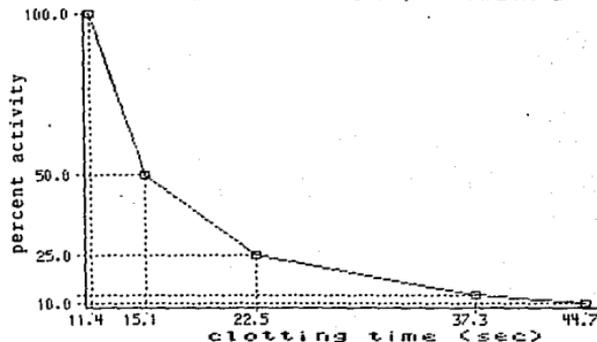
graph. sel

lin lin

reci reci

log log

no	%	sec
1	10.0	44.7
2	12.5	37.3
3	25.0	22.5
4	50.0	15.1
5	100.0	11.4
6	0.0	0.0
7	0.0	0.0
8	0.0	0.0
9	0.0	0.0



faktor : 37

WORK SCREEN

$$\text{FACTOR} = \frac{44.7 - 11.4}{1/10 - 1/100} = 370$$

Prog. 10

calibration procedure

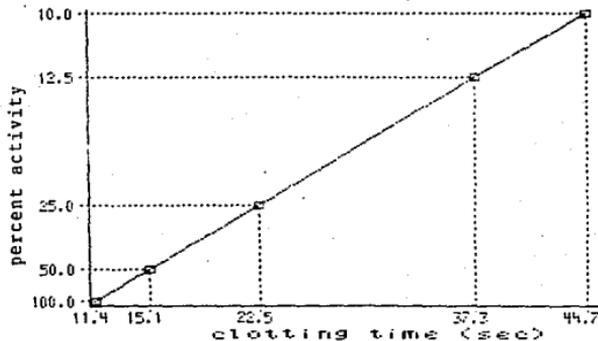
graph. sel

lin lin

reci reci

log log

no	%	sec
1	10.0	44.7
2	12.5	37.3
3	25.0	22.5
4	50.0	15.1
5	100.0	11.4
6	0.0	0.0
7	0.0	0.0
8	0.0	0.0
9	0.0	0.0

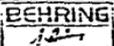


faktor : 37

WORK SCREEN

GRAFICA No. 18 Curva de referencia de Trombolaf L 284

# Bezugskurve zur Bestimmung der Thromboplastinzeit nach Quick



Thromborel S

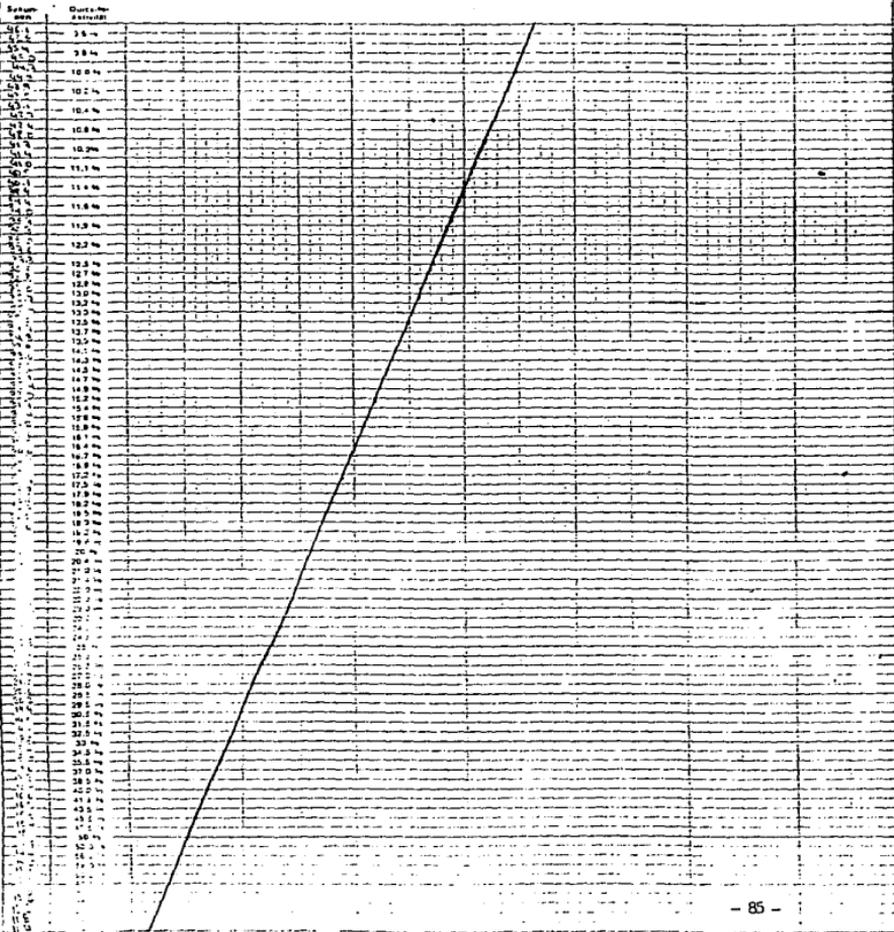
K. Nr. LOTE: 284

Datum CAD: 30 JUL 89

Standard-Human-Plasma

K. Nr. PLASMA: FRESCO

Untersucher S/N



Para estos pacientes, evaluados con ambas tromboplastinas se encontró:

Lote	Parámetro	Tipo de paciente		
		Preoperatorio	Hospitalizado	Anticoagulado
505534	TP	12.34 ± 1.23	12.56 ± 1.39	23.78 ± 15.46
	%	90.41 ± 10.95	88.40 ± 12.17	51.13 ± 27.24
	RP	1.05 ± 0.10	1.07 ± 0.12	2.02 ± 1.31
	IP	94.47 ± 16.23	94.69 ± 9.92	62.00 ± 24.95
	INR	1.06 ± 0.12	1.07 ± 0.13	2.19 ± 1.58
284	TP	11.96 ± 0.83	12.27 ± 1.14	15.92 ± 4.12
	%	87.66 ± 12.40	84.45 ± 15.52	53.16 ± 21.02
	RP	1.05 ± 0.87	1.08 ± 0.10	1.40 ± 0.36
	IP	95.57 ± 6.33	93.45 ± 7.66	74.82 ± 15.13
	INR	1.13 ± 0.19	1.20 ± 0.28	2.37 ± 1.67

TABLA No. 10 Evaluación de la tromboplastina líquida Trombolaf L 284, tomando como referencia a una tromboplastina liofilizada Thromborel S L 505534.

D. Estandarización directa.

Tomando como referencia a la IRP de cerebro de conejo para la trombolaf lote 284.

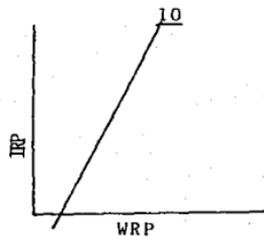
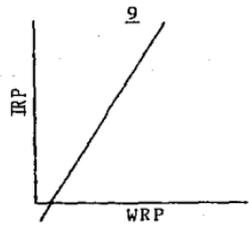
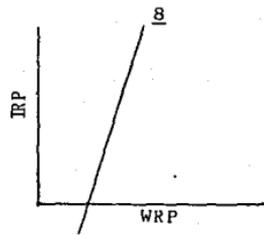
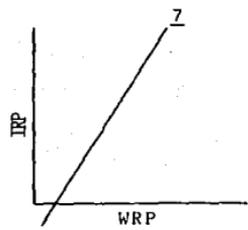
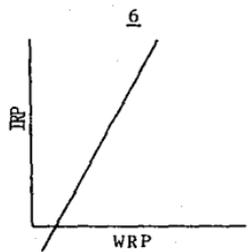
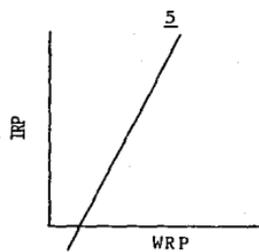
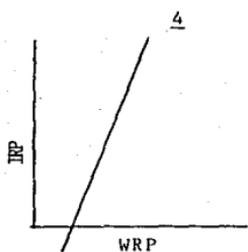
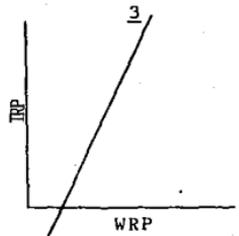
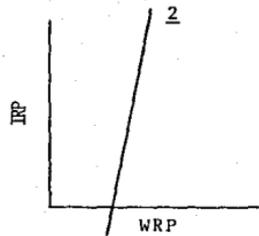
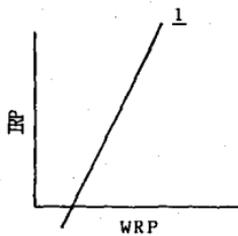
Día	Tiempo de protrombina				Día
	IRP	WRP	IRP	WRP	
1	14.7	11.9	15.2	11.7	6
	54.9	32.6	28.7	17.8	
	31.2	30.1	31.0	19.6	
	96.6	29.7	30.8	18.5	
	50.1	26.5	23.9	15.1	
	48.4	26.1	24.9	15.6	
	20.0	16.1	24.0	17.0	
	15.5	12.4	15.5	11.0	
2	15.0	11.9	15.5	11.9	7
	27.6	18.0	21.1	14.8	
	20.5	14.2	24.3	17.8	
	184.0	45.4	21.8	14.0	
	301.4	58.9	35.6	26.7	
	29.7	18.9	49.3	25.8	
	18.3	13.3	21.8	17.5	
	14.8	11.8	13.9	10.3	
3	15.1	11.6	14.3	10.4	8
	21.7	15.2	104.1	35.4	
	16.9	12.6	15.3	11.4	
	14.7	12.0	49.0	25.3	
	32.1	21.9	20.8	14.1	
	65.3	31.6	22.0	14.8	
	25.4	16.5	119.3	38.7	
	14.4	11.2	14.8	11.5	
4	15.5	11.1	14.1	10.1	9
	20.5	14.2	32.9	20.9	
	30.8	19.2	20.0	14.5	
	16.8	12.2	38.4	24.7	
	63.1	29.3	25.9	17.1	
	22.4	16.2	34.0	18.8	
	57.1	23.0	19.6	14.4	
	15.4	12.5	15.3	11.2	
5	15.2	11.7	15.0	11.7	10
	20.9	14.8	19.0	13.3	
	21.2	14.7	46.0	24.7	
	32.2	17.9	31.7	18.1	
	33.3	17.7	37.6	24.8	
	38.8	20.5	25.7	16.2	
	24.4	18.7	43.1	25.5	
	14.8	11.6	16.6	12.2	

TABLA No. 11 Valores de TP obtenidos en el procedimiento de calibración del Trombolaf I. 284.

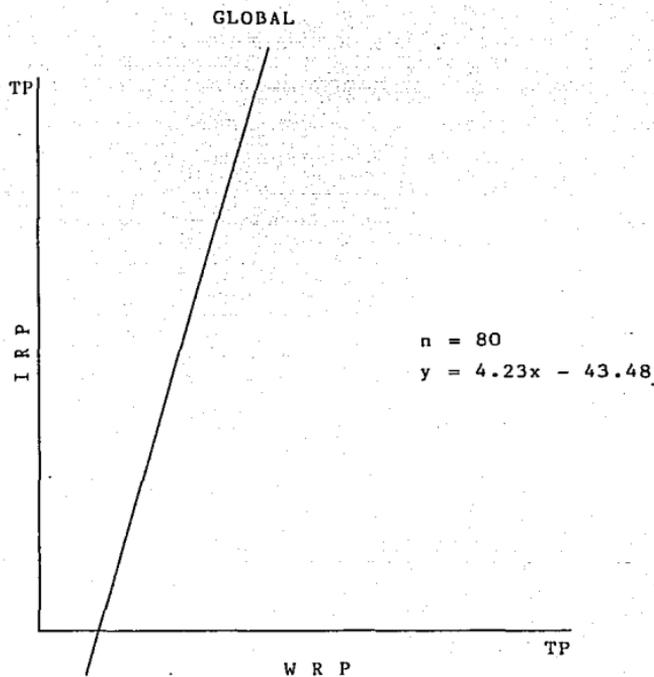
El diagrama de dispersión que se obtuvo para este lote en particular, empleando la IRP fue el siguiente:

Día	a	b	x	r <sup>2</sup>	y = bx + a	P <sub>2</sub> (x,y)	P <sub>4</sub> (x,y)	P <sub>6</sub> (x,y)
1	-14.90	2.43	23.18	0.55	2.43x - 14.9	32.6 64.3	29.7 57.3	26.1 48.5
2	-66.69	5.95	24.05	0.98	5.95x - 66.69	18.0 40.4	45.4 203.4	18.9 45.8
3	-14.26	2.41	16.58	0.98	2.41x - 14.26	15.2 22.4	12.0 14.7	31.6 61.9
4	-20.62	2.95	17.21	0.94	2.95x - 20.62	14.2 21.3	12.2 15.4	16.2 27.2
5	-14.30	2.47	15.95	0.85	2.47x - 14.3	14.8 22.3	17.9 29.9	20.5 36.3
6	- 6.38	1.94	15.79	0.96	1.94x - 6.38	17.8 28.2	18.5 29.5	15.6 23.9
7	- 5.36	1.77	17.35	0.85	1.77x - 5.36	14.8 20.8	14.0 19.4	25.8 40.3
8	-29.99	3.71	20.20	0.98	3.71x - 29.99	35.4 101.3	25.3 63.9	14.8 24.9
9	- 4.93	1.82	16.46	0.94	1.82x - 4.93	20.9 33.1	24.7 40.0	18.8 29.3
10	- 7.28	2.00	18.31	0.96	2.00x - 7.28	13.3 19.3	18.1 28.9	16.2 25.1
10	-43.48	4.23	18.50	0.81	4.23x - 43.48	26.5 68.6	19.2 37.7	17.8 31.8
						13.3 12.8	17.0 28.4	18.1 33.1

TABLA No. 12 Parámetros obtenidos de la calibración del trombolaf L 284, mediante el método de mínimos cuadrados para el ajuste a una recta.



GRAFICA No. 20 Trazo de los valores de TP's obtenidos en la estandarización del Trombolaf L 284 empleando una IRP: RBT/79.



GRAFICA No. 21 Diagrama de dispersión correspondiente a la estandarización directa del trombolaf L 284.

Para el cálculo del ISI del trombolaf lote 284 se obtuvo:

Día	n	m	$C_{CIRP,WRP}$	$ISI_{WRP}$	$SE_{CIRP,WRP}$	$SE_{ISIWRP}$	$\%CV_{ISIWRP}$
1	8	0.574	1.727	2.417	0.376	0.526	21.777
2	8	0.683	1.894	2.652	0.052	0.073	2.761
3	8	0.367	1.433	2.006	0.069	0.096	4.798
4	8	0.551	1.693	2.370	0.149	0.208	8.792
5	8	0.575	1.729	2.420	0.250	0.350	14.460
6	8	0.301	1.345	1.883	0.115	0.161	8.550
7	8	0.206	1.227	1.718	0.159	0.223	12.982
8	8	0.530	1.662	2.327	0.058	0.082	3.516
9	8	0.224	1.249	1.748	0.100	0.139	7.980
10	8	0.297	1.334	1.876	0.099	0.139	7.426
10	80	0.517	1.643	2.299	0.052	0.073	3.194

Tabla No. 13 Parámetros obtenidos de la estandarización del trombolaf L 284, empleando la RBI/79.

E. Estandarización indirecta.

Para ésta evaluación se contó con 42 plasmas - para el trombolaf lote 284, con los siguientes resultados:

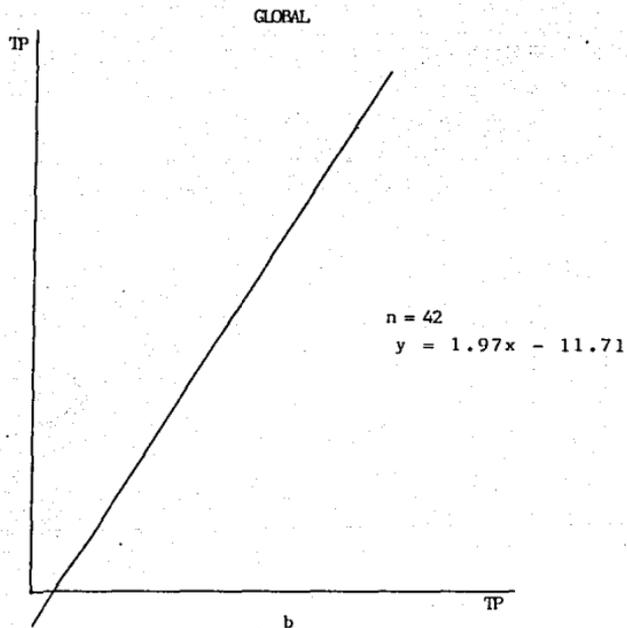
WRP	Tiempo de protrombina		WRP	b
	b	WRP		
39.6	23.4	16.1	14.0	
44.9	29.6	17.8	16.2	
32.2	19.2	23.2	19.7	
23.3	18.0	18.2	17.4	
15.2	13.8	30.9	24.4	
21.2	16.2	30.2	18.6	
*10.2	11.2	*10.5	10.9	
18.3	15.9	46.2	33.4	
91.0	34.3	*12.2	12.2	
32.7	20.1	15.4	13.8	
16.2	16.5	33.9	25.0	
30.8	18.2	*12.0	11.7	
16.9	14.5	*10.9	11.3	
*10.3	11.0	*13.1	12.7	
33.1	20.3	*11.9	11.6	
20.5	15.4	15.0	13.4	
16.9	15.2	*10.2	10.9	
17.5	15.9	15.1	13.8	
18.1	17.9	49.5	37.3	
38.2	31.1	*10.5	11.0	
*10.7	11.3	28.9	23.7	

\*Plasma de pacientes normales

TABLE No. 14 Valores de TP obtenidos durante el proceso de la estandarización indirecta del trombolaf L 284.

La estimación de  $y$  para  $x=x_0$ , empleando recta de regresión lineal fué:

Días	a	b	x	$r^2$	$y = bx - a$	P (x,y)	P (x,y)	P (x,y)			
42	-11.71	1.97	17.9	0.79	$1.97x - 11.71$	13.8	15.5	15.9	19.6	11.7	11.3
						16.5	20.8	24.4	36.4	37.3	61.8



GRAFICA No. 22 Diagrama de dispersión global correspondiente a la estandarización indirecta del trombolaf L 284.

IV.3

Evaluación de factores de la vía extrínseca.

La construcción se llevó paralelamente con una tromboplastina comercial (Thromborel s), para dicho evento - se empleó un baño de aire caliente a 37°C para la incubación de los plasmas con capacidad para 105 tubos y con la ayuda de cronómetros y lámpara de luz blanca para visualizar las lecturas realizadas manualmente.

Los resultados obtenidos para cada uno de los factores en términos de TP fueron:

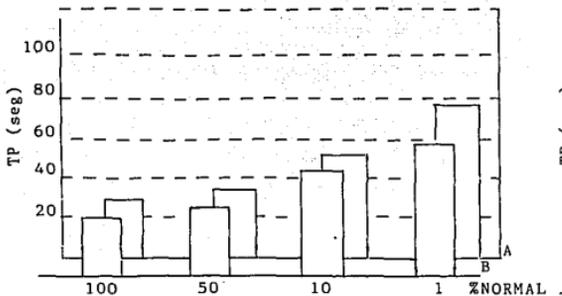
%	Factor II		Factor V		Factor VII		Factor X	
	505521A	284	505521A	284	505521A	284	505521A	284
100	30.3	21.8	39.6	34.0	24.0	22.0	26.5	27.0
50	33.9	26.5	48.9	41.2	29.6	24.4	32.5	33.7
10	48.6	43.6	76.1	62.0	45.8	34.4	55.5	52.3
1	67.4	57.1	99.6	72.7	61.1	42.5	107.3	85.5

TABLA No. 15 Evaluación de factores de la vía extrínseca

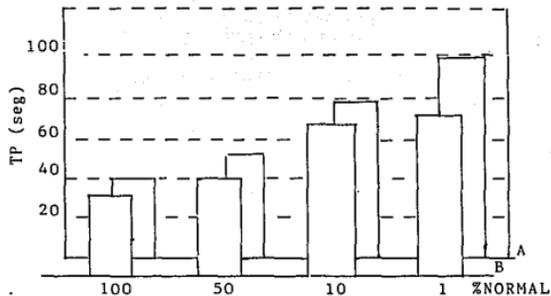
Gráficamente quedaron representados de la siguiente forma:

A. Placenta humana  
 B. Cerebro de conejo

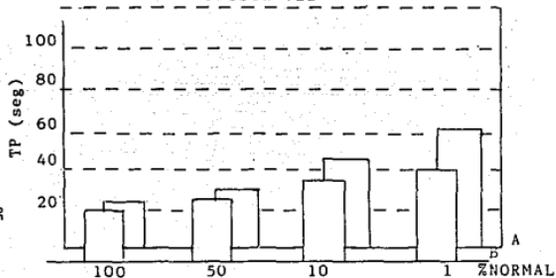
FACTOR II



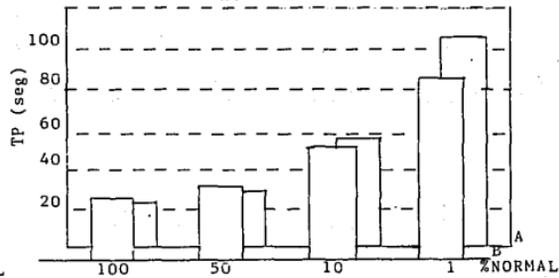
FACTOR V



FACTOR VII



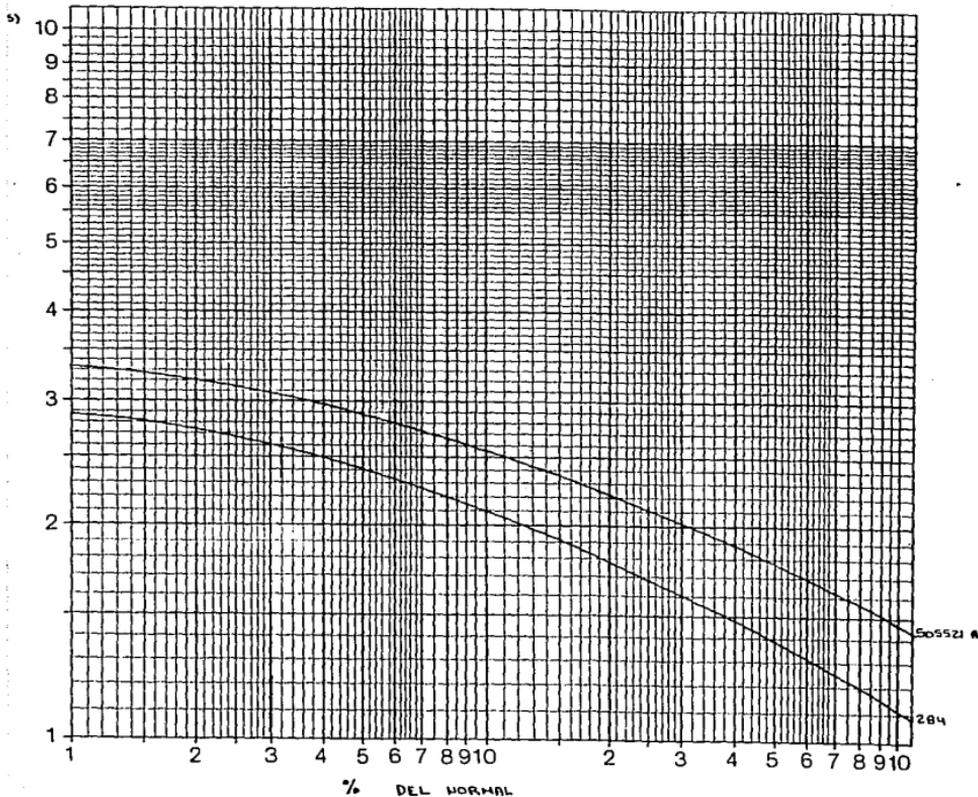
FACTOR X



GRAFICA No. 23 Sensibilidad a factores de la tromboplasina Trombolaf L 284.

1. Calibration plasma POOL FRESCO CITRATADO  
 2. Clotting factor II - Deficient plasma  
 3. Reagent TRAMBOLAF  
 4. Control THROMBOREL S

Lot-No. S/N  
 Lot-No. CF<sub>2</sub> - 56  
 Lot-No. 284  
 Lot-No. 505521A



GRAFICA No.24 Dosificación del Factor II en Thromborel S 505521A y Trambolaf L 284

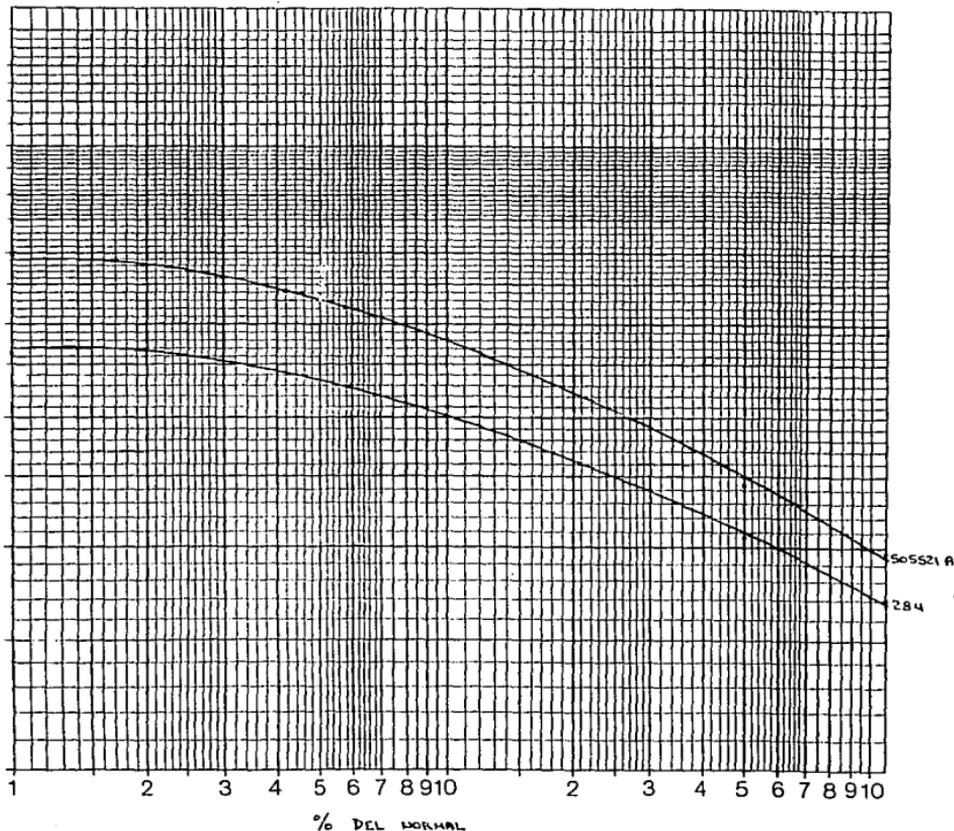
1. Calibration plasma POOL FRESCO CITRATADO
2. Clotting factor V - Deficient plasma
3. Reagent THROMBOPLAF
4. Control THROMBOREL S

Lot-No. S/N

Lot-No. 503529 A

Lot-No. 284

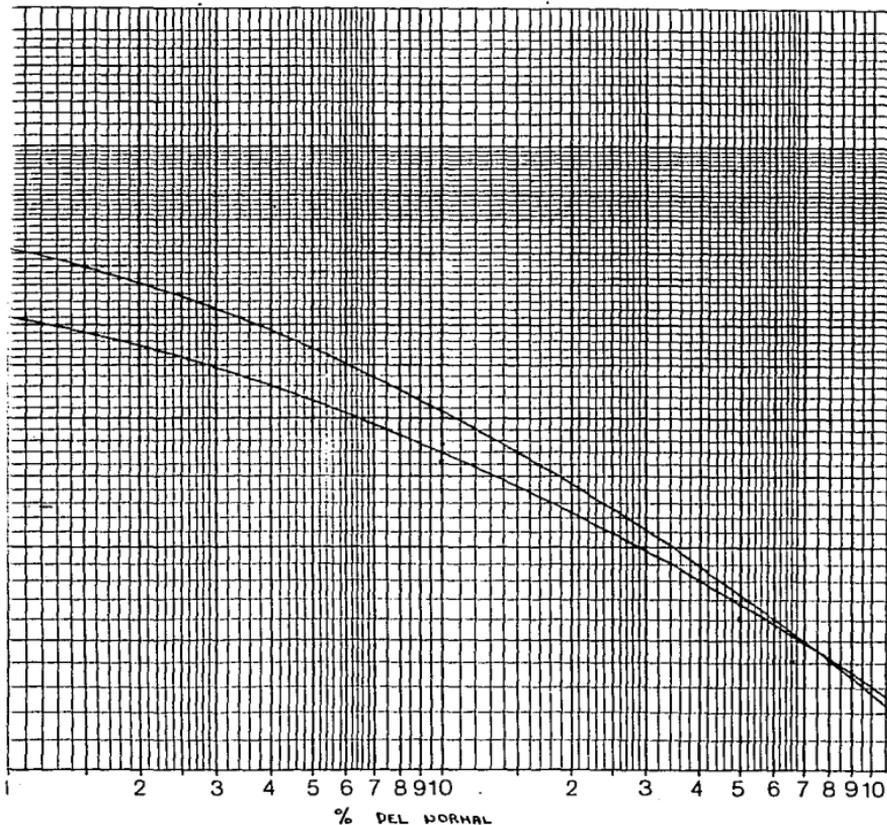
Lot-No. 505521A



GRAFICA No. 26 Dosificación del Factor V en Thromborel S 505521A y Thrombolaf L 284

1. Calibration plasma POOL FRESCO CITRATADO  
 2. Clotting factor X - Deficient plasma  
TRIMOLAF  
 3. Reagent  
THROMBREL S  
 1. Control

Lot-No. S/N  
 Lot-No. 504224A  
 Lot-No. 284  
 Lot-No. 505521A



GRAFICA No.27 Dosificación del Factor X en Thrombrel S 505521A y Trombolaf L 284



Para los 6 plasmas evaluados, los resultados fueron los siguientes:

PLASMA	Factor II				Factor V				Factor VII				Factor X			
	505521A		284		505521A		284		505521A		284		505521A		284	
	TP	%	TP	%	TP	%	TP	%	TP	%	TP	%	TP	%	TP	%
ORKL	-	-	-	-	41.0	85.0	38.0	73.0	27.5	68.0	23.0	80.0	28.6	78.0	29.6	73.0
PathoI	-	-	-	-	44.2	73.0	40.4	56.0	49.2	6.7	33.4	11.5	51.4	17.5	46.8	17.0
PathoII	110.5	1.0	53.5	2.4	39.0	100.0	41.5	46.0	53.2	4.3	37.3	5.2	59.9	11.0	55.3	9.0
Pac 1	-	-	-	-	56.9	33.0	50.0	25.0	39.3	18.5	28.8	27.0	38.8	37.0	37.0	37.0
Pac 2	-	-	-	-	50.0	50.0	47.0	32.0	43.2	12.5	31.0	18.5	31.5	63.0	32.6	55.0
Pac 3	-	-	-	-	44.3	72.0	43.2	44.0	31.2	44.0	26.0	46.0	31.2	64.0	30.2	66.0

TABLA No. 16

Evaluación de factores de la vía extrínseca de algunos plasmas problema, empleando la tromboplastina calibrada trombolaf L 284, y una referencia Thromborel S L 505521A.

---

**CAPITULO V**  
**ANALISIS DE RESULTADOS**

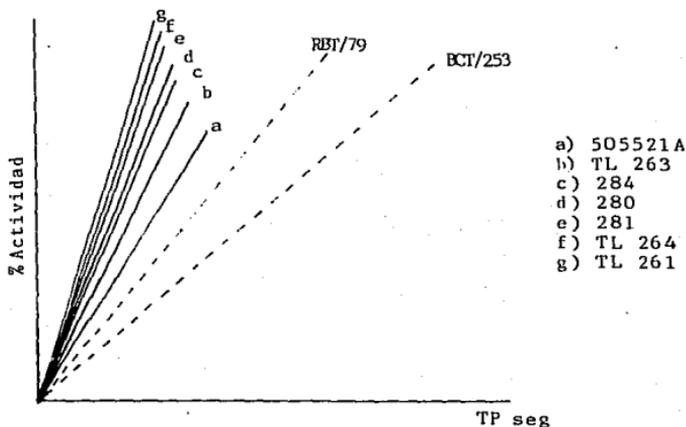
---

---

## CAPITULO V

### V.I Análisis de resultados.

A groso modo puede distinguirse diferencia en cuanto al trazo de las curvas de calibración, entre tromboplastinas de referencia (thromborelS) y las de trabajo (trombocálcica y -trombolaf); las primeras dan curvas abiertas y con tiempos de coagulación en el 10% mayores que generalmente rebasan los 50 segundos, mientras que las segundas son curvas muy cerradas y cortas de ángulo de inclinación, sobre todo en el 10% de actividad. Esto es consecuencia de la sensibilidad de las tromboplastinas de acuerdo a la fuente de tejido del cual proceden:



En el caso particular de las trombocálcicas se puede apreciar que, aún siendo del mismo tipo de tejido, difiere mucho su sensibilidad y comportamiento.

A medida que disminuye el ángulo de inclinación con respecto al eje de las abscisas, la sensibilidad aumenta tal y como se denota con las preparaciones de referencia internacional RBT/79 y BCT/253; si el ángulo tiende a aumentar, su sensibilidad disminuirá como en el caso de las trombocálcicas. Fué por ésta razón más que nada, que se optó por utilizar las tromboplastinas líquidas, debido a que se observó un mejor comportamiento en cuanto al tiempo de coagulación y sensibilidad, lo cual motivó seguir la realización de la estandarización con ésta presentación.

Así también, se observó una menor variabilidad en cuanto a la construcción de las curvas empleando pool de plasma fresco, pues en el caso de las trombocálcicas el lote TL - 261 tenía una irregularidad muy grande, ya que daba curvas incongruentes entre una construcción y otra; ésto también fué debido a la variabilidad intervial e interlote que presentó, de manera general, la presentación liofilizada de Lafon mientras que las liofilizadas de Hocchs't, fueron más uniformes y estables en sus lecturas, además de presentar una sensibilidad bastante aceptable.

En lo que se refiere a la evaluación de factores tenemos que, partiendo del concepto del tipo de tejido del cual procede la tromboplastina será la sensibilidad a cada uno de los factores tenemos teóricamente:

- a. El tejido de placenta humana tiene mayor afinidad por los factores V y VII.
- b. El tejido de cerebro de conejo tiene mayor afinidad por los factores II y X.
- c. El tejido bovino tiene afinidad por los cuatro factores.

Sin embargo, en la práctica se observó un tanto indistinto estos conceptos, puesto que ambas tromboplastinas manejadas (referencia y trabajo) se comportaron muy similares:

	<u>Thromborel S</u>	<u>Trombolaf</u>	<u>Variación</u>
1. Factor II	disminuye	umenta	$\pm 5.0\%$
2. Factor V	umenta	disminuye	$\pm 20.0\%$
3. Factor VII	disminuye	umenta	$\pm 5.0\%$
4. Factor X	umenta	disminuye	$\pm 4.0\%$

La forma de leer las lecturas del tiempo de coagulación es un factor importante para el trazado de las curvas; así - como también lo es, el saber emplear correctamente el papel - y su trazo correspondiente. En cuanto a su dosificación en - plasmas problema, se observaron diferencias en lo que se refiere al valor del %, aunque en el caso de los factores - VII y X es poca la diferencia si tomamos en cuenta que nues - tra cantidad de plasmas evaluados fué muy poca; esto debido - a la disponibilidad de que se contó en ese tiempo para su ob - tención y por la limitación en los plasmas deficientes de - factores, como fué el caso del factor II.

Un aspecto que llamó la atención al efectuar el ensayo - de factores, fué la formación del coágulo, ya que dependien - do de la tromboplastina fue su aspecto:

- . Thromborel S; se observaron los coágulos expandidos , grandes y opacos.
- . Trombolaf; los coágulos fueron observados retraídos y más claros, como si fueran de una dilución mayor com - parados con el thromborel S.

Puesto que, en dado caso el tiempo de protrombina está - involucrado en la terapia anticoagulante oral, se debe pedir de una tromboplastina: que sea sensible a los factores depen - dientes de la vitamina K.

En el ensayo se observó que la tromboplastina de traba - jo, pese a su ISI elevado, reunió ésta característica y, en - el caso de plasmas anormales liofilizados de referencia (pa - thoplasma I y II) se registró la diferencia de acuerdo al - rango establecido:

Pathoplasma I: 20 a 30% en TP correspondiente a la zona superior de la terapia anticoagulante.

Pathoplasma II: Menor al 10% en TP correspondiente a la zona inferior de la terapia anti-coagulante.

Desgraciadamente nuestras posibilidades no permitieron evaluar más variedad de anticoagulación en plasmas de pacientes, es por ello que sólo se obtuvieron éstos resultados; no obstante se pudo visualizar de una manera general cómo fué el comportamiento de nuestra tromboplastina de trabajo calibrada.

En la calibración, inicialmente se contó con dos lotes de tromboplastina líquida: 280 y 281 de trombolaf, como posibles candidatos; al evaluarlos previamente, se les encontró mucha similitud entre sí, por lo que se escogió uno de ellos para realizar una evaluación indirecta de estandarización tomando de referencia al thromborel S; en dicha evaluación encontramos un ISI de 2.65, el cual se sale del rango establecido por la OMS que es menor a 1.7; su %CV también superó el límite establecido de la OMS: 3.4, pues en condiciones óptimas, el deseado sería menor o igual a 3.0% o bien, en condiciones generales, tratándose de laboratorios distintos sería de menos o igual al 5.0%.

Cabe hacer mención de varios aspectos que definitivamente influyeron en los resultados obtenidos:

- . Se trató de una evaluación indirecta, es decir, que no se empleó una IRP como referencia, sino una tromboplastina evaluada con una WRP, por lo cual, vendría siendo una referencia terciaria de tromboplastina de placenta humana.
- . Dicha referencia no procede de la misma fuente de tejido que la destinada a la evaluación, por lo cual,

le resta puntos al sistema.

- . Los plasmas tomados en los 10 días de trabajo no - fueron del todo satisfactorios, ya que no mostraron todos los diversos niveles de anticoagulación; en general, estuvieron entre el 20 y 40% de actividad.

Así pues, estos detalles se transmitieron en los resultados obtenidos, aún habiéndose empleado 8 plasmas citratados en cada día de trabajo, obtenido dichos plasmas mediante los requisitos que establece la OMS (a excepción de los diferentes niveles de anticoagulación), realizado en el mismo aparato, procurado reproducirlo en la misma hora en todos los días, tomado estadísticamente en cuenta los errores involucrados al emplear una tromboplastina comercial de referencia.

La idea era, una vez seleccionado el lote de trombo - plastina a estandarizar, evaluarla tanto directa como indirectamente; desafortunadamente para este lote de trombolaf, no fué posible llevarlo a cabo debido a que no se pudo contar con una cantidad considerable de equipos para realizarlo. Ello provocó que se trabajara otro lote más de trombolaf: 284, al cual sí fué posible aplicarle ambos métodos, - aunque el método indirecto no haya podido ser realizado con los 80 plasmas dadas las circunstancias que se presentaron.

Se esperaba encontrar en el método directo, un ISI menor a 1.7 según la OMS, por haber empleado:

- . Una IRP de cerebro de conejo, ya que nuestra trombo - plastina de trabajo procedía de la misma fuente de tejido.
- . Contar con plasmas variados en cuanto al nivel de - anticoagulación.
- . Aplicar la metodología adecuada.
- . Desarrollar la estadística de manera computarizada.

Sin embargo, lo obtenido fué un poco desalentador debido a que sobrepasó el rango establecido de 1.7, pues se encontró un ISI de 2.299; aún así, nuestro desarrollo fué bu

no puesto que el %CV apenas sobrepasó el 3%, lo que nos ha  
cè confiar en nuestros resultados. Lo que en realidad suce  
dió fué, que el trombolaf no es muy sensible, además, de -  
los tres tipos de tejido de las preparaciones de referen -  
cia internacional, el de cerebro de conejo es la menos sen  
sible y esto, aunado con la calidad de las tromboplastinas  
comerciales, marca dicha sensibilidad en éste caso en par  
ticular.

De acuerdo a los resultados de ISI que se obtuvieron,  
es posible construir una tabla de INR, aunque faltaría eva  
luar una población de pacientes de diferente etiología y -  
que reciban terapia anticoagulante para obtener el rango -  
terapéutico correspondiente.

---

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

---

## CAPITULO VI

### Conclusiones.

De acuerdo a lo establecido inicialmente, se pudo lograr la validación del método de Biggs y Denson modificado, obteniendo (empleando la IRP de cerebro de congo:RBT/79) el parámetro básico de la estandarización de una tromboplastina comercial: ISI para extrapolarse y obtener el valor del TP en términos de INR; asimismo - fué factible manejar pacientes reales de diversas etiologías en donde se involucra el fenómeno de la coagulación sanguínea.

Se pudo apreciar, de manera especial, la importancia de tener un sistema de unidades, funcionales en todos los niveles de laboratorios, a fin de lograr una - terapia eficaz en el paciente con tratamiento anticoagu - lante oral y el riesgo tan grande que existe si no se - toman las medidas necesarias en cuanto a la dosifica - ción de dichos anticoagulantes.

También se comprendió el porqué de la evaluación - individual de cada uno de los factores que involucran - la vía extrínseca, así como la construcción de sus curvas de referencia.

Para fines prácticos, y en clínicas y hospitales - de primer nivel, la tromboplastina evaluada funciona - bien y sin mayores problemas; pero si vamos a trabajar - en hospitales de tercer nivel, donde los pacientes real - mente requieren de una terapia anticoagulante apropiada ya sea a corto o a largo plazo, definitivamente habrá - que contar con tromboplastinas que reúnan todas las con - diciones necesarias para que el paciente sea tratado - terapéuticamente con la mejor efectividad.

Si esto no es posible se pueden emplear tromboplas<sup>u</sup> tinas con sensibilidad arriba de 1.7, siempre y cuando se cheque periódicamente su curva de calibración, así - como controles de referencia para corroborar que el ran<sup>u</sup> go de INR que maneje, se ajuste al tipo de pacientes y la dosis de anticoagulación que debe manejar.

Realmente se requiere que México pueda realizar - producto de tromboplastina, así como de otros tipos de reactivos de diagnóstico, de buena calidad para así, - además de tener un costo más accesible de compra en las clínicas y hospitales nacionales, poder competir con el producto importado.

---

**REFERENCIAS**

---

## REFERENCIAS.

1. Bangham D.R., et al.; Calibration of Five Different Thromboplastin Using Fresh and Freeze-dried plasma. Thromb Diath Haemorrh, 1963 , May 10; 29(2): 228-39.
2. Biggs R., M.D.; Coagulación Sanguínea. Hemostasia y Trombosis; primera edición; editorial JIMS; Barcelona España, 1975. Caps. 3,4 y 7.
3. Biggs R., M.D. and Denson K.W.E.; Standardization of the One-stage Prothrombin Time for the Control anticoagulant Therapy. Brit Med J, 1967, Jan; 1:84-8.
4. Biggs R., M.D., et al.; Standardization of the One-stage Prothrombin Time Test for the Control of Anticoagulant Therapy: The Availability and Use of Thromboplastin Reference Preparations. Am J Clin Pathol, 1972, Jan; 57(1): 117-8.
5. Bookbinder M.J., et al.; Using the Coefficient of Correlation in - Method-Comparison Studies. Clin Chem, 1987; 33(7): 1170-76.
6. Bonett M.A. y cols.; Elementos de Probabilidad y Estadística; editorial Representaciones y Servicios de Ingeniería, S.A.; México D. F., 1969.
7. Chantarangkul V., et al.; Evaluation of a Pully Automated Centrifugal Analyzer for performance of Hemostasis Tests. Clin Chem, 1987; 33(10): 1888-90.
8. Chou Ya-Lung; Análisis Estadístico; segunda edición; editorial Interamericana S.A. de C.V., México D.F., 1977.
9. Dacie, y cols., Hemostasia y Trombosis; segunda edición, editorial Interamericana S.A. de C.V., México D.F. 1973.
10. Gowans E.M., et al.; Do Biological Variation Data Shed Light on - the Demise of Some Historical Indices Used to Assess Calcium Homeostasis?. Clin Chem, 1987; 33(7): 1267-68.
11. Hermans J, et al.; A Collaborative Calibration Study of Reference-Materials for Thromboplastins. Thromb Haemost, 1983, Oct 31; 50(3): 712-17.
12. Hoci P.G. y cols.; Estadística Básica para Negocios y Economía; segunda edición; Compañía Editorial Continental S.A. de C.V., México D.F., 1985.
13. International Committee for Standardization in Hematology and International Committee on Thrombosis and Haemostasis.; ICSH/ICTH - Recommendations for Reporting Prothrombin Time in Oral Anticoagulant Control. Thromb Haemost, 1985; 53(1): 155-6.

14. Kathleem Smith and Lenahan Jane G; Hemostasis; 18th edition; Department of Pathology Ball Memorial Hospital Muncie, Indiana - 47303, 1986.
15. Kirkwood T.B.L.; Calibration of Reference Thromboplastins and Standardization of the Prothrombin Time Ratio. Thromb Haemost, - 1983, Jun 28; 49(3): 238-44.
16. Kirkwood T.B.C. y cols.; Determinación del Tiempo de Protrombina usando una Tromboplastina Sensible de Placenta Humana, Calibrada contra Preparaciones de Referencia. NotiBehering, 1987, Enero; - 2(1): 1-2.
17. Loeliger E.A.; Laboratory Control, Optimal Therapeutic Ranges and Therapeutic Quality Control in Oral Anticoagulation. Acta Haematologica, 1985; 74: 125-31.
18. Loeliger E.A., et al.; Optimal Therapeutic Anticoagulation. Thromb Haemost, 1985; 15: 283-92.
19. Loeliger E.A. and Lewis S.M.; Progress in Laboratory Control of Oral Anticoagulants. Lancet, 1982; 2: 318-20.
20. Loeliger E.A., et al.; Questions and Answers on Prothrombin Time-Standardization in Oral Anticoagulant Control. Thromb Haemost, - 1985; 54(2): 515-17.
21. Miale J.B., M.D.; Laboratory Medicine Hematology; sixth edition; the C.V. Mosby Company, U.S.A., 1982.
22. Miale J.B., M.D., et al.; Standardization of the Therapeutic Range for Oral Anticoagulants Based on Standard Reference Plasmas. Am J Clin Pathol, 1972, Jan; 57(1): 80-8.
23. Nemerson Y.; Tissue Factor and Hemostasis. The Journal of the American Society of Hematology. Blood, 1988, Jan; 71(1): 1-8.
24. Platt W.R., et al.; Color atlas and Textbook of Hematology; second edition; J.B. Lippincott Company, U.S.A., 1979.
25. Polareti G., et al.; Oral Anticoagulant Therapy Control: evidence that INR expression improves the interlaboratory comparability of results de Bologna oral anticoagulant control exercise. Thromb - Haemost, 1987, Oct 28; 58(3): 905-10.
26. Poller L.D. Sc., et al.; Laboratory Control of Anticoagulant Therapy. Seminars in Thromb and Hemostas, 1986; 12(1): 13-19.
27. Rapaport S.I.; Introduction to Hematology; first edition; Harper & Row Publishes, U.S.A., 1971.
28. Saenz G.; Coagulación Sanguínea. Teoría y Laboratorio; Publicaciones de la Universidad de Costa Rica; Serie de Textos No. 162, 1968.

29. Sangre. Asociación Española de Hematología y Hemoterapia, 1976; 21(4): 816.
30. Searcy R.L., et al.; Proceedings of the IX Congress of the International Society of Hematology. Evaluation of Thromboplastins for plasma Prothrombin Estimation. Hematología Congresos , UNAM, 1964; 155-63.
31. Snedecor G.W.; y cols.; Métodos Estadísticos; décima reimpre - sión; Cía. Editorial Continental, S.A. de C.V.; México D.F., - 1984.
32. Thompson A., y cols.; Hemostasia y Trombosis; editorial El Ma - nual Moderno, S.A. de C.V., México D.F., 1985.
33. Thompson A.M., et al.; Calibration of BCT/441; The ICSH Referen - ce Preparation for Thromboplastin. Thromb Haemost, 1986; 5(3): 379-82.
34. Uhlmeier K.A., et al.; Prothrombin Time (PT) on the Abbott-VI sion™ System. Clin Chem, 1986; 32(6): 748.
35. Valerie B., et al.; Comprehensive and Critical Assessment of - Thromboplastins their Rule in Anticoagulant Control (Review). J Med Lab Sci, 1983, Aug; 4: 5-27.
36. van den Besselaar A.M.P.H., et al.; Proficiency Testing and - Standardization of Prothrombin Time: Effect of Thromboplastin , Instrumentation and Plasma. Am J Clin Pathol, 1984 DEC; 82(6) : 688-99.
37. van den Besselaar A.M.P.H., et al.; Standardization of Oral An - ticoagulation Treatment. Br Med J, 1984; 288: 486-7.
38. WHO Expert Committee on Biological Standardization. 33rd Report Technical Report Series. 687: 81-105 (World Health Organization, Geneva, 1983).
39. Who Expert Committee on Biological Standardization. 34rd Report Technical Report Series. 700 (World Health Organization, Geneva, 1984).
40. Widmann F.K.; Interpretación Clínica de las Pruebas de Laborato - rio; editorial Interamericana S.A. de C.V., México D.F., 1981.
41. Willoughby S.S.; Probabilidad y Estadística; décima reimpresión; Publicaciones Cultural S.A., México D.F., 1981.
42. Wintrobe M.M., et al. Clinical Hematology; 2nd edition, editorial Lippincott Company, U.S.A., 1981.
43. Yamane T.; Estadística; tercera edición; editorial HARLA S.A. de C.V., México D.F., 1979.

---

**APENDICES**

---

---

## APENDICE.

### A. Selección de plasmas normales y anormales para la estandarización según la OMS.

#### Plasmas normales y anormales:

1. Las muestras de sangre deben ser obtenidas por punción venosa, evitando la hemólisis y contaminación con fluidos tisulares.
2. Su obtención debe ser con una jeringa de plástico y transferida a un tubo de plástico o de otro material que no active la fase de contacto como el silicón.
3. Nueve volúmenes de sangre deben ser mezclados con un volumen de solución de citrato de sodio con una concentración de entre 100 a 136 mmol/l estéril, así pues, el valor final del citrato en el plasma, no debe ser mayor de 25 mmol/l.
4. El plasma debe ser libre de células rojas y, además, pobre en plaquetas, por lo que se debe centrifugar mínimo 5 minutos a 800 g (2500 rpm)

#### Plasmas anormales:

1. Además de lo anterior se requiere que presenten una estabilización terapéutica de por lo menos, 6 semanas de iniciado el tratamiento anticoagulante.
2. Es aceptado cualquier nivel de anticoagulación siendo éste estable.
3. Un buen candidato será el que esté entre el 1.5 y 5.0 en términos de INR.

#### Plasmas normales:

1. Además de lo anterior se requiere que sean de adultos no hospitalizados.
2. Si se trata de mujeres, se recomienda que éstas no tomen anticonceptivos orales.

3. Se recomienda que se tomen en cada día de la estandarización, el plasma de un hombre y el de una mujer.
4. El plasma de los sujetos no debe tener antecedentes del virus del SIDA y/o hepatitis (tanto para normales como anormales), siendo probados con un método altamente sensible (RIA, ELISA).

Para ambos plasmas normales y anormales, no es recomendable usarlos congelados, ya que se afectan los factores lábiles V y VII. No se deben usar plasmas de referencia internacional reconstituídos por más de 2 horas. (38,39)

## B. Principio operativo de Fibrintimer 10.

El fibrintimer 10 es un analizador de coagulación de 10 canales, controlado mediante computadora y video, - usado en la determinación del tiempo de protrombina, tiempo de trombotoplastina parcial activada del plasma, fibrinógeno plasmático, tiempo de trombina, análisis de factores de las vías extrínseca e intrínseca y otros ensayos especiales de la coagulación del plasma.

El instrumento fibrintimer 10 detecta la forma - ción de coágulos mediante un método turbo densitométrico; un haz de rayos pasa a través de la cubeta que contiene el plasma de ensayo hasta un fotodetector; el fotodetector mi de de forma continua la intensidad de la luz transmitida y retransmite cualquier cambio al circuito electrónico del instrumento que procesa la información. El tiempo requerido para la formación del coágulo viene indicado en la pantalla digital y se convierte en % de actividad programado, relación de INR, mg/dl, g/dl o UI/ml según lo requerido a través del ordenador que además, agrupa todos los valores en un perfil de paciente a su memoria (almacena 2000 datos de forma continua y puede imprimirlos).

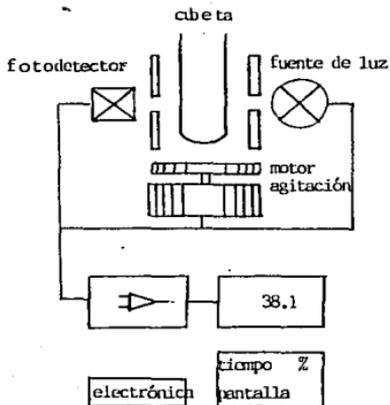
Elementos requeridos para el fibrintimer 10:

- . Dispo-rack. Cubetas de plástico en series de 5.
- . Pipeta de precisión automática con capacidad para 5 canales, en donde se insertan puntas de plástico.
- . Magnetos pequeños recubiertos de níquel, los cuales van dentro de las cubetas de plástico.
- . Bandejas de plástico contapa, de capacidad de 20-ml para la incubación del reactivo.

Ventajas del equipo.

Todas las muestras plasmáticas y todos los reactivos comerciales pueden manejarse, independientemente de los niveles de turbiedad o posible coloración de las muestras o reactivos.

Todos los reactivos activados por partículas, pueden ser aplicados, dada la actividad agitadora que evita cualquier tipo de sedimentación; el pequeño mezclador no interfiere como un electrodo en la formación de los coágulos, y no crea una resistencia mecánica a la formación de coágulos como ocurre con otros sistemas, el pequeño mezclador sólo se precisa para agitar. (34)



ESQUEMA No. 3  
ESQUEMA INTERNO DEL FIBRINTIMER 10

C. Curvas de referencia en % de actividad.

TP(s)	% de actividad								TP(s)	% de actividad							
	264	505521A	281	284	505534	280	261	263		264	505521A	281	284	505534	280	261	263
10.1	100								13.6	47.5	69.4	60.0	63.0	77.9	69.7	71.0	92.6
10.2	97.8								13.7	46.8	68.6	59.0	62.0	77.0	68.3	69.7	91.0
10.3	95.5								13.8	46.2	67.8	58.0	61.0	76.1	67.0	68.3	89.4
10.4	93.3								13.9	45.5	67.0	57.0	60.0	75.3	65.7	67.0	87.8
10.5	91.0								14.0	44.8	66.3	56.0	59.0	74.4	64.3	65.7	86.2
10.6	89.0								14.1	44.2	65.7	55.0	58.3	73.6	63.0	64.3	84.6
10.7	87.0								14.2	43.5	65.0	54.0	57.5	72.7	62.0	63.0	83.0
10.8	85.0								14.3	42.8	64.3	53.0	56.8	71.9	62.0	61.7	81.8
10.9	83.0								14.4	42.2	63.7	52.0	56.0	71.0	60.0	60.3	80.6
11.0	81.0								14.5	41.5	63.0	51.0	55.3	70.3	59.0	59.0	79.4
11.1	79.0								14.6	41.1	62.2	50.0	54.5	69.7	58.3	58.0	78.2
11.2	77.0	100							14.7	40.8	61.4	49.4	53.8	69.0	57.5	57.0	77.0
11.3	75.0	98.5							14.8	40.4	60.6	48.8	53.0	68.3	56.8	56.0	75.5
11.4	73.0	97.0	100	100					14.9	40.0	59.8	48.1	52.0	67.7	56.0	54.5	74.0
11.5	71.0	95.5	97.8	97.8					15.0	39.5	59.0	47.5	51.0	67.0	55.4	53.0	72.5
11.6	69.7	94.0	95.5	95.5	100				15.1	39.0	58.4	46.8	50.0	66.3	54.8	52.0	71.0
11.7	68.3	92.5	93.3	93.3	98.9				15.2	38.5	57.8	46.2	49.2	65.7	54.2	51.0	70.0
11.8	67.0	91.0	91.0	91.0	97.8				15.3	38.0	57.2	45.5	48.3	65.0	53.6	50.0	69.0
11.9	65.7	89.7	88.3	89.0	96.6				15.4	37.5	56.6	44.8	47.5	64.3	53.0	49.2	68.0
12.0	64.3	88.3	85.7	87.0	95.5	100			15.5	37.0	56.0	44.2	47.0	63.7	52.3	48.3	67.0
12.1	63.0	87.0	83.0	85.0	94.4	97.0			15.6	36.5	55.4	43.5	46.5	63.0	51.5	47.5	66.0
12.2	61.7	85.7	81.5	83.0	93.3	94.0			15.7	36.0	54.8	42.8	46.0	62.4	50.8	46.8	65.0
12.3	60.3	84.3	80.0	81.5	92.1	91.0			15.8	35.5	54.2	42.2	45.5	61.9	50.0	46.2	64.0
12.4	59.0	83.0	78.5	80.0	91.0	89.0	100		15.9	35.2	53.6	41.5	45.0	61.3	49.2	45.5	63.0
12.5	58.0	81.8	77.0	78.5	89.7	87.0	97.8		16.0	34.8	53.0	41.0	44.5	60.7	48.3	44.8	62.2
12.6	57.0	80.6	75.0	77.0	88.3	85.0	95.5		16.1	34.5	52.4	40.5	44.0	60.1	47.5	44.2	61.4
12.7	56.0	79.4	73.0	75.0	87.0	83.0	93.3		16.2	34.0	51.8	40.0	43.5	59.6	46.8	43.5	60.6
12.8	55.0	78.2	71.0	73.0	85.7	81.5	91.0		16.3	33.5	51.2	39.5	43.0	59.0	46.2	42.8	59.8
12.9	54.0	77.0	69.0	71.0	84.3	80.0	87.0		16.4	33.0	50.6	39.0	42.5	58.6	45.5	42.2	59.0
13.0	53.0	75.8	67.0	70.0	83.0	78.5	83.0		16.5	32.8	50.0	38.5	42.0	58.1	45.0	41.5	58.4
13.1	51.5	74.6	65.7	69.0	82.1	77.0	81.0		16.6	32.7	49.5	38.1	41.5	57.7	44.5	41.0	57.8
13.2	50.0	73.4	64.3	68.0	81.3	75.5	79.0	100	16.7	32.5	49.0	37.8	41.0	57.3	44.0	40.5	57.2
13.3	49.4	72.2	63.0	67.0	80.4	74.0	77.0	98.2	16.8	32.2	48.5	37.4	40.5	56.9	43.5	40.0	56.6
13.4	48.8	71.0	62.0	65.7	79.6	72.5	75.0	96.4	16.9	31.8	48.0	37.0	40.0	56.4	43.0	39.5	56.0
13.5	48.1	70.2	61.0	64.3	78.7	71.0	73.0	94.6	17.0	31.5	47.5	36.3	39.6	56.0	42.5	39.0	55.3

Curvas de referencia de las tromboplastinas empleadas para la evaluación del tiempo de protrombina.

% de actividad

% de actividad

TP(s)	264	505521A	281	284	505534	280	261	263
17.1	31.3	47.1	35.5	39.3	55.5	42.0	38.5	54.5
17.2	31.0	46.7	35.3	38.9	55.0	41.5	38.0	53.8
17.3	30.8	46.3	35.0	38.5	54.5	41.0	37.5	53.0
17.4	30.5	45.9	34.8	38.0	54.0	40.5	37.0	52.3
17.5	30.2	45.5	34.5	37.5	53.5	40.0	36.5	51.5
17.5	29.8	45.1	34.0	37.0	53.0	39.6	36.0	50.8
17.7	29.5	44.7	33.5	36.6	52.5	39.3	35.5	50.0
17.8	29.2	44.3	33.0	36.3	52.0	38.9	35.2	49.5
17.9	28.8	43.9	32.8	35.9	51.5	38.5	34.8	49.0
18.0	28.5	43.5	32.7	35.5	51.0	38.0	34.5	48.5
18.1	28.3	43.2	32.5	35.3	50.5	37.5	34.0	48.0
18.2	28.0	42.8	32.3	35.0	50.0	37.0	33.5	47.5
18.3	27.8	42.5	32.0	34.8	49.6	36.6	33.0	47.1
18.4	27.5	42.2	31.8	34.5	49.3	36.3	32.8	46.7
18.5	27.3	41.8	31.5	34.1	48.9	35.9	32.5	46.3
18.6	27.0	41.5	31.3	33.8	48.6	35.5	32.1	45.9
18.7	26.8	41.3	31.0	33.4	48.2	35.3	31.8	45.5
18.8	26.7	41.0	30.8	33.0	47.9	35.0	31.5	45.0
18.9	26.5	40.8	30.5	32.8	47.5	32.4	31.2	44.5
19.0	26.0	40.5	30.2	32.7	47.2	34.5	30.8	44.0
19.1	25.5	40.3	29.8	32.5	46.8	34.1	30.5	43.5
19.2	25.3	40.0	29.5	32.3	46.5	33.8	30.2	43.1
19.3	25.2	39.8	29.3	32.0	46.2	33.4	29.8	42.7
19.4	25.0	39.5	29.0	35.8	45.8	33.0	29.5	42.3
19.5	24.9	39.3	28.8	31.5	45.5	32.9	29.2	41.9
19.6	24.8	39.0	28.5	31.3	45.2	32.8	28.8	41.5
19.7	24.6	38.8	28.3	31.0	44.9	32.6	28.5	41.1
19.8	24.5	38.5	28.0	30.8	44.6	32.5	28.3	40.8
19.9	24.3	38.2	27.7	30.5	44.4	32.3	28.2	40.4
20.0	24.2	37.9	27.3	30.2	44.1	32.0	28.0	40.0
20.1	24.0	37.6	27.0	29.8	43.8	31.8	27.7	39.7
20.2	23.8	37.3	26.8	29.5	43.5	31.5	27.3	39.4
20.3	23.5	37.0	26.7	29.3	43.2	31.3	27.0	39.1
20.4	23.3	36.7	26.5	29.0	42.9	31.0	26.8	38.8
20.5	23.2	36.4	26.2	28.8	42.6	30.8	26.5	38.5

TP(s)	264	505521A	281	284	505534	280	261	263
20.6	23.1	36.1	25.8	28.5	42.4	30.5	26.3	38.2
20.7	23.0	35.8	25.5	28.4	42.1	30.3	26.0	37.9
20.8	22.8	35.5	25.3	28.3	41.8	30.0	25.8	37.6
20.9	22.5	35.4	25.2	28.1	41.5	29.8	25.5	37.3
21.0	22.3	35.2	25.0	28.0	41.3	29.5	25.3	37.0
21.1	22.2	35.0	24.8	27.8	41.0	29.2	25.0	36.6
21.2	22.1	34.8	24.7	27.5	40.8	28.8	28.8	36.3
21.3	22.0	34.7	24.5	27.3	40.5	28.5	24.7	35.9
21.4	21.9	34.5	24.4	27.0	40.3	28.4	24.5	35.5
21.5	21.7	34.1	24.3	26.9	40.0	28.3	24.3	35.3
21.6	21.6	33.8	24.1	26.8	39.8	28.1	24.2	35.0
21.7	21.4	33.4	24.0	26.6	39.6	28.0	24.0	34.8
21.8	21.3	33.0	23.8	26.5	39.4	27.8	23.8	34.5
21.9	21.1	32.9	23.5	26.2	39.1	27.5	23.5	34.3
22.0	21.0	32.8	23.3	25.8	38.9	27.3	23.3	33.8
22.1	20.8	32.8	23.2	25.5	38.7	27.0	23.2	33.4
22.2	20.6	32.7	23.1	25.4	38.5	26.9	23.1	33.0
22.3	20.4	32.6	23.0	25.3	38.3	26.8	23.0	32.8
22.4	20.3	32.5	22.8	25.1	38.1	26.6	22.8	32.9
22.5	20.1	32.3	22.7	25.0	37.9	26.5	22.5	32.7
22.6	20.0	32.1	22.5	24.9	37.6	26.3	22.3	32.6
22.7	19.9	31.9	22.3	24.8	37.4	26.0	22.2	32.5
22.8	19.7	31.7	22.2	24.6	37.2	25.8	22.1	32.3
22.9	19.6	31.5	22.1	24.5	37.0	25.5	22.0	32.0
23.0	19.5	31.3	22.0	24.3	36.8	25.4	21.8	31.8
23.1	19.3	31.2	21.7	24.2	36.5	25.3	21.6	31.5
23.2	19.2	31.0	21.4	24.0	36.3	25.2	21.4	31.3
23.3	19.1	30.8	21.3	23.8	36.0	25.1	21.3	31.1
23.4	19.0	30.7	21.1	23.7	35.8	25.0	21.1	30.9
23.5	18.9	30.5	21.0	23.5	35.5	24.8	21.0	30.7
23.6	18.8	30.3	20.9	23.3	35.4	24.7	20.8	30.5
23.7	18.7	30.1	20.7	23.2	35.2	24.5	20.6	30.3
23.8	18.6	29.9	20.6	23.2	35.1	24.3	20.4	30.0
23.9	18.5	29.7	20.4	23.1	34.9	24.2	20.2	29.8
24.0	18.4	29.5	20.3	23.0	34.6	24.0	20.0	29.5

TP(s)	% de actividad								TP(s)	% de actividad							
	264	505521A	281	284	505534	280	261	263		264	505521A	281	284	505534	280	261	263
24.1	18.3	29.3	20.1	22.8	34.6	23.8	19.9	29.3	27.6	15.1	24.5	16.4	18.6	29.2	19.4	16.1	23
24.2	18.2	29.1	20.0	22.6	34.5	23.7	19.7	29.1	27.7	15.1	24.4	16.3	18.5	29.1	19.3	16.0	23
24.3	18.1	28.9	19.9	22.5	34.3	23.5	19.6	28.9	27.8	15.0	24.3	16.3	18.4	28.9	19.2	16.0	23
24.4	18.0	28.7	19.7	22.3	34.1	23.3	19.5	28.7	27.9	14.9	24.2	16.2	18.3	28.8	19.1	15.9	23
24.5	17.9	28.5	19.6	22.2	33.9	23.2	19.3	28.5	28.0	14.8	24.2	16.1	18.2	28.6	19.1	15.7	23
24.6	17.8	28.4	19.5	22.1	33.6	23.2	19.2	28.4	28.1	14.8	24.1	16.0	18.1	28.5	19.0	15.6	23
24.7	17.6	28.3	19.4	22.0	33.4	23.1	19.1	28.2	28.2	14.7	24.0	16.0	18.0	28.4	18.9	15.5	23
24.8	17.5	28.2	19.3	21.8	33.2	23.0	19.0	28.1	28.3	14.6	23.9	15.9	17.9	28.4	18.8	15.4	22
24.9	17.4	28.1	19.2	21.7	33.0	22.8	18.9	28.0	28.4	14.6	23.7	15.8	17.8	28.3	18.7	15.4	22
25.0	17.3	28.0	19.1	21.5	32.9	22.5	18.8	27.7	28.5	14.5	23.6	15.8	17.7	28.2	18.6	15.3	22
25.1	17.2	27.8	18.9	21.4	32.8	22.3	18.6	27.5	28.6	14.4	23.4	15.7	17.6	28.1	18.5	15.3	22
25.2	17.1	27.7	18.8	21.3	32.7	22.2	18.5	27.2	28.7	14.4	23.3	15.6	17.5	28.1	18.4	15.2	22
25.3	17.0	27.5	18.6	21.1	32.6	22.2	18.4	27.0	28.8	14.3	23.2	15.5	17.4	28.0	18.4	15.1	22
25.4	16.9	27.3	18.5	21.0	32.5	22.1	18.3	26.9	28.9	14.2	23.2	15.5	17.3	27.8	18.3	15.0	22
25.5	16.8	27.2	18.4	20.8	32.4	22.0	18.2	26.7	29.0	14.2	23.1	15.4	17.3	27.7	18.2	14.9	22
25.6	16.8	27.0	18.3	20.7	32.2	21.9	18.1	26.6	29.1	14.1	23.1	15.3	17.2	27.5	18.1	14.8	22
25.7	16.7	26.9	18.2	20.6	32.1	21.7	18.0	26.5	29.2	14.0	23.1	15.3	17.1	27.3	18.0	14.8	21
25.8	16.6	26.8	18.1	20.4	31.9	21.6	17.9	26.3	29.3	14.0	23.0	15.2	17.1	27.2	17.9	14.7	21
25.9	16.5	26.7	18.1	20.3	31.8	21.4	17.8	26.0	29.4	13.9	22.9	15.1	17.0	27.0	17.8	14.6	21
26.0	16.4	26.6	18.0	20.1	31.6	21.3	17.6	25.8	29.5	13.8	22.7	15.0	16.9	26.9	17.6	14.6	21
26.1	16.3	26.5	17.9	20.0	31.5	21.2	17.5	25.5	29.6	13.8	22.6	14.9	16.9	26.8	17.5	14.5	21
26.2	16.2	26.3	17.8	19.9	31.4	21.1	17.4	25.4	29.7	13.7	22.4	14.9	16.8	26.8	17.4	14.4	21
26.3	16.1	26.1	17.6	19.8	31.2	21.0	17.3	25.3	29.8	13.6	22.3	14.8	16.8	26.7	17.4	14.3	21
26.4	16.0	25.9	17.5	19.7	31.1	20.8	17.2	25.2	29.9	13.6	22.2	14.8	16.7	26.6	17.3	14.2	21
26.5	16.0	25.7	17.4	19.6	30.9	20.6	17.1	25.1	30.0	13.1	22.2	14.7	16.6	26.5	17.2	14.2	21
26.6	15.9	25.5	17.3	19.5	30.8	20.4	17.0	25.0	30.1	13.4	22.1	14.6	16.5	26.4	17.1	14.1	20
26.7	15.8	25.4	17.2	19.4	30.6	20.3	16.9	24.9	30.2	13.4	22.1	14.5	16.4	26.3	17.1	14.0	20
26.8	15.8	25.3	17.1	19.3	30.5	20.2	16.8	24.8	30.3	13.3	22.0	14.4	16.3	26.1	17.0	14.0	20
26.9	15.7	25.2	17.0	19.2	30.3	20.1	16.8	24.6	30.4	13.3	21.9	14.4	16.3	26.0	16.9	13.9	20
27.0	15.6	25.1	16.9	19.1	30.2	20.0	16.7	24.5	30.5	13.2	21.8	14.3	16.2	25.9	16.9	13.8	20
27.1	15.5	25.0	16.8	19.1	30.0	19.9	16.6	24.4	30.6	13.2	21.6	14.3	16.1	25.8	16.8	13.8	20
27.2	15.5	24.9	16.8	19.0	29.8	19.8	16.5	24.3	30.7	13.2	21.5	14.2	16.1	25.6	16.8	13.7	20
27.3	15.4	24.8	16.7	18.9	29.7	19.7	16.4	24.1	30.8	13.1	21.4	14.2	16.0	25.5	16.7	13.6	20
27.4	15.3	24.7	16.6	18.8	29.7	19.6	16.3	24.0	30.9	13.1	21.3	14.1	16.0	25.4	16.6	13.6	19
27.5	15.2	24.6	16.5	18.7	29.4	19.5	16.2	23.8	31.0	13.0	21.3	14.0	15.9	25.3	16.0	13.5	19

TP(s)	% de actividad							TP(s)	% de actividad								
	264	505521A	281	284	505534	280	261		263	264	505521A	281	284	505534	280	261	263
31.1	12.9	21.2	14.0	15.8	25.3	16.5	13.4	19.8	34.6	11.3	18.4	12.1	13.7	22.4	14.3	11.5	17.0
31.2	12.8	21.1	13.9	15.7	25.2	16.5	13.4	19.7	34.7	11.2	18.4	12.1	13.7	22.3	14.3	11.5	17.0
31.3	12.8	21.1	13.8	15.7	25.1	16.4	13.3	19.6	34.8	11.2	18.3	12.0	13.6	22.3	14.2	11.5	16.9
31.4	12.7	21.0	13.8	15.6	25.0	16.3	13.3	19.5	34.9	11.1	18.2	12.0	13.6	22.2	14.2	11.4	16.8
31.5	12.7	20.9	13.7	15.5	24.9	16.2	13.2	19.4	35.0	11.1	18.2	11.9	13.5	22.2	14.1	11.4	16.8
31.6	12.6	20.7	13.6	15.5	24.9	16.1	13.2	19.3	35.1	11.1	18.1	11.9	13.4	22.1	14.1	11.3	16.7
31.7	12.6	20.6	13.6	15.4	24.8	16.1	13.2	19.2	35.2	11.0	18.0	11.8	13.4	22.1	14.0	11.3	16.7
31.8	12.5	20.5	13.5	15.3	24.7	16.0	13.1	19.1	35.3	11.0	18.0	11.8	13.3	22.0	14.0	11.2	16.6
31.9	12.5	20.4	13.4	15.3	24.6	16.0	13.0	19.0	35.4	11.0	17.9	11.7	13.3	22.0	13.9	11.2	16.6
32.0	12.4	20.3	13.4	15.2	24.6	15.9	12.9	19.0	35.5	10.9	17.9	11.7	13.2	21.9	13.9	11.1	16.5
32.1	12.4	20.2	13.3	15.1	24.5	15.8	12.8	18.9	35.6	10.9	17.8	11.6	13.2	21.8	13.8	11.1	16.5
32.2	12.3	20.2	13.3	15.0	20.4	15.8	12.7	18.8	35.7	10.9	17.7	11.6	13.2	21.7	13.8	11.0	16.4
32.3	12.3	20.0	13.2	14.9	24.4	15.7	12.7	18.7	35.8	10.8	17.6	11.5	13.1	21.6	13.7	11.0	16.3
32.4	12.2	20.0	13.2	14.9	24.3	15.6	12.7	18.6	35.9	10.8	17.6	11.5	13.1	21.5	13.7	11.0	16.3
32.5	12.2	19.9	13.2	14.8	24.2	15.5	12.6	18.6	36.0	10.7	17.5	11.5	13.0	21.4	13.6	10.9	16.2
32.6	12.2	19.8	13.1	14.7	24.1	15.5	12.6	18.5	36.1	10.7	17.4	11.5	12.9	21.4	13.6	10.9	16.2
32.7	12.1	19.7	13.1	14.7	24.1	15.4	12.5	18.4	36.2	10.6	17.4	11.4	12.9	21.3	13.5	10.8	16.1
32.8	12.1	19.7	13.0	14.6	24.0	15.4	12.4	18.2	36.3	10.6	17.3	11.4	12.9	21.3	13.5	10.8	16.0
32.9	12.0	19.6	12.9	14.6	23.9	15.3	12.4	18.3	36.4	10.6	17.3	11.4	12.8	21.2	13.4	10.7	16.0
33.0	12.0	19.5	12.8	14.6	23.8	15.3	12.3	18.2	36.5	10.5	17.2	11.3	12.8	21.2	13.4	10.7	15.9
33.1	11.9	19.5	12.8	14.5	23.7	15.2	12.3	18.4	36.6	10.5	17.2	11.3	12.8	21.1	13.3	10.7	15.9
33.2	11.9	19.4	12.7	14.5	23.5	15.1	12.3	18.1	36.7	10.5	17.1	11.2	12.7	21.1	13.3	10.6	15.8
33.3	11.8	19.3	12.7	14.4	23.4	15.1	12.2	18.0	36.8	10.4	17.1	11.2	12.7	21.0	13.3	10.6	15.8
33.4	11.8	19.3	12.7	14.4	23.3	15.0	12.1	18.0	36.9	10.4	17.0	11.1	12.7	20.9	13.2	10.5	15.7
33.5	11.7	19.2	12.7	14.4	23.3	14.9	12.1	17.9	37.0	10.4	17.0	11.1	12.6	20.8	13.2	10.5	15.7
33.6	11.7	19.1	12.6	14.3	23.2	14.9	12.0	17.8	37.1	10.3	16.9	11.0	12.6	20.7	13.2	10.5	15.6
33.7	11.6	19.1	12.6	14.2	23.2	14.8	12.0	17.7	37.2	10.3	16.9	11.0	12.5	20.6	13.1	10.4	15.6
33.8	11.6	19.0	12.5	14.2	23.1	14.8	11.9	17.6	37.3	10.3	16.8	11.0	12.5	20.5	13.1	10.4	15.5
33.9	11.6	19.0	12.5	14.1	23.1	14.7	11.9	17.5	37.4	10.2	16.8	11.0	12.5	20.4	13.0	10.4	15.5
34.0	11.5	18.9	12.4	14.1	23.0	14.7	11.8	17.4	37.5	10.2	16.7	10.9	12.4	20.3	12.9	10.3	15.4
34.1	11.5	18.8	12.4	14.0	22.9	14.6	11.8	17.4	37.6	10.2	16.7	10.9	12.4	20.3	12.9	10.3	15.4
34.2	11.4	18.7	12.3	14.0	22.8	14.6	11.7	17.3	37.7	10.1	16.7	10.9	12.3	20.2	12.8	10.3	15.3
34.3	11.4	18.7	12.3	13.9	22.7	14.5	11.7	17.3	37.8	10.1	16.6	10.8	12.3	20.1	12.8	10.2	15.3
34.4	11.4	18.6	12.2	13.9	22.6	14.4	11.6	17.2	37.9	10.0	16.6	10.8	12.2	20.1	12.8	10.2	15.2
34.5	11.3	18.5	12.2	13.8	22.5	14.4	11.6	17.1	38.0	10.0	16.5	10.7	12.2	20.0	12.7	10.2	15.2

TP(s)	% de actividad							TP(s)	% de actividad							
	264	505521A	281	284	505534	280	261		263	264	505521A	281	284	505534	280	261
38.1	16.5	10.7	12.2	20.0	12.7	10.1	15.1	41.6	14.8	10.9	18.1	11.4	13.1	13.1	13.1	13.1
38.2	16.4	10.6	12.1	19.9	12.7	10.1	15.1	41.7	14.8	10.9	18.1	11.4	13.1	13.1	13.1	13.1
38.3	16.3	10.6	12.1	19.9	12.7	10.1	15.0	41.8	14.7	10.9	18.0	11.3	13.1	13.1	13.1	13.1
38.4	16.3	10.6	12.0	19.8	12.6	10.0	14.9	41.9	14.7	10.9	18.0	11.3	13.1	13.1	13.1	13.1
38.5	16.2	10.5	12.0	19.8	12.6	10.0	14.9	42.0	14.7	10.8	17.9	11.3	13.1	13.1	13.1	13.1
38.6	16.2	10.5	11.9	19.7	12.5		14.8	42.1	14.6	10.3	17.8	11.2	13.1	13.1	13.1	13.1
38.7	16.1	10.5	11.9	19.7	12.5		14.8	42.2	14.6	10.7	17.8	11.2	13.1	13.1	13.1	13.1
38.8	16.1	10.5	11.9	19.6	12.4		14.7	42.3	14.6	10.6	17.7	11.1	13.1	13.1	13.1	13.1
38.9	16.0	10.4	11.8	19.5	12.4		14.7	42.4	14.5	10.6	17.7	11.1	13.1	13.1	13.1	13.1
39.0	16.0	10.4	11.8	19.5	12.3		14.6	42.5	14.5	10.6	17.6	11.1	13.1	13.1	13.1	13.1
39.1	15.9	10.4	11.7	19.4	12.3		14.6	42.6	14.5	10.5	17.6	11.0	13.1	13.1	13.1	13.1
39.2	15.9	10.3	11.7	19.3	12.2		14.5	42.7	14.4	10.5	17.5	11.2	13.1	13.1	13.1	13.1
39.3	15.9	10.3	11.6	19.3	12.2		14.5	42.8	14.4	10.5	17.5	11.0	13.1	13.1	13.1	13.1
39.4	15.8	10.3	11.6	19.2	12.2		14.5	42.9	14.3	10.5	17.4	11.0	13.1	13.1	13.1	13.1
39.5	15.8	10.2	11.6	19.2	12.1		14.4	43.0	14.3	10.4	17.4	10.9	12.8	12.8	12.8	12.8
39.6	15.7	10.2	11.5	19.1	12.1		14.4	43.1	14.3	10.4	17.3	10.9	12.8	12.8	12.8	12.8
39.7	15.7	10.2	11.5	19.1	12.0		14.3	43.2	14.2	10.4	17.3	10.9	12.8	12.8	12.8	12.8
39.8	15.6	10.1	11.4	19.0	12.0		14.3	43.3	14.1	10.4	17.2	10.8	12.8	12.8	12.8	12.8
39.9	15.6	10.1	11.4	19.0	11.9		14.2	43.4	14.1	10.3	17.2	10.8	12.8	12.8	12.8	12.8
40.0	15.5	10.1	11.4	18.9	11.9		14.2	43.5	14.1	10.3	17.2	10.8	12.8	12.8	12.8	12.8
40.1	15.5	10.0	11.4	18.9	11.9		14.1	43.6	14.0	10.3	17.1	10.7	12.8	12.8	12.8	12.8
40.2	15.4	10.0	11.4	18.8	11.8		14.1	43.7	14.0	10.3	17.1	10.7	12.7	12.7	12.7	12.7
40.3	15.4		11.3	18.8	11.8		14.0	43.8	14.0	10.2	17.0	10.6	12.7	12.7	12.7	12.7
40.4	15.4		11.3	18.7	11.8		14.0	43.9	13.9	10.2	17.0	10.6	12.7	12.7	12.7	12.7
40.5	15.3		11.3	18.7	11.7		13.9	44.0	13.9	10.2	16.9	10.6	12.6	12.6	12.6	12.6
40.6	15.3		11.2	18.6	11.7		13.9	44.1	13.9	10.2	16.9	10.5	12.6	12.6	12.6	12.6
40.7	15.2		11.2	18.6	11.6		13.9	44.2	13.8	10.1	16.9	10.5	12.6	12.6	12.6	12.6
40.8	15.2		11.2	18.5	11.6		13.8	44.3	13.8	10.1	16.8	10.5	12.6	12.6	12.6	12.6
40.9	15.2		11.1	18.5	11.6		13.8	44.4	13.7	10.1	16.8	10.5	12.5	12.5	12.5	12.5
41.0	15.1		11.1	18.4	11.6		13.7	44.5	13.7	10.1	16.8	10.4	12.5	12.5	12.5	12.5
41.1	15.1		11.1	18.4	11.5		13.7	44.6	13.7	10.0	16.7	10.4	12.5	12.5	12.5	12.5
41.2	15.0		11.0	18.3	11.5		13.7	44.7	13.6	10.0	16.7	10.4	12.4	12.4	12.4	12.4
41.3	15.0		11.0	18.3	11.5		13.6	44.8	13.6	10.0	16.7	10.4	12.4	12.4	12.4	12.4
41.4	14.9		11.0	18.2	11.5		13.6	44.9	13.5	10.0	16.6	10.3	12.3	12.3	12.3	12.3
41.5	14.9		11.0	18.2	11.4		13.5	45.0	13.5	10.0	16.6	10.3	12.3	12.3	12.3	12.3

TP(s)	% de actividad							TP(s)	% de actividad						
	264	505521A	281	284	505534	280	261		263	264	505521A	281	284	505534	280
45.1	13.4	13.4	16.5	10.3	10.3	12.2	48.6	12.4	15.2	11.1					
45.2	13.4	13.4	16.5	10.3	10.3	12.2	48.7	12.4	15.2	11.1					
45.3	13.4	13.4	16.4	10.2	10.2	12.2	48.8	12.4	15.1	11.1					
45.4	13.3	13.3	16.4	10.2	10.2	12.2	48.9	12.3	15.1	11.1					
45.5	13.3	13.3	16.3	10.2	10.2	12.2	49.0	12.3	15.0	11.1					
45.6	13.3	13.3	16.3	10.2	10.2	12.1	49.1	12.3	15.0	11.1					
45.7	13.3	13.3	16.2	10.1	10.1	12.1	49.2	12.2	14.9	11.1					
45.8	13.2	13.2	16.2	10.1	10.1	12.0	49.3	12.2	14.9	11.1					
45.9	13.2	13.2	16.1	10.1	10.1	12.0	49.4	12.2	14.8	11.1					
46.0	13.2	13.2	16.1	10.1	10.1	12.0	49.5	12.2	14.8	11.1					
46.1	13.2	13.2	16.1	10.0	10.0	12.0	49.6	12.2	14.8	11.1					
46.2	13.1	13.1	16.0	10.0	10.0	11.9	49.7	12.1	14.8	10.1					
46.3	13.1	13.1	16.0	10.0	10.0	11.9	49.8	12.1	14.7	10.1					
46.4	13.1	13.1	16.0	10.0	10.0	11.9	49.9	12.0	14.7	10.1					
46.5	13.0	13.0	15.9	10.0	10.0	11.8	50.0	12.0	14.7	10.1					
46.6	13.0	13.0	15.9	10.0	10.0	11.8	50.1	12.0	14.6	10.1					
46.7	13.0	13.0	15.9	10.0	10.0	11.8	50.2	12.0	14.6	10.1					
46.8	12.9	12.9	15.8	10.0	10.0	11.7	50.3	11.9	14.6	10.1					
46.9	12.9	12.9	15.8	10.0	10.0	11.7	50.4	11.9	14.5	10.1					
47.0	12.9	12.9	15.7	10.0	10.0	11.7	50.5	11.9	14.4	10.1					
47.1	12.8	12.8	15.7	10.0	10.0	11.6	50.6	11.8	14.5	10.1					
47.2	12.8	12.8	15.6	10.0	10.0	11.6	50.7	11.8	14.4	10.1					
47.3	12.8	12.8	15.6	10.0	10.0	11.6	50.8	11.8	14.4	10.1					
47.4	12.8	12.8	15.6	10.0	10.0	11.6	50.9	11.8	14.4	10.1					
47.5	12.7	12.7	15.5	10.0	10.0	11.5	51.0	11.7	14.3	10.1					
47.6	12.7	12.7	15.5	10.0	10.0	11.5	51.1	11.7	14.3	10.1					
47.7	12.7	12.7	15.5	10.0	10.0	11.5	51.2	11.7	14.3	10.1					
47.8	12.7	12.7	15.5	10.0	10.0	11.5	51.3	11.6	14.2	10.1					
47.9	12.6	12.6	15.4	10.0	10.0	11.4	51.4	11.6	14.2	10.1					
48.0	12.6	12.6	15.4	10.0	10.0	11.4	51.5	11.6	14.2	10.1					
48.1	12.6	12.6	15.4	10.0	10.0	11.4	51.6	11.6	14.2	10.1					
48.2	12.5	12.5	15.3	10.0	10.0	11.4	51.7	11.5	14.1	10.1					
48.3	12.5	12.5	15.3	10.0	10.0	11.3	51.8	11.5	14.1	10.1					
48.4	12.5	12.5	15.3	10.0	10.0	11.3	51.9	11.5	14.1	10.1					
48.5	12.4	12.4	15.2	10.0	10.0	11.3	52.0	11.5	14.0	10.1					

TP(e)	% de actividad							TP(s)	% de actividad							
	264	505521A	281	284	505534	280	261		263	264	505521A	281	284	505534	280	261
52.1		11.5			14.0			10.3	55.6	10.6				13.0		
52.2		11.4			14.0			10.3	55.7	10.6				13.0		
52.3		11.4			13.9			10.3	55.8	10.6				13.0		
52.4		11.4			13.9			10.3	55.9	10.5				12.9		
52.5		11.4			13.9			10.3	56.0	10.5				12.9		
52.6		11.3			13.8			10.2	56.1	10.5				12.9		
52.7		11.3			13.8			10.2	56.2	10.5				12.8		
52.8		11.3			13.8			10.2	56.3	10.5				12.8		
52.9		11.2			13.7			10.1	56.4	10.4				12.8		
53.0		11.2			13.7			10.1	56.5	10.4				12.8		
53.1		11.2			13.7			10.1	56.6	10.4				12.8		
53.2		11.2			13.6			10.1	56.7	10.4				12.7		
53.3		11.1			13.6			10.1	56.8	10.4				12.7		
53.4		11.1			13.6			10.0	56.9	10.3				12.7		
53.5		11.1			13.6			10.0	57.0	10.3				12.7		
53.6		11.1			13.5				57.1	10.3				12.7		
53.7		11.0			13.5				57.2	10.3				12.7		
53.8		11.0			13.5				57.3	10.3				12.6		
53.9		11.0			13.4				57.4	10.2				12.6		
54.0		10.9			13.4				57.5	10.2				12.6		
54.1		10.9			13.4				57.6	10.2				12.5		
54.2		10.9			13.4				57.7	10.2				12.6		
54.3		10.9			13.3				57.8	10.2				12.5		
54.4		10.9			13.3				57.9	10.2				12.5		
54.5		10.9			13.3				58.0	10.1				12.5		
44.6		10.9			13.3				58.1	10.1				12.4		
54.7		10.8			13.3				58.2	10.2				12.4		
54.8		10.8			13.2				58.3	10.1				12.4		
54.9		10.8			13.2				58.4	10.1				12.4		
55.0		10.8			13.2				58.5	10.1				12.3		
55.1		10.7			13.2				58.6	10.0				12.3		
55.2		10.7			13.1				58.7	10.0				12.3		
55.3		10.7			13.1				58.8	10.0				12.3		
55.4		10.6			13.1				58.9	10.0				12.2		
55.5		10.6			13.1				59.0					12.2		

TP(s)	% de actividad								TP(s)	% de actividad							
	264	505521A	281	284	505534	280	261	263		264	505521A	281	284	505534	280	261	263
59.1					12.2				62.6							11.5	
59.2					12.2				62.7							11.4	
59.3					12.1				62.8							11.4	
59.4					12.1				62.9							11.4	
59.5					12.1				63.0							11.4	
59.6					12.1				63.1							11.4	
59.7					12.0				63.2							11.3	
59.8					12.0				63.3							11.3	
59.9					12.0				63.4							11.3	
60.0					12.0				63.5							11.3	
60.1					11.9				63.6							11.3	
60.2					11.9				63.7							11.3	
60.3					11.9				63.8							11.2	
60.4					11.9				63.9							11.2	
60.5					11.9				64.0							11.2	
60.6					11.8				64.1							11.1	
60.7					11.8				64.2							11.1	
60.8					11.8				64.3							11.1	
60.9					11.8				64.4							11.1	
61.0					11.7				64.5							11.1	
61.1					11.7				64.6							11.0	
61.2					11.7				64.7							11.0	
61.3					11.7				64.8							11.0	
61.4					11.6				64.9							11.0	
61.5					11.6				65.0							11.0	
61.6					11.6				65.1							11.0	
61.7					11.6				65.2							11.0	
61.8					11.6				65.3							10.9	
61.9					11.6				65.4							10.9	
62.0					11.5				65.5							10.9	
62.1					11.5				65.6							10.9	
62.2					11.5				65.7							10.9	
62.3					11.5				65.8							10.9	
62.4					11.5				65.9							10.8	
62.5					11.5				66.0							10.8	

TP(s)	% de actividad							TP(s)	% de actividad							
	264	505521A	281	284	505534	280	261		263	264	505521A	281	284	505534	280	261
66.1					10.8				69.6					10.2		
66.2					10.8				69.7					10.2		
66.3					10.8				69.8					10.2		
66.4					10.7				69.9					10.2		
66.5					10.7				70.0					10.1		
66.6					10.7				70.1					10.1		
66.7					10.7				70.2					10.1		
66.8					10.6				70.3					10.1		
66.9					10.6				70.4					10.1		
67.0					10.6				70.5					10.1		
67.1					10.6				70.6					10.1		
67.2					10.6				70.7					10.0		
67.3					10.6				70.8					10.0		
67.4					10.5				70.9					10.0		
67.5					10.5				71.0					10.0		
67.6					10.5											
67.7					10.5											
67.8					10.5											
67.9					10.5											
68.0					10.4											
68.1					10.4											
68.2					10.4											
68.3					10.4											
68.4					10.4											
68.5					10.4											
68.6					10.4											
68.7					10.3											
68.8					10.3											
68.9					10.3											
69.0					10.3											
69.1					10.3											
69.2					10.3											
69.3					10.2											
69.4					10.2											
69.5					10.2											