

2  
Dej

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA



ESTANDARIZACION DE LA TROMBOPLAS-  
TINA TISULAR LIOFILIZADA PARA SU USO  
EN EL LABORATORIO CLINICO.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A N :  
ANGEL BARAJAS CHAVARRIA  
JOSE OSCAR GONZALEZ MORENO



TEJIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Abril 1991



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## CONTENIDO

	Páginas
<b>CAPITULO I</b>	
1.0 Introducción -----	1
1.1.1 Estados de Hipercoagulabilidad -----	1
1.1.2 Estados de Hipercoagulabilidad Primarios	1
1.1.3 Estados de Hipercoagulabilidad Secundarios	2
1.1.4 Anticoagulantes Orales -----	5
1.1.5 Mecanismo de acción -----	5
<b>CAPITULO II</b>	
1.2.1 Hemostasia -----	7
1.2.2 Vasoconstricción local -----	7
1.2.3 Formación del trombo plaquetario ----	7
1.2.4 Coagulación sanguínea -----	9
1.2.5 Cascada de la Coagulación Via Extrínseca	11
1.2.6 Cascada de la Coagulación Via Intrínseca	12
1.2.7 Fibrinolisis -----	13
<b>CAPITULO III.</b>	
1.3.1 Tromboplastinas -----	14
1.3.2 Nueva Terminología e Inversión de la Relación de Calibración -----	16
1.3.3 Calibración de una Tromboplastina de Trabajo -----	16
1.3.4 Desglóse Estadístico -----	18
1.3.5 Rango Internacional Normalizado (RIN)-	20
2.0 Fundamento de la Elección del Tema ---	24
3.0 Planteamiento del Problema -----	25
4.0 Objetivos -----	26
5.0 Hipotesis -----	27
6.0 Material y Métodos -----	28
7.0 Resultados -----	35
8.0 Discusión de Resultados -----	83
9.0 Conclusiones -----	88
10.0 Sugerencias -----	89
11.0 Anexos -----	90
12.0 Bibliografía -----	92

## 1.0 INTRODUCCION

### 1.1.1 ESTADOS DE HIPERCOAGULABILIDAD.

Se utiliza el termino estado de hipercoagulabilidad para definir situaciones clinicas en las que el paciente inusualmente se encuentra predispuesto a tromboembolismo o complicaciones tromboembolicas.

La trombosis es el resultado de una inapropiada e irregular forma de hemostasis, cuando la sangre no se conserva liquida dentro del sistema vascular puede producir un trombo local, trombosis multiples o coagulacion intravascular diseminada (CID). (3,4,5,47). Algunos procesos asociados a un estado de hipercoagulabilidad se encuentran:

Embarazo, estado puerperal y postoperatorio, reposo prolongado en la cama, aterosclerosis, infarto al miocardio e insuficiencia cardiaca congestiva, en cada uno de estos procesos, el factor desencadenante del trombo pudiera ser la estasis o la lesi3n a la pared vascular.

Se ha observado que en pacientes con tendencia a trombosis tienen valores altos de factor VIII. (3,14)

Los estadios de hipercoagulabilidad se han clasificado en primarios, secundarios.

### 1.1.2 ESTADOS DE HIPERCOAGULABILIDAD PRIMARIOS.

#### a) Deficiencia de Antitrombina III.

Es una enfermedad hereditaria, las manifestaciones clinicas se inician frecuentemente en la segunda y tercera decada de vida que incluyen trombosis venosa profunda y embolismo pulmonar, raramente trombosis arterial, en el tratamiento a largo plazo se utilizan los anticoagulantes cumarinicos. (40)

#### b) Deficiencia de proteina C y proteina S.

La proteina C es una proteina vitamina K dependiente, la cual en pacientes con tratamientos con cumarinicos se encuentra disminuida su concentraci3n plasmatica. La deficiencia de proteina S cursa con trombosis venosa frecuente, la deficiencia de ambas proteinas se ha observado en alteraciones hepaticas y en CID. (44,45,46,49).

\* Para abreviaturas ver el anexo 2

### c) Coagulación Intravascular Diseminada.

La CID es un síndrome que cubre un amplio espectro de alteraciones desde el trombo oclusivo localizado hasta la activación de todos los factores de la coagulación con depósito de fibrina a lo largo de la microcirculación. La CID se puede agrupar en cuatro categorías.

- 1.-Infecciones
- 2.-Liberación de sustancias tromboplásticas
- 3.-Hipotensión, Estasis
- 4.-Combinación de las anteriores.

Diversas enfermedades no relacionadas entre sí pueden originar CID a través de mecanismos que conducen a la activación de las plaquetas y de la coagulación plasmática(3,4,5,).

Las manifestaciones clínicas se muestran por trastornos mínimos en los procesos de coagulación, la hemorragia es común, la trombosis clínicamente es el primer dato en algunos pacientes.

La CID puede acompañarse de tromboflebitis espontánea, cianosis, o gangrena de las extremidades, trastornos en la función de varios órganos, alta incidencia de insuficiencia cardiorrespiratoria.

El diagnóstico de laboratorio se basa en las siguientes pruebas:

- Cambios menores en pruebas de coagulación
- Gelación con etanol positiva, indica que existe fibrina circulante.
- Precipitación con sulfato de protamina positivo
- Niveles aumentados de productos de degradación del fibrinógeno
- Disminución de la concentración del fibrinógeno circulante
- Disminución del recuento de plaquetas
- Prolongación del tiempo de coagulación con trombina.

#### 1.1.3 ESTADOS DE HIPERCOAGULABILIDAD SECUNDARIOS.

Incluyen un vasto grupo de alteraciones que se asocian a un alto riesgo de trombosis. Las alteraciones en la hemostasia son amplias y complejas(5).

##### a) Neoplasias.

En las neoplasias se ha observado alteración de la coagulación por incremento de los factores VII, XI y XII, trombosis, elevación de los productos de degradación de la fibrina, disminución de los niveles de antitrombina III y fibrinólisis acelerada. (6,7)

b) Anormalidades de los vasos sanguíneos.

En las alteraciones que pueden ocurrir en los vasos sanguíneos un factor común es la estasis del flujo sanguíneo, así como daño al endotelio capilar y liberación de sustancias tromboplasticas. Esta acción se ve incrementada por el uso de artefactos artificiales tales como prótesis vasculares las cuales promueven tromboembolismo en diversa patologías que cursan con leucocitosis, se produce lentificación del flujo y formación del trombo blanco y embolización del mismo. (3,4,7,8).

c) Anormalidades plaquetarias.

En procesos en los cuales se encuentran alteraciones en la calidad de las plaquetas tales como el metabolismo anormal del ácido araquidónico, pérdida de los receptores alfa adrenérgicos y sensibilidad aumentada a las sustancias fisiológicamente destinadas a la agregación plaquetaria originan fenómenos trombóticos en la microcirculación de predominio arterial.

1) Púrpura Trombocitopenica Trombótica (PTT):

Afecta a los adultos preferentemente a mujeres y es posible que sea como consecuencia del uso de anticonceptivos orales (4,5,40,45). Se caracteriza por lesión de la pared vascular por complejos inmunes, los síntomas se manifiestan como fiebre y dolor abdominal seguido por el desarrollo de purpura y manifestaciones difusas del SNC, afección renal con hematuria, uremia y anemia hemolítica.

2) Síndrome Hemolítico Urémico (SUH) :

Afecta principalmente a niños, se manifiesta después de una infección del tracto respiratorio o de gastroenteritis, con oliguria o anuria, anemia y purpura.

La anemia se debe a la destrucción de los eritrocitos prematuros que al parecer se debe a la fragmentación mecánica dentro de la luz desigual y en estenosis, esta hemólisis recibe el nombre de hemólisis angiopática, el recuento plaquetario es muy bajo y pueden existir alteraciones en las pruebas de coagulación.

#### 1.1.4 ANTICOAGULANTES ORALES

Los anticoagulantes orales son compuestos orgánicos con un peso molecular bajo, poseen una estructura similar a la vitamina K (18,25,48,49).

Los más utilizados son del tipo de la bishidroxícumarina y la warfarina, a diferencia de la heparina no tienen efecto in vitro, y su efecto in vivo tiene un periodo latente de 12-24 horas, la warfarina es la más utilizada por su duración y su acción predecible.

La vida media de una dosis de warfarina es de 35 horas, y su concentración en plasma se muestra mínima con relación al efecto anticoagulante.

Gran cantidad de la warfarina se acopla a la albúmina plasmática y solo la warfarina libre es terapéuticamente activa.

Los anticoagulantes orales se utilizan para la prevención y tratamiento de trombosis, trombolismo venoso, prevención del embolismo sistémico que puede causar trombosis intracardiaca y otros.

El mayor problema asociado al uso de los anticoagulantes orales es:

1.-El nivel óptimo o la intensidad del efecto anticoagulante (El nivel que produce protección de la trombosis y con un mínimo de riesgo de hemorragia) no puede ser establecido en muchas de las condiciones en las cuales son usados (3,18,25).

Las hemorragias debido a las drogas cumarínicas son una complicación común, una de las causas más comunes de la hemorragia fatal es el sangrado gastrointestinal de úlcera péptica.

En los pacientes que reciben drogas del tipo cumarínico está contraindicado el empleo de la aspirina, ya que la inhibición de la función plaquetaria puede producir cuadros hemorrágicos (3,7,16).

#### 1.1.5 MECANISMO DE ACCION

Los anticoagulantes orales del tipo de la cumarina son antagonistas de los factores de la coagulación vitamina K dependientes en el proceso posribosomal en la síntesis hepática, dichos factores son: II, VII, IX y X.

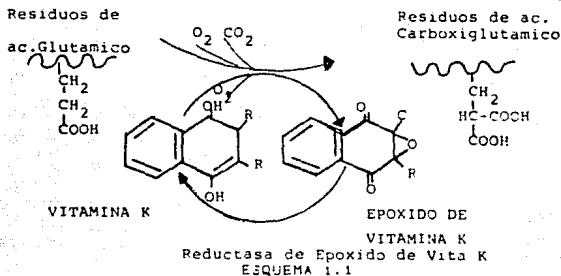
El resultado es la síntesis biológicamente inactiva pero inmunológicamente detectable de estas proteínas. La función de la vitamina K es promover la carboxilación de los factores II, VII, IX y X para incrementar la afinidad por el Calcio y facilitar de esta forma la interacción con los fosfolípidos. (48,49). Este proceso es necesario para la realización efectiva del proceso de coagulación.



Los antagonistas de la vitamina K interfieren en la interconversión cíclica de la vitamina K y el 2,3 epóxido (epóxido de Vitamina K), es decir bloquean la gama carboxilación enzimática de la protrombina y los factores VII, IX y X, en la cual de manera normal participa la vitamina K.

Por lo cual el efecto anticoagulante de esta droga es disminuir la concentración plasmática de dichos factores.

Como lo muestra el esquema 1.1 :



El efecto anticoagulante ocurre a las 24 horas, debido a la supresión del factor VII. La actividad anticoagulante es retrasada por 72-96 horas debido a la vida media de los factores II, IX y X.

Cuando la warfarina es administrada se observa una prolongación del tiempo de protrombina; el tiempo de protrombina es sensible a tres de los cuatro factores de la coagulación vitamina K dependientes, en consecuencia esta prueba o una modificación de la misma es el método de elección para monitorear los efectos de la droga en el laboratorio. (16, 21, 23).

La acción antitrombótica de estas drogas no es máxima hasta que los niveles plasmáticos de los factores IX y X disminuyen significativamente.

Por otra parte aun sin ser considerados como anticoagulantes orales de este tipo, se ha observado que la administración de aspirina o de salicilato de sodio tienen un efecto inhibitorio de la trombólisis en animales de experimentación así como una prolongación de tiempo de protrombina.

Posiblemente si se usaran en dosis suficientemente altas puedan inhibir la síntesis de los factores de la coagulación vitamina K dependientes (7).

LA TABLA 1.1 muestra la dosificación para drogas de tipo cumarina e indandiona:

DROGA		DOSIS(MG)		RESPUESTA(Hrs)	
CLASE	NOMBRE GENERICO	INICIAL	DIARIA DE SOSTEN	COMIENZO DE ACTIV. DESPUES DE DOSIS INICIAL	VUELTA A LO NORMAL DESPUES DE LA ULT.DOSIS
CUMARINA		1er día 300	-----		
	Bishidroxicumarina	2o día 200	25-100	48-96	48 - 96
	Warfarina	1er día 40-60	5-10	30-48	72 - 110
INDANDIONA	Fenindiona	1er día 200	25-100	24-48	48 - 72
		2o día 100	-----	-----	-----

\* Las dosis señaladas representan una simple aproximación general, y la dosis necesaria para un paciente determinado puede variar mucho por exceso o por defecto. (3,25).

TABLA 1.1

### 1.2.1 HEMOSTASIA

La hemostasia es un sistema de defensa del organismo que tiene como función principal prevenir la salida de sangre del interior de los vasos y detener la hemorragia si existe falta de continuidad en los mismos. La hemostasia se divide en cuatro fases las cuales son:

- 1.-Vasoconstricción local o componente vascular
- 2.-Hemostasia primaria o formación del trombo plaquetario.
- 3.-Coagulación sanguínea o formación del trombo de fibrina.
- 4.-Fibrinolisis o disolución del coagulo de fibrina.

Estos mecanismos están íntimamente ligados entre sí.

### 1.2.2 VASOCONSTRICCIÓN LOCAL

Al producirse una lesión en la piel se produce una vasoconstricción rápida seguida de una relajación, la vasoconstricción es originada por la estimulación directa de los nervios simpáticos localizados en la pared de los vasos, en seguida, tiene lugar la vasoconstricción por estimulación química debido a sustancias vasoactivas como la serotonina, liberada por las plaquetas así como por la síntesis de prostaglandinas en la plaqueta como el tromboxano A-2, paralelo a esto en endotelio vascular sintetiza prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) la cual es fuertemente vasodilatadora. (40,50,51).

### 1.2.3 FORMACIÓN DEL TROMBO PLAQUETARIO

La agregación plaquetaria es una respuesta rápida, en la cual se pueden distinguir los siguientes procesos:

- a) Adhesión a la pared vascular
- b) Cambio de forma y contracción de las plaquetas
- c) Secreción del contenido de los granulos
- d) Agregación de las plaquetas
- e) Agregación irreversible o estabilización por la fibrina.

a) La adhesión plaquetaria .

La adhesión de las plaquetas a la pared vascular es debida a que está al ser lesionada deja al descubierto el tejido conjuntivo subendotelial, que está constituido por colágeno, produciendo la adhesión para la cual es necesario que el colágeno se encuentre polimerizado, otro factor necesario es el factor VIII, la adhesión no requiere metabolismo

energetico, ni presencia de iones calcio. (1,43,50,51)

b) Cambio de forma y contracción de las plaquetas.

La adhesión de las plaquetas origina una serie de cambios, estas pierden su forma discoidea y adquieren forma esférica con prolongación o emisión de pseudopodos al mismo tiempo se realizan los siguientes eventos:

Contracción y relajación de las plaquetas, síntesis de prostaglandinas.

c) Secreción del contenido de los granulos.

La contracción de las plaquetas por estimulación del colágeno mantiene a los granulos en el centro y al producirse la relajación, tiene lugar la expulsión del contenido de estos al exterior liberando varias sustancias entre las cuales se encuentran.

1) Cuerpos densos de los que se liberan ADF y serotonina

2) Fibrinógeno, factor 4 plaquetario (tiene actividad de antiheparina).

3) Beta-tromboglobulina

4) Factor mitogénico.

5) Lisosomas que liberan diversas enzimas.

d) Agregación de las plaquetas.

Todos los cambios ocurridos en las plaquetas por estimulación de su membrana favorecen la unión de unas con otras para formar agregados, siendo necesarios los siguientes factores:

1.- Presencia de iones calcio

2.- Fibrinógeno extracelular

3.- las glucoproteínas IIb y III tienen que estar presentes en las membranas de las plaquetas (permiten la interacción de las plaquetas entre si) los agregados plaquetarios forman un trombo inestable, pero si tiene lugar la formación de fibrina entre estos agregados, las plaquetas quedan atrapadas entre las redes originando la formación de un trombo mas estable, la agregación es irreversible. (1,6,16,43,50,51)

#### 1.2.4 COAGULACION SANGUINEA

Tiene como finalidad la formación de fibrina insoluble a partir de fibrinogeno soluble.

Las redes de fibrina constituyen la trama fundamental del coágulo. El mecanismo por el cual se forma la fibrina constituye el sistema de la coagulación, mediante el cual se produce la activación de proteínas plasmáticas llamadas factores de la coagulación, interviniendo en estas reacciones otros componentes tales como cofactores y coenzimas que catalizan las reacciones.

La tabla 2.1 muestra las características de los factores de la coagulación.

La coagulación sanguínea se ha dividido en dos vías, una llamada vía intrínseca y otra vía extrínseca. (1,2,6,40,42,47,50,51).

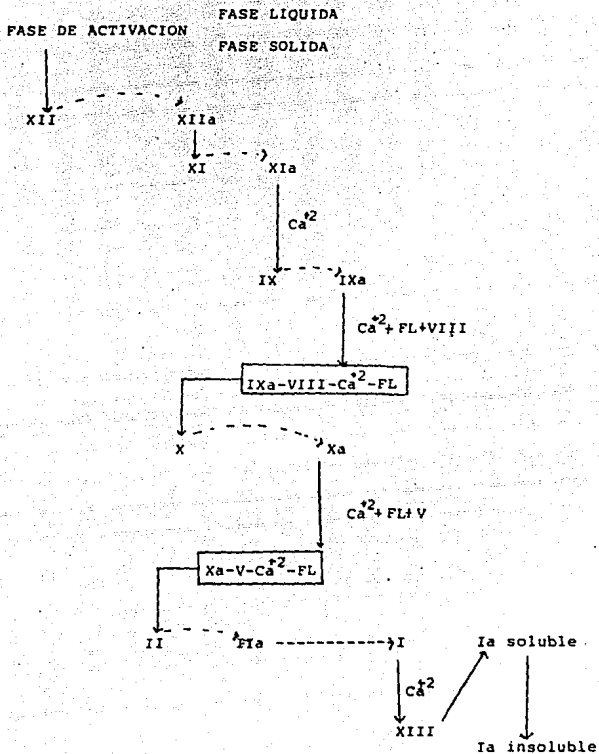
La cascada enzimática de estas vías se indican en los esquemas 2.1 y 2.2 respectivamente.

FACTOR	SINONIMO	VIDA MEDIA	CLASIFICACION	PRODUCTO ACTIVO	PESO MOLECULAR	CONCENTRACION EN PLASMA
I	FIBRINOGENO	90 Hr	-Globulina	Fibrina	330,000 a 340,000	1.5-3.5 g l
II*	PROTROMBINA	65 Hr	-Globulina	Trombina	72,000	0.1-0.2 g l
III	F.HISTICO F.TISULAR TROMBOPLAS- TINA.	---	FOSFOLIPIDO	-----	200,000	-----
IV	CALCIO	-----	Mineral	-----	40.08 g mol	5-20 mg dl
V	PROACELE- RINA.	12-25 Hr.	-Globulina	Acelerina Va	300,000	-----
VII*	PROCONVER- TINA	5-7 Hr	-Globulina	Convertina VIIa	45,000	0.0005-0.002 g l
VIII	F.ANTIHEMO- FILICO A	10-12 Hr	Glucoproteina	VIIIa	1.1X10 <sup>6</sup>	0.005-0.01 g l
IX*	F.ANTIHEMO- FILICO B	25 Hr	glucoproteina	IXa	57,000	0.01-0.02 g l
X*	F.STUART- PROWER	40 Hr	-Globulina	Xa	64,000	0.01-0.02 g l
XI	F.ROSENTHAL	50 Hr	-Globulina	XIa	160,000	-----
XII	F.HAGEMAN	50 Hr	-Globulina	XIIa	75,000	-----
XIII	ESTABILI- ZADOR	120 Hr	-Globulina	XIIIa	320,000	-----

\* Factores Vitamina K dependientes

(I,40,50,51)

CASCADA DE LA COAGULACION: VIA INTRINSECA.

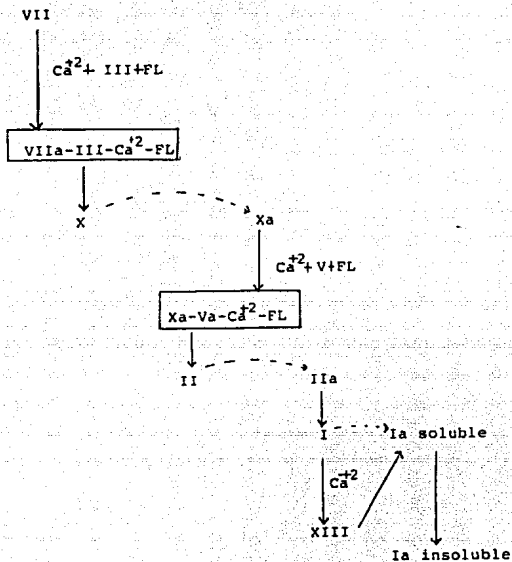


FL: Fosfolipidos

ESQUEMA 2.1

(1,40,50,51)

CASCADA DE LA COAGULACION: VIA EXTRINSECA



FL: Fosfolipidos

(1,40,50,51)

ESQUEMA 2.2



### 1.2.7 FIBRINOLISIS

La fibrinólisis es el proceso de degradación enzimática del coágulo de fibrina.

El mecanismo de fibrinólisis está dado por el sistema plasminógeno-plasmina. el plasminógeno es transformado en plasmina por acción proteolítica. los activadores histicos del plasminógeno existen en casi todos los tejidos, excepto en placenta e hígado.

La plasmina es la forma activa del plasminógeno la cual hidroliza los enlaces arginil-lisina, presenta gran afinidad por la fibrina pero no es específica. (1,3,6,40,47,50,51)

### 1.3.1 TROMBOPLASTINAS.

Tromboplastina es cualquier extracto tisular que tiene la propiedad de acelerar la activación de la coagulación sanguínea por la vía extrínseca. Dependiendo de la composición de la preparación, las tromboplastinas se pueden clasificar como: Tromboplastina simple: la cual es una suspensión salina o buffer del extracto tisular. Tromboplastina combinada, es una suspensión del extracto tisular en salina o buffer con una concentración apropiada de fibrinogeno, Factor V y cloruro de calcio. (9,13).

Por otra parte el monitoreo de los pacientes que reciben terapia con anticoagulantes orales se realiza principalmente con el tiempo de protrombina (TP), el resultado de esta prueba de laboratorio se puede reportar de varias formas:

- 1.-Tiempo de aparición del coagulo en segundos.
- 2.-Cociente de tiempo de protrombina (RP) utilizando a siguiente formula:  $RP = TP_{paciente} / TP_{Normal}$ .
- 3.- En porcentaje de actividad (Usando Curvas de dilución salina del plasma con un pool de plasmas).
- 4.-Índice de protrombina:  
 $Indice = (Tp \text{ normal} / Tp \text{ paciente}) * 100$ .

Sin embargo pese a reportar el resultado de diversas formas no se ha establecido el rango terapéutico de estos pacientes utilizando los resultados anteriores.

Se observó que otro factor que influya era la tromboplastina utilizada para la realización de la prueba de TP, las tromboplastinas pueden ser de diferentes origen (de mono, conejo, hombre y aun de diferentes órganos (cerebro, placenta), todo esto conduce a la variabilidad de resultados en la realización del TP.

La necesidad de aceptar un método estandarizado en el reporte de TP ha sido reconocida por largo tiempo (13,17,18,26,27,29,30).

En 1977 el Comité de Expertos en Estandarización de Biológicos de la O.M.S. designo a una tromboplastina de origen humano como una preparación de referencia internacional (PIR 67/40). Con la finalidad de utilizar dicho material biológico en la calibración de otras tromboplastinas. (9,13,21,27,30,32).

El método de calibración aceptado fue el de Biggs y Denson, este método se baso en observaciones empíricas de cuadros clínicos de pacientes, usando dos tromboplastinas diferentes que conformaban una línea recta, graficando el cociente de protrombina de ambas, colocando los resultados de la tromboplastina de referencia en las abscisas y los resultados de la otra tromboplastina en el eje de las ordenadas denotando el origen en el punto (1,1) y no en cero debido a la relación de graficar

cocientes de protrombinas, obteniéndose de esta manera como única variable la pendiente b de la recta, considerándose como constante, obtenida de la ecuación.

$$Y-1=b(X-1) \dots\dots\dots 1$$

Donde X y Y son los valores de los cocientes de protrombina en el eje vertical y horizontal respectivamente. La O.M.S designo a la pendiente b como constante de calibración internacional (CCI) de la tromboplastina representada en el eje vertical (tromboplastina de trabajo), de esta manera la tromboplastina del eje vertical es la PIR. La CCI para la PIR 67/40 fue definida con un valor de 1.0.

Por lo que cualquier tromboplastina puede ser calibrada asignándole un valor de la CCI. Cualquier cociente de TP se puede convertir por modificación de la ecuación 1:

$$X=(Y-1)/b + 1 \dots\dots\dots 2$$

donde: CCI=b, Y=Cociente de protrombina, con la ecuación 2 el valor de X se obtiene de estos datos y se le designo como Cociente Internacional de calibración (CIC).

Debido a que la PIR no era suficiente para calibrar directamente todas las tromboplastinas se requirió la calibración de preparaciones de referencia secundaria las cuales podían ser utilizadas en lugar de la PIR primaria para calibrar preparaciones de trabajo (WRP). La determinación de la CCI de la preparación de trabajo en términos de la PIR secundaria se calcula por la ecuación 3.

$$CCI(w) = CCI(s) * b \dots\dots\dots 3 \quad (9,13).$$

CCI(w)=Constante de calibración internacional de la preparación de trabajo.

b(ws)=Pendiente obtenida de la preparación de trabajo.

CCI(s)=Constante de Calibración Internacional de la preparación Secundaria.

Este modelo provoco confusiones y errores estadísticos por tener los siguientes problemas:

- 1.-Es práctico, pero no es valido en todos los casos.
- 2.-Hay discrepancias cuando se comparan tromboplastinas de diferente sensibilidad, obteniéndose con ello una CCI diferente de 1.0, por lo que es improbable la relación entre los dos grupos de cocientes de TP que no pasan por el punto (1,1), originando una relación curva.

### 1.3.2 NUEVA TERMINOLOGIA E INVERSION DE LA RELACION DE CALIBRACION

El metodo de calibracion de Biggs y Denson fue revisado y modificado en la forma de trazar las graficas en lugar de representar cocientes de protrombina se trazan los resultados de TP sobre escalas logaritmicas. Se sugirio la inversion de la calibracion, esto es representar la PIR sobre el eje vertical y la tromboplastina de trabajo (WRP) sobre el eje horizontal) y para evitar confusiones de esquema modificados se adopto una nueva terminologia la cual es:

La CCI (Es decir la pendiente b) se llama ISI y denota ahora la pendiente C de la recta de calibracion en un diagrama de logaritmos de TP donde la PIR es representada sobre el eje vertical ISI=Indice de Sensibilidad Internacional

El Rango Internacional Normalizado (RIN) se utiliza para denotar el cociente de protrombina elevado a la ISI, utilizando la formula:

$$ISI \\ RIN=RP^{(13,14,15,17,18)}$$

### 1.3.3 CALIBRACION DE UNA TROMBOPLASTINA DE TRABAJO

Una tromboplastina de trabajo (WRP) es calibrada de la siguiente forma: La WRP se calibra con una cantidad suficiente de PIR similar. La calibracion consiste en realizar el Tiempo de Protrombina por el Metodo de Quick a 20 plasmas de donadores sanos y 60 de pacientes que reciben terapia con anticoagulantes orales por lo menos seis semanas y que ademas se encuentran estabilizados. Un paciente es estabilizado cuando el TP de dos muestras de plasmas de el mismo, obtenidas en no mas de 14 dias no difieren por mas del 20% en terminos de RIN. Los laboratorios que cuentan con un numero limitado de pacientes toman las muestras independientemente de los niveles de anticoagulacion, pero eligiendo muestras diferentes para trabajarlas. (9,13,17,18,26,27,30,32).

La calibracion se realiza en diez dias de trabajo, efectuando ocho muestras al dia, la secuencia de las pruebas es indicada de acuerdo al esquema 3.1 con numero romanos.

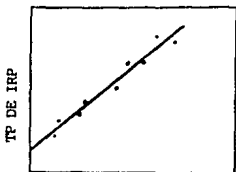
Muestra	IRP	WRP
Normal 1	I	II
Paciente 1	III	IV
Paciente 2	V	VI
Paciente 3	VII	VIII
Paciente 4	IX	X
Paciente 5	XI	XII
Paciente 6	XIII	XIV
Normal 2	XV	XVI

### ESQUEMA 3.1

Las precauciones que se deben tomar en cuenta son principalmente: En la obtención de la muestra evitar la contaminación con fluidos tisulares y la hemólisis. La PIR de tromboplastina debe ser la apropiada y la ampollita debe de reconstituirse de acuerdo a las especificaciones de la misma, no se deben de usar los reconstituidos despues de 2 horas.

En la calibración de una tromboplastina de trabajo las determinaciones simples son preferibles a las determinaciones por duplicado, debido a que es importante minimizar la duración total del procedimiento, los resultados son graficados en una escala logarítmica donde el TP de la IRP se representa en el eje de las ordenadas y el TP de la WRP se representa en la abscisas.

Como se observa en la gráfica 3.1 de calibración.



Línea de Calibración  
el ISI se define como la  
pendiente de esta recta.

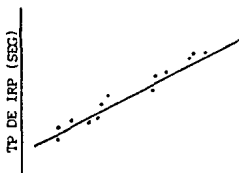
GRAFICA 3.1 TP DE WRP (8,13)

La calibración de una tromboplastina de trabajo es más precisa cuando las comparaciones son hechas entre preparaciones similares de la misma especie.

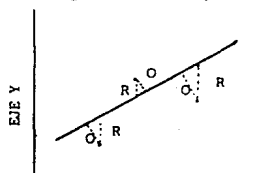
La imprecisión estadística del ISI de la WRP esta compuesta no solo por la variación estadística en la calibración y obtención de la pendiente C, si no también en el error de la calibración de la preparación de referencia (PIR).

### 1.3.4 DESGLOCE ESTADISTICO

El ISI de la tromboplastina de trabajo es obtenido por la pendiente C de las dos tromboplastinas usando una escala logarítmica en ambos ejes, se utiliza el método de la regresión ortogonal, por este método los puntos se ajustan como la suma del cuadrado de sus desviaciones en forma perpendicular a la recta de ajuste minimizando de esta manera la distancia que los separa a dicha recta. Si se compara con una regresión lineal ordinaria en la cual los puntos dispersos se ajustan como la suma del cuadrado de sus desviaciones en forma vertical a la recta de ajuste, como lo demuestran las gráficas 3.2 y 3.3.



TP DE IRP (SEG)  
TP DE WRP (SEG)  
GRÁFICA 3.2



EJE Y  
EJE X  
GRÁFICA 3.3

Las formulas empleadas para calcular el ISI de la tromboplastina de trabajo de acuerdo al método de la regresión ortogonal són:

$$C(IRP, WRP) = m \cdot (m^2 + 1)^{1/2}$$

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

$LPT_{IRP}$  = Logaritmo del Tiempo de protrombina individual utilizando la preparación de referencia internacional.

$\overline{LPT}_{IRP}$  = Media de los logaritmos de los tiempos de protrombina individuales usando la preparación de referencia internacional.

$LPT_{WRP}$  = Logaritmo del tiempo de protrombina individual usando la preparación de referencia de trabajo.

$\overline{LPT}_{WRP}$  = Media de los logaritmos de los tiempos de protrombina individuales usando la preparación de referencia de trabajo.

El índice de Sensibilidad internacional de la tromboplastina de trabajo (WRP) se calcula de la siguiente forma:

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

El error estandar (S.E.) de el  $ISI_{WRP}$  se calcula de la siguiente forma:

$$SE(ISI_{WRP}) = ISI_{IRP} \cdot SE(C_{IRP, WRP})$$

Donde :

$$SE(C_{IRP, WRP}) = \left( \frac{(1+C)^2 \cdot U + VC}{nU^2} \right)^{1/2}$$

Donde : n = Es el número total de plasmas

$$C = \frac{C_{IRP, WRP}}{LPT_{IRP}} \cdot \frac{(LPT_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})}{n}$$

$$U = \frac{\sum (LPT_{IRP} - LPT_{WRP})^2 - C (LPT_{IRP} - LPT_{WRP}) (LPT_{WRP} - \overline{LPT}_{WRP})}{(n - 2)}$$

El coeficiente de variación del ISI de la tromboplastina de trabajo se calcula:

$$CV(ISI_{WRP}) = 100 \cdot SE(ISI_{WRP}) / ISI_{WRP}$$

Tabla No.3.2 Rangos terapéuticos en un centro de trombosis en 1985.

Padecimiento	RIN	
	medio	rango
Prevención primaria de trombosis venosa (pre y posoperatorio)	2.0	1.5-2.5
Prevención secundaria de trombosis venosa	3.0	2.0-4.0
Trombosis venosa activa y embolismo pulmonar	<60 años	3.5 3.0-4.5
Prevención de tromboembolismo arterial, incluyendo válvulas cardíacas artificiales	>60 años	4.0 3.5-5.0
Trombosis arterial (coronarias)		

(18, 27, 28, 31, 32)

Estos rangos son dados en función del riesgo relativo de las complicaciones debidas a sangrado y/o a complicaciones de la trombosis misma (muy peligrosa por ejemplo en trombosis cerebral, o cardíaca, mientras que de bajo riesgo relativo por ejemplo en trombosis de extremidades inferiores y/o superiores).

Las limitantes mas grandes del RIN son segun algunos autores :

- Que existe una variación entre los laboratorios de la forma de observar el punto final de la prueba (con metodos manuales y automatizados).
- Que tromboplastinas de ISI superiores de 1.4 originan más imprecisión en el reporte del RIN.
- Que la calibración de las tromboplastinas de trabajo se realice con tromboplastinas de referencia del mismo origen. (18, 20, 25)

Muchos laboratorios no usan el RIN como medida del reporte del TP de pacientes con terapia de anticoagulantes orales, porque involucra un cálculo matemático con potencias decimales, por lo que varios laboratorios incluyen en sus reactivos nomogramas o tablas de conversión directa en la que busca de acuerdo al cociente de protrombina y al ISI específico del lote de la tromboplastina utilizada para llevar a cabo la prueba, el RIN es obtenido de forma directa, lo anterior se muestra en la tabla 3.3 y la grafica 3.4 a continuación . (17, 26, 30, 32).



### RANGO INTERNACIONAL NORMALIZADO

En 1983 la Organización Mundial de la Salud público las recomendaciones para normalización del control de pacientes con terapia de anticoagulantes orales del tiempo de protrombina. El denominador común es el índice de sensibilidad internacional (ISI) de una tromboplastina, obtenido por la medida de la calibración de la tromboplastina, usando como referencia una tromboplastina internacional de referencia, así mismo tiempo después se crearon tromboplastinas de referencia secundarias para calibrar con ellas las tromboplastinas de trabajo. (9,27,28,30)

Como se observa en la tabla No.3.1 a continuación

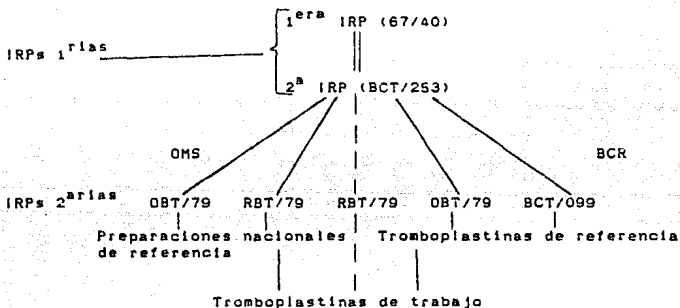
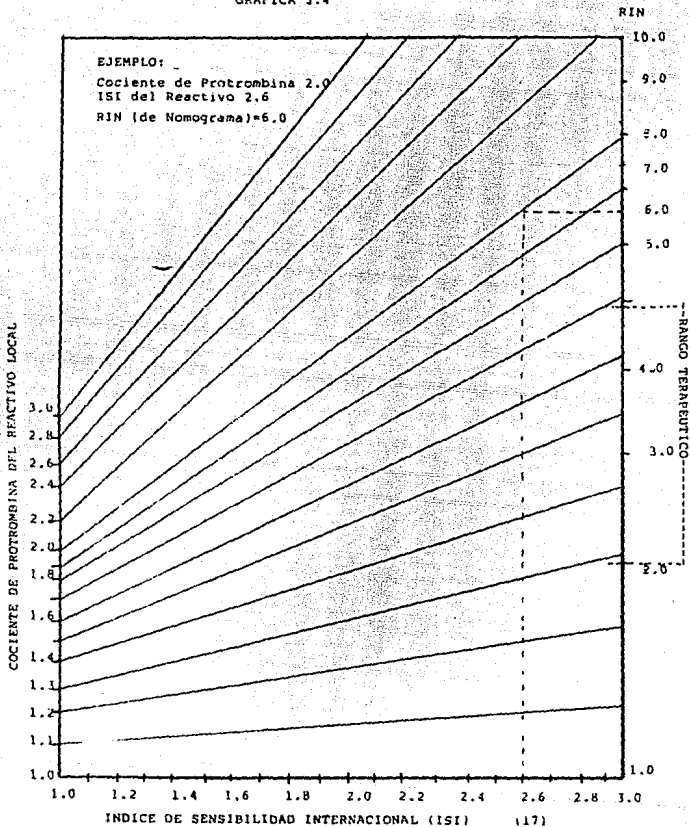


Tabla 3.1

Con este índice (el ISI) se puede calcular otro que es el Rango Internacional Normalizado (RIN) utilizando el cociente de protrombina (el cual se discutió arriba). Este índice fue adoptado por la OMS como medida estándar del TP para el control de la terapia con anticoagulantes del tipo de la warfarina.

Algunos autores establecen que deben fijarse límites estrechos de RIN para padecimientos específicos, esto se muestra en la tabla No.3.2 .

GRAFICA 3.4





## 2. FUNDAMENTO DE LA ELECCION DEL TEMA

En la ENEP Zaragoza se han realizado con anterioridad investigaciones sobre la producción de tromboplastina tisular liofilizada de cerebro de conejo.

Se ha elegido este tema de tesis para producir y evaluar el control de calidad de dicho producto con la finalidad de contar con un reactivo que se obtenga de acuerdo a la infraestructura de la ENEP Zaragoza y que al ser probado se resultados confiables para que pueda ser utilizado en el desarrollo de prácticas docentes de la carrera de QFB y para el servicio comunitario en las clínicas multidisciplinares de esta institución y así evitar se compre este reactivo, que aparte de tener un alto costo es un reactivo de importación con logros de crear la tecnología para su fabricación nacional.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la dificultad actual de adquirir reactivos biológicos para la realización de las prácticas docentes en la UNAM y de la carrera de QFB de la ENEP Zaragoza se elabora este proyecto en el cual se realizará la estandarización de las técnicas de obtención así como la adaptación de las especificaciones establecidas por la OMS para el control de calidad de tromboplastinas comerciales con la finalidad de usarlo en forma rutinaria en las clínicas multidisciplinarias y en prácticas docentes.

De tal forma que dicho producto de resultados comparables con los reactivos comerciales.

#### 4. OBJETIVOS :

- Montar una técnica estandarizada de obtención y liofilización de lotes para la producción de tromboplastina de cerebro de conejo.

- Realizar el control de calidad de la tromboplastina tisular liofilizada de cerebro de conejo en referencia a las especificaciones de contenido de hemoglobina, control microbiológico y calibración

- Evaluar la actividad del tiempo de protrombina en plasmas de pacientes con diagnóstico de Cirrosis Hepática Alcohólica Nutricional (CHAN).

- Cálculo del Rango Internacional Normalizado (RIN) en pacientes con tratamiento de anticoagulantes orales.

#### **5. HIPOTESIS :**

**El producto terminado cumplirá con las especificaciones del control de calidad lo cual se reflejará en la evaluación del tiempo de protrombina dando resultados comparables o semejantes al reactivo comercial utilizado como estandar.**

- Plasma humano fresco
- Cerebros de conejo de 24-48 horas post-mortem.

**EQUIPO :**

- Liofilizadora Labconco GCA.
- Baño metabólico Presición científico
- Homogenizador de tejidos s/m
- Balanza analítica Mettler H60
- Refrigerador Phillips
- Estufa HDP Mod 334
- Centrifuga Sol-Bat
- Cronómetro s/m
- Vortex GENLE
- Engargoladora de viales S/M
- Parrilla eléctrica THERMOLYNE
- Equipo de destilación PYREX
- Microscopio ZEISS
- Autoclave
- Bombas de vacío Fell Welch Mod. 1410

**MATERIAL GENERAL :**

- Tijeras
- Papel filtro
- Mortero con pistilo
- Desecador
- Pipetas graduadas
- Vasos de precipitado
- Pipetas graduadas de 0.2 ml, 1.0 ml, 5.0 ml y 10 ml.
- Espátula
- Ligadura
- Jeringas de 5 ml estériles
- Pipetas pasteur
- Tapones de aluminio para engargolar
- Gradillas
- Algodón
- Termómetro
- Asa bacteriológica
- Embudo de vidrio
- Frascos viales
- Tubos de ensayo
- Cajas de petri
- Etiquetas
- Mechero de Bunsens
- Frascos gotero
- Matraces aforados

**REACTIVOS :**

- Cloruro de sodio
- Cloruro de calcio
- Etanol
- Acetona



## REACTIVOS :

- Cloruro de sodio
- Cloruro de calcio
- Etanol
- Acetona
- Medios de cultivo: EMB, ASC 5%, Sal-manitol, PDA.

## SOLUCIONES :

- Solución salina isotónica
- Solución de citrato de sodio 0.0109 M
- Solución de cloruro de calcio 0.02 M
- Mezcla frigorífica (hielo seco-acetona)

## METODOLOGIA :

### I : EXTRACCIÓN DE LA TROMBOPLASTINA DE CEREBRO DE CONEJO CON ACETONA.

- 1.- Obtención de las cabezas de conejo de no más de 24 horas postmortem.
- 2.- Abrir las cabezas y extraer el cerebro.
- 3.- Enjuagar los cerebros para eliminar la mayor cantidad de sangre.
- 4.- Eliminar las meninges y vasos capilares con ayuda de agujas de disección.
- 5.- Pasar los cerebros.
- 6.- Depositar los cerebros en un mortero y adicionar acetona, macerar con el pistilo.
- 7.- Eliminar la acetona por decantación y adicionar más disolvente.
- 8.- Repetir los pasos anteriores hasta la obtención de hojuelas.
- 9.- Colocar las hojuelas en un vaso de precipitados y adicionar acetona hasta cubrirías, colocar el vaso en el homogenizador de tejidos durante un minuto y decantar la acetona.
- 10.- Depositar los residuos sólidos sobre papel filtro y dejar secar por 30 minutos (hasta que no se perciba aroma de acetona).
- 11.- El polvo obtenido se guarda en papel filtro dentro de una caja de petri y a 4°C.

### II : OBTENCIÓN DEL EXTRACTO LIQUIDO DE TROMBOPLASTINA POR EXTRACCIÓN SALINA.

- 1.- Pesar 0.5 g de polvo y depositarlos en 10 ml de solución salina isotónica agitando por 3 minutos.
- 2.- Colocar el tubo en baño metabólico a 37°C por una hora agitando cada 5 minutos durante un minuto en el bortex.
- 3.- Dejar sedimentar por 30 minutos.
- 4.- Separar el sobrenadante con pipeta pasteur y guardarlo en refrigeración.

### III : EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO LIQUIDO MEDIANTE EL TIEMPO DE PROTROMBINA POR EL METODO DE QUICK

- 1.- Obtención de la muestra de plasma citratado
  - 1.1.- Extraer 5 ml de sangre con jeringa desechable.
  - 1.2.- Colocar 4.5 ml de sangre en un tubo que contenga 0.5 ml de citrato de sodio 0.0109 M.
  - 1.3.- Agitando suavemente para que se mezcle.
  - 1.4.- Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.
- 2.- Tiempo de protrombina por el método de Quick.
  - 2.1.- Preparar el baño metabólico a 37°C.
  - 2.2.- Calcificar la tromboplastina líquida adicionando un volumen igual de cloruro de calcio 0.02 M y agitar la mezcla.
  - 2.3.- Incubar la tromboplastina preparada por 15 minutos.
  - 2.4.- Medir 0.1 ml de plasma e incubarlo por 2 minutos.
  - 2.5.- Medir 0.2 ml de tromboplastina y adicionarla al plasma accionando en ese instante el cronómetro, agitar por 6 segundos dentro del baño, sacar el tubo e inspeccionar la aparición de los primeros hilos de fibrina, deteniendo el cronómetro en ese instante.

### IV : LIOFILIZACION DEL EXTRACTO LIQUIDO EN FRASCOS VIALES

- 1.- A cada 10 ml del extracto líquido adicionar 0.1 g de leche descremada en polvo, agitando con el vortex para que se disuelva.
- 2.- Colocar 1.0 ml de la solución en frascos viales ambar de 10 ml.
- 3.- Tapar los viales con el adaptador e introducirlos en la mezcla frigorífica de hielo seco-acetona (1:3), girar rápidamente el vial para formar una mampaca fina y uniforme por toda la pared del frasco.
- 4.- Quitar rápidamente el adaptador y colocar el frasco en una de las entradas de la liofilizadora.
- 5.- Liofilizar por una hora y media.
- 6.- Una vez terminado el proceso retirar los frascos de las entradas de la liofilizadora y engargolarlos.
- 7.- Identificar cada uno de los frascos viales, indicando: lote, fecha de fabricación, producto y cantidad de solvente con la que será rehidratado.

**V : EVALUACION DEL PRODUCTO LIOFILIZADO MEDIANTE EL TIEMPO DE PROTROMBINA POR EL METODO DE QUICK.**

- 1.- Hidratar cada vial con la cantidad de solvente indicada en la etiqueta, adicionar el mismo volumen de la solución de cloruro de calcio 0.02 M.
- 2.- Realizar el tiempo de protrombina (TP) por el método de Quick.

**VI : CURVAS DE ACTIVIDAD DE LA TROMBOBLASTINA LIOFILIZADA.**

- 1.- Hidratar los viales de tromboplastina con un ml. de agua destilada estéril y con un ml. de solución de cloruro de calcio 0.02 M.
- 2.- Hacer un pool de plasmas frescos con citrato de sodio como anticoagulante, obtenido de 5 donadores sanos.
- 3.- Realizar diluciones de acuerdo al siguiente cuadro :

Dilucion del plasma                      Porcentaje de actividad

No diluido	100
1+1	50
1+3	25
1+7	12.5
1+9	10

- 4.- Las diluciones se realizan con solución salina isotónica preparando la dilución inmediatamente antes de utilizarse para la prueba de TP.
- 5.- Realizar el TP de cada dilución cinco veces.

**VII : CALIBRACION DE LA TROMBOPLASTINA POR EL METODO DE BIGGS Y DENSON.**

- 1.- Obtener 80 muestras de plasma citratado, de los cuales 20 son de individuos sanos y 60 son de pacientes que reciben terapia con anticoagulantes orales.
- 2.- La calibración se realiza en diez días de trabajo, efectuando ocho pruebas al día, de acuerdo al siguiente esquema de trabajo.

	Tromboplastina de referencia	Tromboplastina de trabajo
Normal 1	1	2
Paciente 1	3	4
paciente 2	5	6
Paciente 3	7	8
Paciente 4	9	10
Paciente 5	11	12
Paciente 6	13	14
Normal 2	15	16

3.- La misma persona debe de realizar los tiempos de protrombina durante todo el esquema de calibración.

#### VIII : EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE LA TROMBOPLASTINA LIOFILIZADA EN PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE CHAN.

- 1.- Obtener 25 muestras de plasmas citratado de pacientes con cirrosis hepatico-alcoholica-nutricional.
- 2.- Realizar el TP a cada muestra utilizando una tromboplastina comercial de referencia y la tromboplastina liofilizada.

#### IX : CONTROL MICROBIOLOGICO .

- 1.- Rehidratar tres viales de cada lote con un ml. de agua destilada estéril cada uno.
- 2.- Mezclar los tres viales en condiciones de esterilidad .
- 3.- Tomar una asada de cada lote y sembrar por estria de aislamiento en cada uno de los siguientes medios Agar sal-Manitol, Agar EMB, y agar PDA.
- 4.- Incubar las cajas de sal-Manitol y EMB a 37°C y el agar PDA a 25°C por 24 o 48 horas. (descartar la caja de PDA solo en el caso de que no haya crecimiento aparente al cabo de una semana)
- 5.- En caso de que exista crecimiento en los medios de cultivo,debera hacerse la identificación del microorganismo.

#### X : DETERMINACION DE HEMOGLOBINA

##### I : PREPARACION DE LA COLUMNA :

- 1.1.-Pesar la cantidad nesecaria de gel Sephadex G-100.
- 1.2.-Hidratar en solución de PBS pH 7.2 durante 80 horas a temperatura ambiente
- 1.3.-Dearear la suspensión con ayuda de la bomba de vacío para eliminar burbujas.
- 1.4.-Empaquetar la columna, evitando la formación de burbujas.
- 1.5.-Permitir que la columna se empaquete del todo eluyendola con PBS pH 7.2 por unas 24 horas.

##### CALIBRACION DE LA COLUMNA

##### 1.-DETERMINACION DEL VOLUMEN DE EXCLUSION.

- 1.-Colocar 1.0 ml de Azul de Dextran al 0.1 % con ayuda de una pipeta Pasteur en la superficie de la columna.

- 1.2.- Eluir la muestra con PBS pH 7.2
- 1.3.- Colocar un tubo graduado y recolectar el volumen hasta que salga la primera gota de colorante (volumen de exclusión).
- 1.4.- Cambiar el tubo y recolectar hasta la última gota de colorante.

#### II: CALIBRACION CON ALBUMINA HUMANA

- 2.1.- Colocar 1 ml de albumina al 0.1% preparada en PBS a pH 7.2 en la superficie de la columna.
- 2.2.- Eluir la muestra con PBS pH 7.2 .
- 2.3.- Colectar los eluatos con ayuda de un colector de fracciones.
- 2.4.- Efectuar las lecturas de las fracciones al espectrofotometro a una longitud de onda de 280 nm. (region de absorcion de proteinas).

#### III: CALIBRACION CON ALBUMINA DE HUEVO

#### IV : CALIBRACION CON INHIBIDOR DE TRIPSINA

- 4.1.- Proceder como en el paso II

#### V : PREPARACION DE LA MUESTRA DE HEMOGLOBINA

- 5.1.- Obtener hemoglobina a partir de sangre fresca, lisisando las células con un volumen igual de agua destilada.
- 5.2.- Centrifugar la muestra a 5000 RPM durante 20 min y separar el sobrenadante.
- 5.3.- Preparar la muestra con 2 ml del sobrenadante y 10 ml de azida de sodio 0.01 M.
- 5.4.- Colocar un ml de la muestra (de hemoglobina) en la superficie de la columna y eluir con PBS pH 7.2 .
- 5.5.- Colectar los eluatos en un colector de fracciones calibrado a 30 gotas para el cambio de tubo.
- 5.6.- Efectuar las lecturas de las fracciones a 280 nm con ayuda de un espectrofotometro adecuado, usando PBS pH 7.2 como blanco.

#### VII : CURVA DE CALIBRACION

- 7.1.- Grafique sobre papel milimetrico en las abscisas la fraccion de maxima absorcion para cada proteina contra el logaritmo de su peso molecular en las ordenadas.

#### VIII : CUANTIFICACION DE HEMOGLOBINA EN LA TLCC.

- 8.1.- Rehidrate tres viales (de 1 ml.) de cada lote de tromboplastina con la cantidad adecuada de agua destilada esteril.
- 8.2.- Mezcle los viales de cada lote y centrifugue las muestras a 5000 RPM durante 30 min.

8.3.- Separe el sobrenadante de cada lote y centrifugue nuevamente, hasta que no aparezca botón al centrifugar las muestras.

8.4.- Tome 1 ml de un lote y colóquelo en la superficie de la columna con ayuda de una pipeta Pasteur larga con punta doblada en escuadra (90°).

8.5.- Eluya la muestra con PBS pH 7.2.

8.6.- Colecte las fracciones en un colector calibrado a 30 gotas para el cambio de tubo, colecte unos 100 tubos.

8.7.- Efectue las lecturas de las fracciones a 280 nm con ayuda de un espectrofotómetro adecuado.

8.8.- Grafique en las abscisas volumen de elución contra extinción en las ordenadas.

8.9.- Repita los pasos 4 a 8 para los lotes restantes.

8.10.- Colectar en un tubo las fracciones que poseen hemoglobina de cada lote y cuantificarla por el método de Drabkin.

8.11.- Realizar los cálculos necesarios para determinar la cantidad de hemoglobina por vial.

## 7. RESULTADOS

### RESULTADOS DE LA CURVA DE DILUCION TROMBOREL S LOTE No.505662A

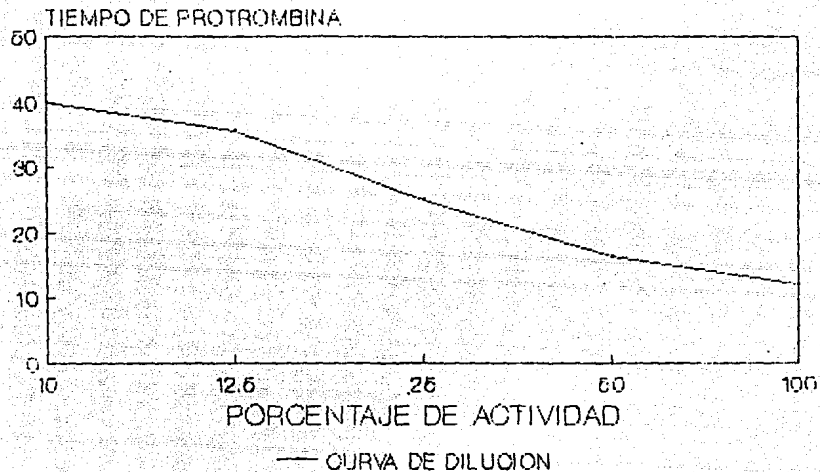
% DE ACTIVIDAD	PRUEBA DE TP (seg)	TP PROM. (seg)
100	12, 12, 12, 12, 12	12.0
50	16, 17, 17, 16, 5, 16	16.4
25	25, 25, 25, 25, 25	25.0
12.5	35, 36, 35, 35, 36	35.5
10	39, 41, 40, 40, 41	40.0

TABLA DE PORCENTAJE DE ACTIVIDAD CONTRA SEGUNDOS DE TP

SEG	%	SEG	%
>12.0	<100	20.0	37.0
12.0	100	21.0	34.0
12.5	90.0	22.0	31.0
13.0	85.0	23.0	29.0
13.5	78.0	24.0	27.0
14.0	73.0	25.0	25.0
14.5	68.0	26.0	23.0
15.0	65.0	27.0	21.0
15.5	60.0	28.0	20.0
16.0	57.0	29.0	18.5
16.5	54.0	30.0	17.5
17.0	51.0	31.0	16.5
17.5	48.0	32.0	15.5
18.0	46.0	33.0	14.5
18.5	43.0	34.0	13.5
19.0	41.0	35.0	13.0
19.5	39.0	36.0	12.0

TABLA 7.1

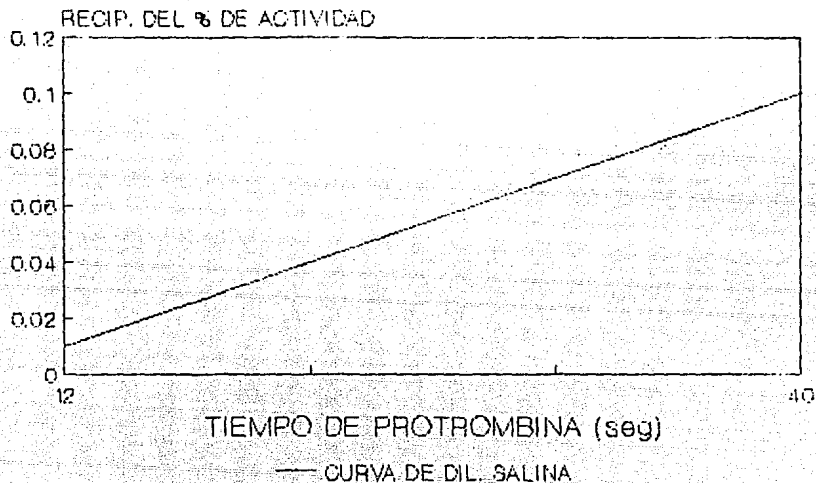
# CURVA DE ACTIVIDAD TROMBOREL S



GRAFICA 7.1



CURVA DE ACTIVIDAD DEL TROMBOREL S  
LOTE 606662A



GRAFICA 7.2

**RESULTADOS DE LAS CURVAS DE DILUCION  
TTL LOTE 1**

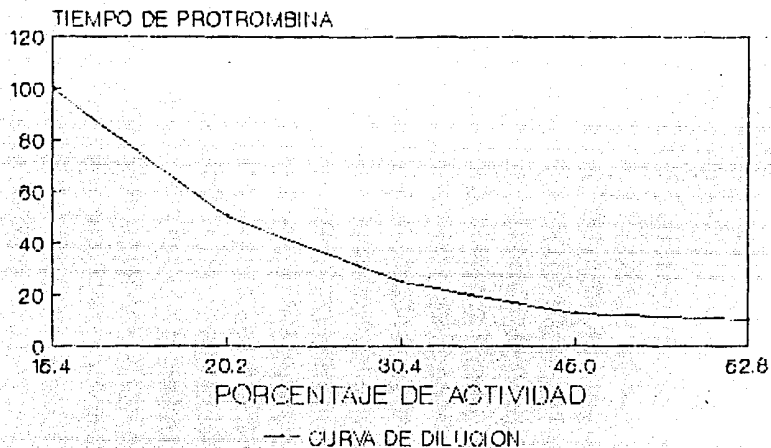
<b>% DE ACTIVIDAD</b>	<b>PRUEBA DE TP (SEG)</b>	<b>TP PROM (SEG)</b>
100	15, 16, 15, 15, 16	15.4
50	19, 20, 22, 20, 20	20.2
25	30, 30, 31, 30, 31	30.4
12.5	43, 46, 46, 46, 44	45.0
10	55, 53, 53, 53, 52	52.8

**TABLA DE % DE ACTIVIDAD CONTRA SEGUNDOS DEL TP**

<b>SEG</b>	<b>%</b>	<b>SEG</b>	<b>%</b>
<15.5	>100	25.5	30.8
15.5	100	26.0	28.7
16.5	94.6	26.5	28.7
17.0	84.8	27.0	26.8
17.5	76.9	27.5	26.0
18.0	70.4	28.0	25.2
18.5	64.8	29.0	24.6
19.0	60.1	29.5	23.7
19.5	56.0	30.0	23.1
20.0	52.2	30.5	22.4
20.5	49.3	31.0	21.8
21.0	46.5	31.5	21.3
21.5	44.0	32.0	20.7
22.0	41.8	32.5	20.2
22.5	38.8	33.0	19.7
23.0	37.9	33.5	19.3
23.5	36.3	34.0	18.8
24.0	34.7	34.5	18.4
24.5	33.4	35.0	18.0
25.0	32.0	35.5	17.6

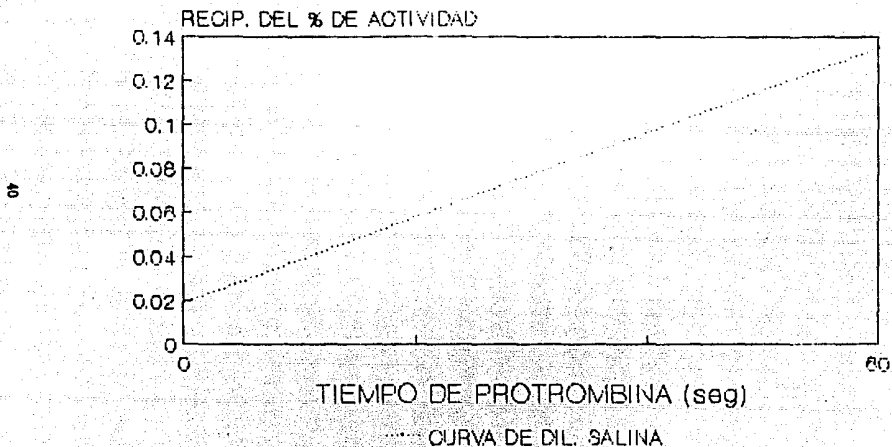
**TABLA 7.2**

# CURVA DE ACTIVIDAD DE LA TTL LOTE 1



GRAFICA 7.3

# CURVA DE ACTIVIDAD DE LA TTL LOTE 1



GRAFICA 7.4

RESULTADOS DE LAS CURVAS DE DILUCION  
TTL LOTE 2

% DE ACTIVIDAD	PRUEBA DE TP (SEG)	TP PROM. (SEG)
100	14, 13, 14, 14, 14	13.8
50	20, 19, 20, 20, 20	19.8
25	30, 32, 28, 30, 30	30.0
12.5	54, 53, 52, 53, 53	53.0
10	55, 55, 54, 55, 56	55.0

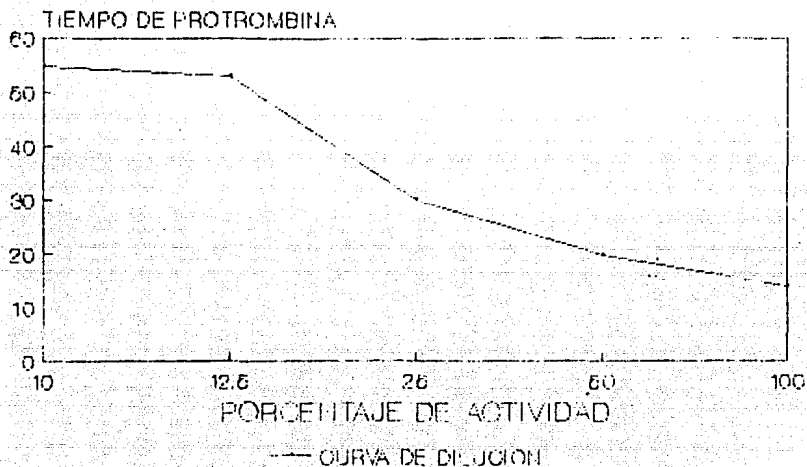
TABLA DE % DE ACTIVIDAD CONTRA SEGUNDOS DEL TP

SEG	%	SEG	%
<14.5	>100	23.5	35.6
14.5	100	24.0	34.4
15.0	92.0	24.5	33.2
15.5	84.5	25.0	32.1
16.0	77.8	25.5	31.1
16.5	72.1	26.0	30.1
17.0	67.2	26.5	29.3
17.5	62.9	27.0	28.4
18.0	59.1	27.5	27.6
18.5	55.8	28.0	26.9
19.0	52.8	28.5	26.1
19.5	50.1	29.0	25.1
20.0	47.7	29.5	24.8
20.5	45.5	30.0	24.2
21.0	43.5	30.5	23.6
21.5	41.6	31.0	23.1
22.0	39.9	31.5	22.6
22.5	38.4	32.0	22.0
23.0	36.9	32.5	21.6

TABLA 7.3

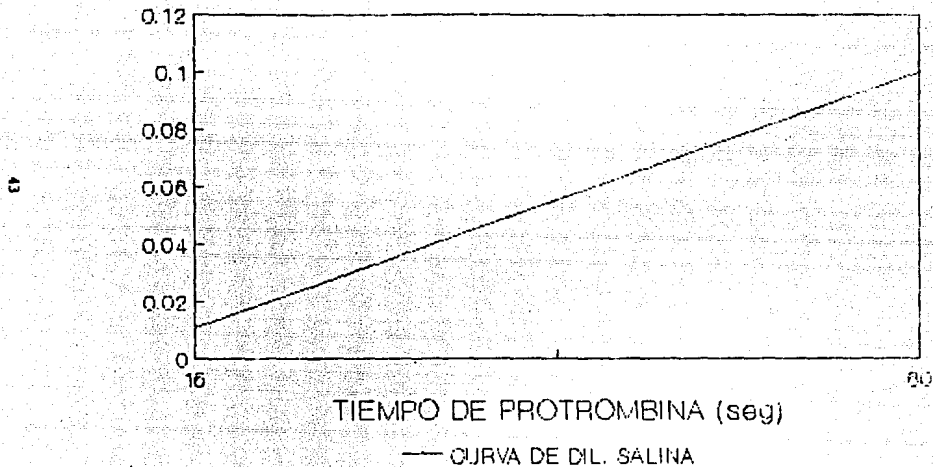
# CURVA DE ACTIVIDAD DE LA TTL

## LOTE 2



GRAFICA 7.5

# CURVA DE DILUCION DE LA TTL. LOTE 2



GRAFICA 7.6

**RESULTADOS DE LA CURVA DE DILUCION  
TTL LOTE 3**

<b>% DE ACTIVIDAD</b>	<b>PRUEBA DE TP (seg)</b>	<b>TP prom.(seg)</b>
100	13,13,13.2,13.8,14	13.40
50	22,21,21.4,22,21	21.48
25	23,23,23,23,23	23.0
12.5	49,51,49,53,50	50.4
10	66,68,63,66,66	65.8

**TABLA DE PORCENTAJE DE ACTIVIDAD CONTRA SEUNDDOS DEL TP**

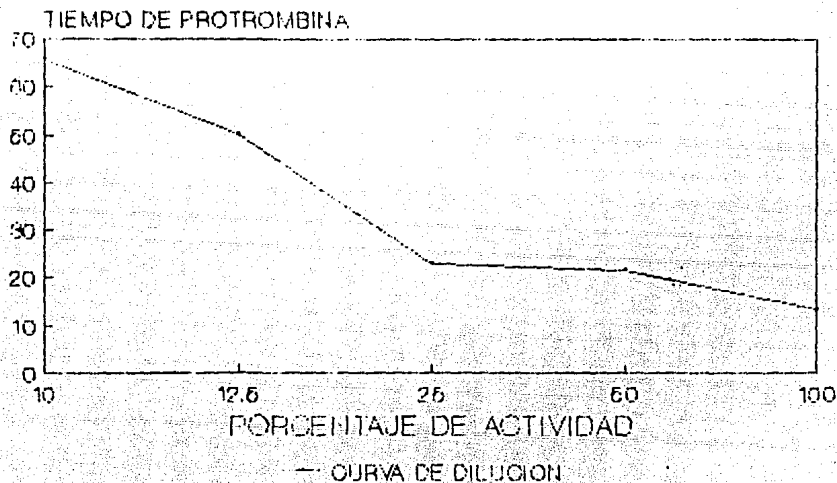
<b>SEG</b>	<b>%</b>	<b>SEG</b>	<b>%</b>
<11.5	>100	22.0	35.5
11.5	100	22.5	34.6
12.0	91.7	23.0	33.6
12.5	85.0	23.5	32.6
13.0	79.3	24.0	31.8
13.5	74.2	24.5	30.9
14.0	69.8	25.0	30.1
14.5	65.8	25.5	29.1
15.0	62.3	26.0	28.6
15.5	59.2	26.5	27.9
16.0	56.3	27.0	27.3
16.5	53.7	27.5	26.7
17.0	51.4	28.0	26.1
17.5	49.2	28.5	25.5
18.0	47.2	29.0	24.9
18.5	45.4	29.5	24.4
19.0	43.6	30.0	23.9
19.5	42.1	30.5	23.4
20.0	40.6	31.0	23.0
20.5	39.2	31.5	22.6
21.0	38.0	32.0	22.1
21.5	36.8	32.5	21.7

**TABLA 7.4**



# CURVA DE ACTIVIDAD DE LA TTL

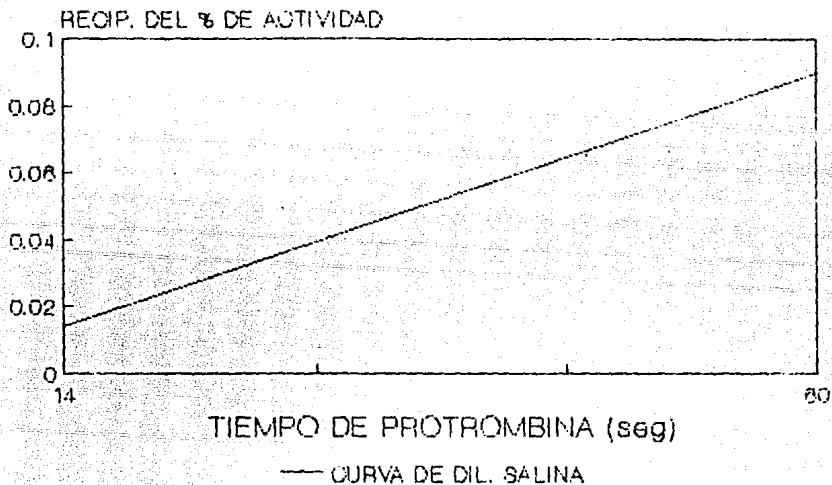
## LOTE 3



GRAFICA 7.7

# CURVA DE ACTIVIDAD DE LA TTL

## LOTE 3



GRAFICA 7.8

RESULTADOS DE LA CURVA DE DILUCION  
TTL LOTE 4

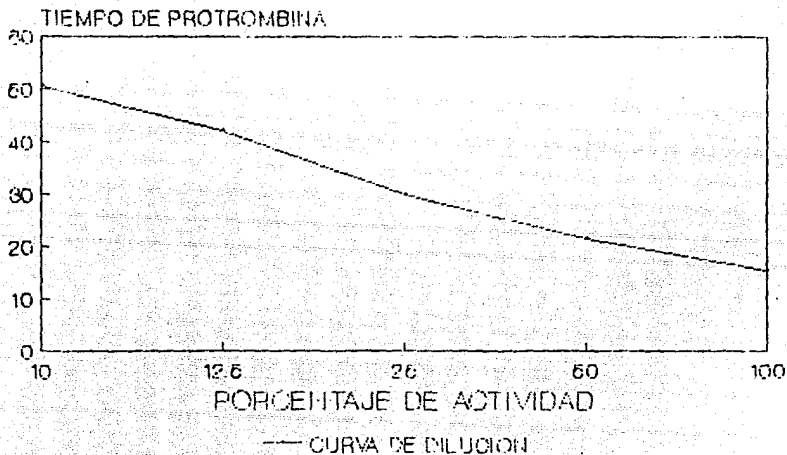
% DE ACTIVIDAD	FRUEBA DE TP (SEG)	TP PROM. (SEG)
100	16, 18, 15, 16, 15	15.4
50	21, 21, 22, 22, 21	21.4
25	31, 29, 29, 30, 31	30.0
12.5	41, 43, 43, 41, 43	42.5
10	52, 51, 49, 50, 51	50.6

TABLA DE % DE ACTIVIDAD CONTRA SEGUNDOS DE TP

SEG	%	SEG	%
<15.5	>100	25.0	31.6
15.5	100	25.5	30.3
17.0	96.7	26.0	29.2
17.5	85.7	26.5	28.1
18.0	76.9	27.0	27.1
18.5	69.8	27.5	26.1
19.0	63.6	28.0	25.2
19.5	58.8	28.5	24.4
20.0	54.6	29.0	23.6
20.5	50.9	29.5	23.0
21.0	47.7	30.0	22.3
21.5	44.8	30.5	21.6
22.0	42.3	31.0	21.0
22.5	40.0	31.5	20.5
23.0	38.0	32.0	20.0
23.5	36.2	32.5	19.9
24.0	34.5	33.0	18.9
24.5	33.0	33.5	18.4

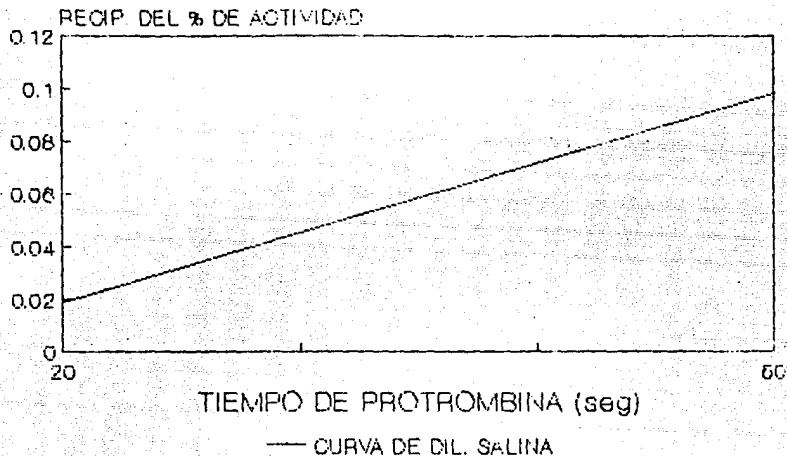
TABLA 7.5

# CURVA DE ACTIVIDAD DE LA TTL LOTE 4



GRAFICA 7.9

# CURVA DE ACTIVIDAD DE LA TTL. LOTE 4



GRAFICA 7.10

**RESULTADOS DE LA CURVA DE DILUCION  
TTL LOTE 5**

<b>% DE ACTIVIDAD</b>	<b>PRUEBA DE TP (seg)</b>	<b>TP PROM. (seg)</b>
100	13,13,13.2,13.2,12	12.88
50	20,19,19.8,20.2,20	19.80
25	32,31,30,31,31	31.00
12.5	45,47,46,46,47	46.20
10	57,60,61,62,61	60.60

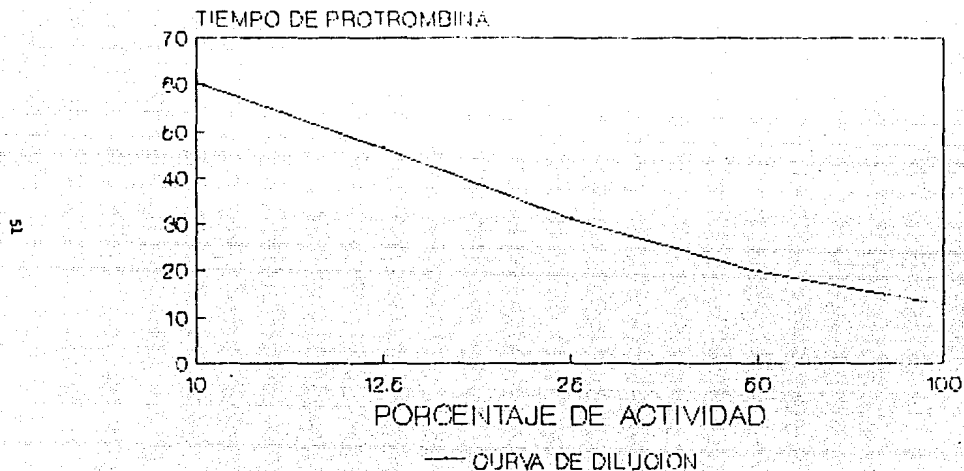
**TABLA DE PORCENTAJE DE ACTIVIDAD CONTRA SEGUNDOS DE TP**

<b>SEG</b>	<b>%</b>	<b>SEG</b>	<b>%</b>
<13.5	>100	23.5	34.4
13.5	100	24.0	33.3
14.0	88.0	24.5	32.2
14.5	89.4	25.0	31.2
15.0	82.1	25.5	30.3
15.5	75.8	26.0	29.8
16.0	70.6	26.5	29.4
16.5	66.0	27.0	27.8
17.0	61.9	27.5	27.0
17.5	58.4	28.0	26.4
18.0	55.1	28.5	25.4
18.5	52.3	29.0	25.0
19.0	49.7	29.5	24.4
19.5	47.4	30.0	23.8
20.0	42.5	30.5	23.3
20.5	43.3	31.0	22.8
21.0	41.5	31.5	22.3
21.5	39.9	32.0	21.8
22.0	38.4	32.5	21.3
22.5	36.9	33.0	20.9
23.0	35.7	33.5	20.5

**TABLA 7.8**

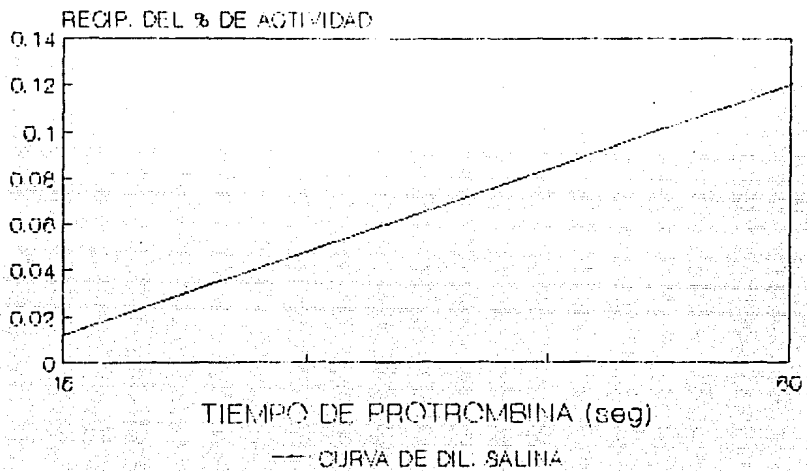
# CURVA DE ACTIVIDAD DE LA TTL

## LOTE 5



GRAFICA 7.11

# CURVA DE ACTIVIDAD DE LA TTL LOTE 5



GRAFICA 7.12



**CALIBRACION INDIRECTA DE LA TTL LOTE 1  
USANDO COMO REFERENCIA TROMBOREL S CON UN ISI=1.039  
LOTE No.505662A**

DIA	TIEMPO DE PRCTAJOMBINA				DIA
	WRP	b	JRP	b	
1	13	16	13	16	6
	26	29	19	24	
	19	22	17	19	
	24	26	35	39	
	21	24	31	33	
	20	24	20	24	
	25	27	60	50	
	14	15	15	18	
2	14	19	13	15	7
	16	20	21	23	
	25	29	27	32	
	21	27	25	30	
	41	42	32	32	
	19	25	29	35	
	23	24	24	29	
	14	16	12	15	
3	14	15	15	18	8
	25	25	27	33	
	29	31	35	40	
	23	26	45	47	
	16	17	44	46	
	23	26	34	35	
	38	39	29	31	
	14	15	14	15	
4	14	15	14	13	9
	32	34	69	81	
	32	34	41	43	
	21	23	42	41	
	21	22	19	20	
	28	29	19	19	
	27	28	18	18	
	13	14	15	15	
5	13	15	14	13	10
	39	39	23	22	
	22	24	22	22	
	24	27	17	17	
	21	25	24	21	
	45	29	35	33	
	23	25	32	30	
	14	15	15	15	

TABLA 7.7

**CALIBRACION INDIRECTA DE LA TTL LOTE 2  
USANDO COMO REFERENCIA TROMBOREL-S CON UN ISI=1.030  
LOTE No.505662A**

DIA	TIEMPO DE PROTROMBINA				DIA
	WRP	b	WRP	WRP	
1	13	15	13	16	6
	26	28	19	24	
	19	23	17	19	
	24	27	35	38	
	21	23	31	35	
	20	24	20	25	
	25	28	80	60	
2	14	18	15	17	7
	14	16	13	15	
	16	19	21	22	
	25	29	27	35	
	21	25	25	34	
	41	42	32	32	
	19	22	29	31	
3	23	25	24	30	8
	14	18	12	15	
	14	13	15	18	
	23	26	27	33	
	29	31	35	40	
	23	27	45	47	
	16	17	44	48	
4	23	26	34	36	9
	38	40	29	31	
	14	17	14	15	
	14	15	14	12	
	32	33	69	81	
	32	36	41	43	
	21	22	42	39	
5	21	22	19	19	10
	28	29	19	19	
	27	30	18	18	
	13	15	15	14	
	13	15	14	12	
	39	41	23	22	
	22	25	22	21	
5	24	27	17	17	10
	21	24	24	21	
	45	30	35	31	
	23	24	32	33	
	14	16	15	14	

**TABLA 7.8**

**CALIBRACION INDIRECTA DE LA TTL LOTE 3  
USANDO COMO REFERENCIA TROMBOREL S CON UN ISI=1.039  
LOTE No. 505862A**

DIA	TIEMPO DE PROTROMBINA				DIA
	WRP	b	WRP	b	
1	13	14	13	16	6
	26	26	19	14	
	19	23	17	21	
	24	26	35	40	
	21	24	31	35	
	20	23	20	25	
	25	29	60	59	
	14	17	15	17	
2	14	16	13	15	7
	16	19	21	22	
	25	29	27	36	
	21	25	25	31	
	41	42	32	35	
	19	22	29	35	
	23	25	24	34	
	14	18	12	14	
3	14	15	15	18	8
	23	26	27	33	
	29	30	35	40	
	23	27	45	50	
	16	16	44	49	
	23	26	34	35	
	38	40	29	30	
	14	15	14	15	
4	14	14	14	15	9
	32	32	69	82	
	32	34	41	43	
	21	23	42	42	
	21	23	19	21	
	28	31	19	24	
	27	32	16	19	
	13	15	15	15	
5	13	16	14	15	10
	39	43	23	23	
	22	24	22	25	
	24	27	17	19	
	21	23	24	26	
	45	30	35	32	
	23	28	32	32	
	14	15	15	15	

TABLA 7.9

**CALIBRACION INDIRECTA DE LA TTL LOTE 4  
USANDO COMO REFERENCIA TROMBOREL S CON UN ISI=1.039  
LOTE No.505662A**

DIA	TIEMPO DE PROTROMBINA				DIA
	WRP	b	WRP	b	
1	13	14	13	15	6
	26	28	19	22	
	19	23	17	21	
	24	28	35	37	
	21	24	31	35	
	20	24	20	24	
	25	29	60	59	
	14	16	15	15	
2	14	16	13	14	7
	18	19	21	23	
	25	30	27	31	
	21	28	25	32	
	41	40	32	30	
	19	24	29	34	
	23	24	24	35	
	14	18	12	16	
3	14	16	15	18	8
	23	26	27	33	
	29	31	35	41	
	23	27	45	45	
	16	17	44	50	
	23	26	34	36	
	38	42	29	34	
	14	16	14	15	
4	14	14	14	13	9
	32	33	69	82	
	32	34	41	45	
	21	23	42	41	
	21	22	19	23	
	28	30	19	21	
	27	30	18	21	
	13	15	15	13	
5	13	16	14	13	10
	39	42	23	23	
	22	25	22	25	
	24	28	17	21	
	21	24	24	26	
	45	42	35	31	
	23	27	32	30	
	14	16	15	13	

**TABLA 7.10**

CALIBRACION INDIRECTA DE LA TTL LOTE 5  
USANDO COMO REFERENCIA TROMBOREL S CON UN ISI=1.039  
LOTE No. 505662A

DIA	TIEMPO DE PROTROMBINA				DIA
	WRP	b	WRP	b	
1	13	16	13	16	6
	26	26	19	22	
	19	24	17	20	
	24	28	35	37	
	21	25	31	36	
	20	25	20	25	
	25	29	60	59	
	14	17	15	16	
2	14	16	13	15	7
	16	20	21	21	
	25	29	27	36	
	21	26	25	31	
	41	42	32	32	
	19	22	29	33	
	23	26	29	39	
	14	18	12	16	
3	14	16	15	16	8
	23	25	27	28	
	29	31	35	41	
	23	28	45	47	
	16	17	44	50	
	23	27	34	36	
	38	42	29	32	
	14	16	14	15	
4	14	14	14	12	9
	32	32	69	82	
	32	33	41	43	
	21	25	42	40	
	21	23	19	21	
	28	32	19	20	
	27	30	18	19	
	13	15	15	15	
5	13	17	14	12	10
	39	42	23	22	
	22	24	22	25	
	24	26	17	20	
	21	26	24	22	
	45	45	35	29	
	23	28	32	28	
	14	16	15	15	

TABLA 7.11

**AJUSTE DE LA GRAFICA DE DISPERSION POR MINIMOS CUADRADOS  
DE LA TTL LOTE 1**

**TABLA 7.12**

DIA	a	b	r <sup>2</sup>	Y=bX+a	P(x,y)	P(x,y)
1	5.8534	0.8673	0.8415	0.8673x+5.85	25,28.4	20,23.2
2	6.0554	0.8675	0.9490	0.8675x+6.05	16,20.3	19,22.9
3	1.1651	1.0147	0.9921	1.0147x+1.16	23,24.5	23,24.5
4	0.5012	1.0371	0.9962	1.0371x+0.50	32,33.7	28,29.5
5	11.039	0.5556	0.6910	0.5556x+11.03	39,32.7	45,36.0
6	8.4454	0.7401	0.9535	0.7401x+8.44	19,22.5	20,23.2
7	2.3968	1.0482	0.9318	1.0482x+2.39	21,24.4	29,32.8
8	2.8218	0.9976	0.9758	0.9976x+2.82	27,29.7	34,36.7
9	-3.8252	1.1840	0.9893	1.1840x-3.82	60,77.8	19,18.7
10	1.0104	0.9061	0.9844	0.9061x+1.01	23,21.8	35,32.7
$\Sigma 10$	2.8670	0.9539	0.9104	0.9539x+2.86	42,42.9	45,45.7

**AJUSTE DE LA GRAFICA DE DISPERSION POR MINIMOS CUADRADOS  
DE LA TTL LOTE 2**

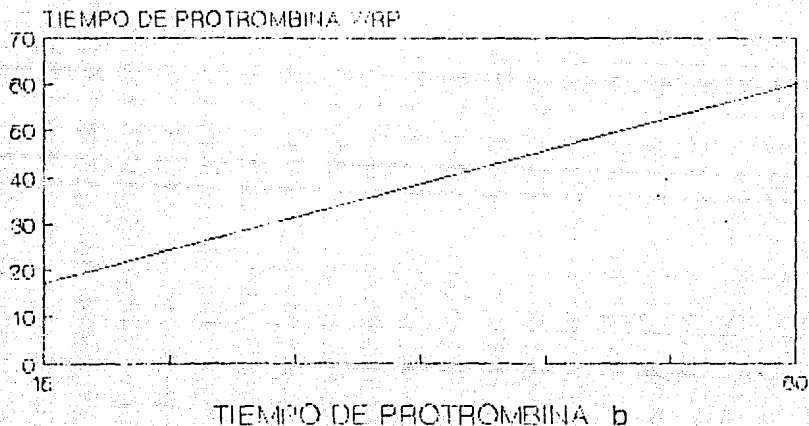
**TABLA 7.13**

DIA	a	b	r <sup>2</sup>	Y=bX+a	P(x,y)	P(x,y)
1	3.8669	0.9571	0.9633	0.9571x+3.86	26,28.7	20,23.0
2	2.8869	0.9763	0.9672	0.9763x+2.88	16,18.5	19,21.4
3	0.9042	1.0542	0.9711	1.0542x+0.90	23,25.1	23,25.1
4	0.4243	1.0564	0.9818	1.0564x+0.42	32,34.2	28,30.0
5	9.8302	0.6137	0.7177	0.6137x+9.83	38,33.7	45,37.4
6	4.5742	0.9400	0.9909	0.9400x+4.57	19,22.4	20,23.4
7	3.2500	1.0000	0.8328	1.0000x+0.83	21,24.3	29,32.3
8	2.2115	1.0300	0.9805	1.0300x+2.21	23,30.0	34,37.2
9	-4.9287	1.1949	0.9844	1.1949x-4.92	69,77.5	19,17.7
10	4.0877	0.7104	0.8608	0.7104x+4.08	23,20.4	35,28.9
$\Sigma 10$	1.6297	1.0033	0.9144	1.0033x+1.62	23,24.7	45,46.8

# CALIBRACION GLOBAL

## LOTE 1

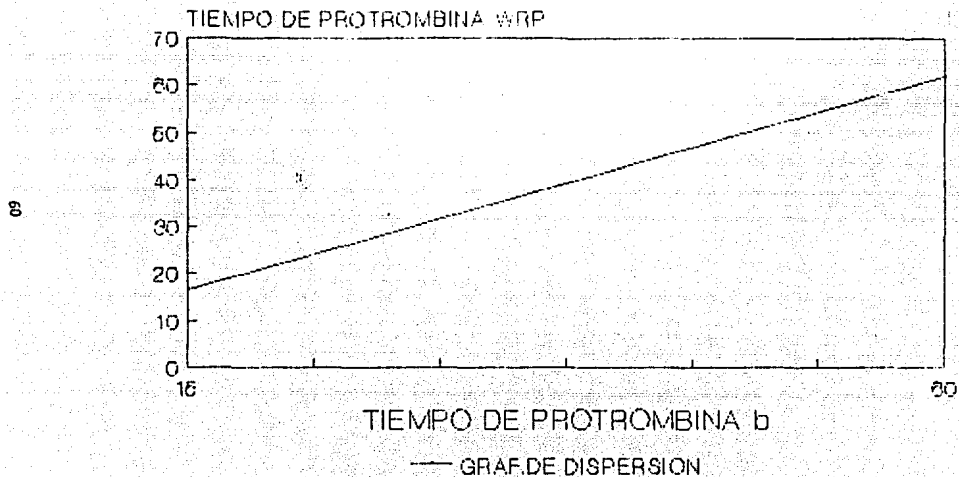
--- GRAF. DE DISPERSION



GRAFICA 7.16

# CALIBRACION GLOBAL

## LOTE 2



GRAFICA 7.14



**AJUSTE DE LA GRAFICA DE DISPERSION POR MINIMOS CUADRADOS  
DE LA TTL LOTE 3**

**TABLA 7.14**

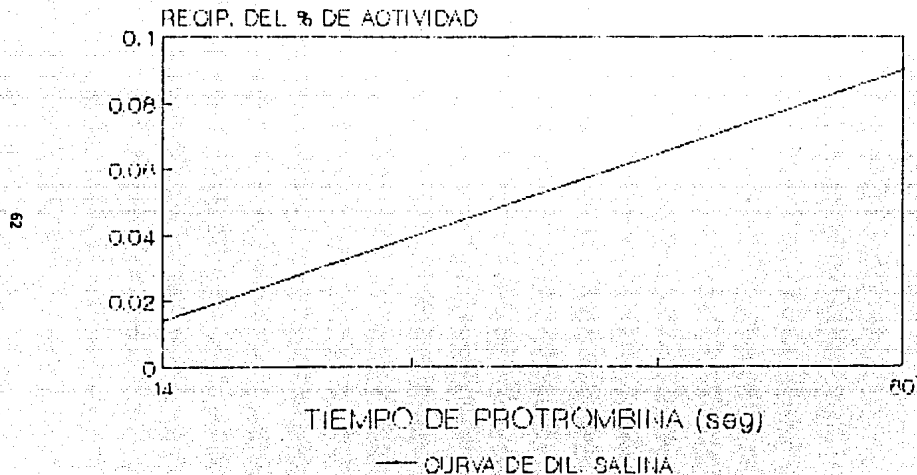
DIA	a	b	r <sup>2</sup>	Y=bX+a	P(x,y)	P(x,y)
1	2.8715	0.9816	0.9186	0.9816x+2.87	26,28.3	20,22.5
2	4.3610	0.9312	0.9868	0.9312x+4.36	16,19.3	19,22.0
3	0.8351	1.0851	0.9820	1.0851x+0.83	23,25.7	23,25.7
4	1.9397	1.0025	0.9561	1.0025x+1.93	32,34.0	28,30.0
5	4.4475	0.9274	0.9846	0.9274x+4.44	39,40.6	45,46.1
6	15.311	0.6062	0.5557	0.6262x+15.3	19,26.8	20,27.4
7	-0.2862	1.2256	0.8972	1.2256x-0.28	21,25.4	29,35.2
8	0.6984	1.0881	0.9787	1.0881x+0.69	27,30.0	39,43.1
9	-1.8371	1.1632	0.9632	1.1632x-1.83	69,78.4	19,20.3
10	3.8361	0.8495	0.9353	0.8495x+3.83	25,25.0	35,33.6
$\bar{X}$ 10	2.2501	1.0071	0.9216	1.0071x+2.25	16,18.3	45,47.6

**AJUSTE DE LA GRAFICA DE DISPERSION POR MINIMOS CUADRADOS  
DE LA TTL LOTE 4**

**TABLA 7.15**

DIA	a	b	r <sup>2</sup>	Y=bX+a	P(x,y)	P(x,y)
1	0.2552	1.1345	0.9676	1.1345x+1.25	26,27.5	20,22.9
2	6.4805	0.8501	0.9218	0.8506x+6.48	16,20.0	19,22.6
3	0.7340	1.0840	0.9918	1.0840x+0.73	23,25.6	23,25.6
4	0.6307	1.0423	0.9879	1.0423x+0.63	32,34.0	28,29.8
5	5.5160	0.8740	0.9688	0.8749x+5.51	39,39.6	45,44.9
6	3.9859	0.8383	0.9847	0.9383x+3.98	18,21.8	20,22.7
7	2.9892	1.0164	0.8725	1.0164x+2.98	21,24.3	29,32.5
8	2.7594	1.0284	0.9607	1.0284x+2.75	27,30.5	34,37.7
9	-2.7379	1.1852	0.9819	1.1852x-2.73	69,78.0	19,19.7
10	3.6846	0.8380	0.8685	0.8380x+3.68	23,22.4	35,33.0
$\bar{X}$ 10	1.8531	1.0289	0.9454	1.0289x+1.85	23,25.5	27,29.0

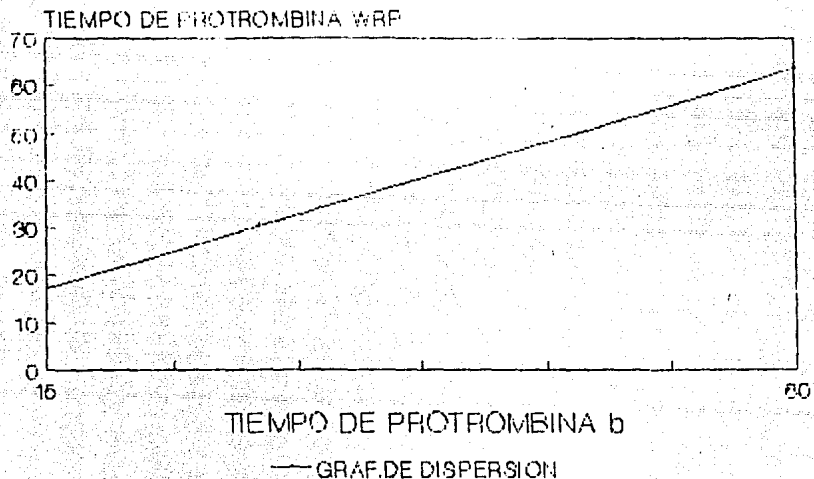
# CURVA DE ACTIVIDAD DE LA TTL LOTE 3



GRAFICA 7.8

# CALIBRACION GLOBAL

## LOTE 4



GRAFICA 7.16

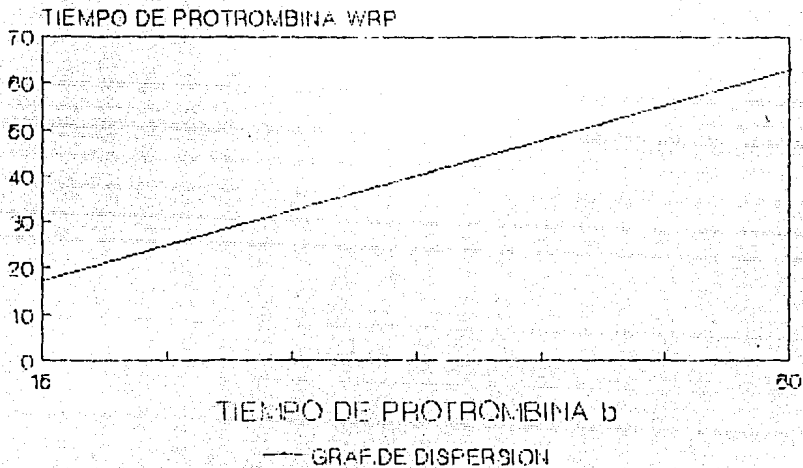
**AJUSTE DE LA GRAFICA DE DISPERSION POR MINIMOS CUADRADOS.  
DE LA TTL LOTE 5**

**TABLA 7.16**

DIA	a	b	r	Y=bX+a	F(x,y)	P(x,y)
1	4.8623	0.9327	0.8917	0.9727x+4.86	26,29.1	20,23.5
2	4.9299	0.9223	0.9825	0.9223x+4.92	16,19.7	19,22.5
3	0.8351	1.0851	0.9820	1.0851x+0.83	23,25.7	23,25.7
4	1.9397	1.0025	0.9561	1.0025x+1.93	32,34.0	28,30.0
5	4.4475	0.9274	0.9856	0.9274x+4.44	39,40.4	45,46.1
6	4.6265	0.9281	0.9835	0.9281x+4.62	19,24.3	20,23.2
7	3.2349	1.0771	0.7053	1.0771x+3.23	21,25.8	29,34.5
8	-0.6564	1.1121	0.9836	1.1121x-0.65	27,29.4	34,37.2
9	-3.6841	1.1876	0.9827	1.1876x-3.684	62,76.3	19,19.0
10	5.3092	0.7171	0.8524	0.7171x+5.30	23,21.8	35,30.4
<b>Σ10</b>	<b>1.8834</b>	<b>1.0221</b>	<b>0.9205</b>	<b>1.0221x+1.88</b>	<b>23,25.4</b>	<b>27,29.5</b>

# CALIBRACION GLOBAL

## LOTE 5



GRAFICA 7.17

CALIFICACION FINAL DE LA TTL

LOTE 1

DIA	n	C(WRP-b)	ISI(WRP-b)	SECWRP-b	DEISIWRP	WCV
1	8	1.095	1.002	1.143	0.007	0.001 0.02
2	8	0.262	1.296	1.047	0.000	0.001 0.02
3	8	0.421	1.104	1.091	0.000	0.000 0.00
4	8	0.024	1.024	1.064	0.012	0.012 0.11
5	8	0.306	1.821	1.890	0.067	0.071 1.71
6	8	0.361	1.142	1.479	0.026	0.009 1.64
7	8	0.107	1.110	4.115	0.051	0.005 0.14
8	8	0.113	1.119	1.163	0.007	0.007 0.64
9	8	0.127	0.891	0.915	0.009	0.009 1.00
10	8	0.061	1.063	1.104	0.009	0.041 3.68
Σ 10	80	0.102	1.108	1.152	0.034	0.040 3.42

TABLA 7.17

CALIFICACION FINAL DE LA TTL  
LOTE 2

DIA	n	C(WRP-b)	ISI(WRP-b)	SECWRP-b	DEISIWRP	WCV
1	8	1.240	1.213	1.259	0.071	0.074 5.87
2	8	1.269	1.135	1.179	0.010	0.014 1.18
3	8	0.001	1.000	1.029	0.000	0.000 0.00
4	8	0.019	1.020	1.059	0.001	0.001 0.09
5	8	0.537	1.566	1.721	0.493	0.057 2.19
6	8	0.123	1.193	1.128	0.015	0.015 1.26
7	8	-0.111	0.959	0.998	0.052	0.051 4.37
8	8	0.068	2.531	2.629	0.091	0.107 3.94
9	8	-0.154	0.857	0.897	0.101	0.106 1.16
10	8	0.222	1.247	1.296	0.144	0.150 11.58
Σ 10	80	0.065	1.067	1.109	0.047	0.052 4.71

TABLA 7.18

Page No. 1  
01/01/81

CALIBRACION FINAL DE LA TIL  
LOTE 3

DIA	n	m	CWRF-b	ISIWRF-b	SEIARF-b	SEISIWRF	%CV
1	B	0.120	1.127	1.171	0.023	0.023	1.75
2	B	0.189	1.201	1.254	0.015	0.015	1.20
3	B	0.187	1.048	1.058	0.059	0.051	5.31
4	B	0.047	1.048	1.064	0.009	0.009	0.36
5	B	0.433	1.533	1.581	0.293	0.305	17.19
6	B	0.172	1.187	1.233	0.014	0.017	1.19
7	B	-0.012	0.987	1.025	0.001	0.001	0.03
8	B	0.026	1.127	1.067	0.002	0.002	0.16
9	B	0.191	1.269	1.256	0.011	0.010	0.45
10	B	0.191	1.239	1.256	0.010	0.011	0.55
N10	80	0.095	1.095	1.142	0.002	0.002	5.37

TABLA 7.19

Page No. 1  
01/01/81

CALIBRACION FINAL DE LA TIL  
LOTE 4

DIA	n	m	CWRF_b	ISIWRF-b	SEWRF-b	SEISIWRF	%CV
1	B	0.097	0.915	0.952	0.023	0.023	1.59
2	B	0.295	1.334	1.386	0.025	0.026	1.97
3	B	0.031	1.032	1.072	0.002	0.002	0.18
4	B	0.070	1.031	1.072	0.005	0.005	0.51
5	B	0.277	1.268	1.317	0.022	0.023	1.75
6	B	0.155	1.167	1.212	0.021	0.022	1.82
7	B	0.198	1.218	1.265	0.010	0.010	0.31
8	B	0.107	1.113	1.156	0.006	0.007	0.51
9	B	-0.089	0.915	0.950	0.006	0.006	0.65
10	B	0.084	1.087	1.130	0.040	0.042	3.74
N10	50	-0.014	0.986	1.031	0.052	0.053	5.55

TABLA 7.20

CALIBRACION FINAL DE L-11L

LOTE 5

DIA	n	m	CRWF-b	ISISWF-b	SECWF-b	SEISWF	COV
1	8	0.155	1.257	1.337	0.010	0.011	0.84
2	8	0.011	1.235	1.284	0.017	0.018	1.47
3	8	0.355	1.076	1.076	0.002	0.002	0.21
4	8	-0.041	0.959	0.997	0.205	0.217	1.76
5	8	0.187	1.205	1.252	0.017	0.177	1.41
6	8	0.136	1.203	1.249	0.005	0.048	1.93
7	8	1.147	1.158	1.003	0.033	0.079	1.26
8	8	-0.024	0.976	1.014	0.001	0.001	0.14
9	8	-0.102	0.855	0.910	0.009	0.009	0.98
10	8	0.057	1.240	1.393	0.015	0.019	1.19
M 10	80	0.297	1.241	1.393	0.019	0.019	0.77

TABLA 7.21



TABLA 7.22 RESULTADOS DEL TP EN SEGUNDOS DE 80  
PACIENTES CON TERAPIA DE ANTICOAGULANTES ORALES

PACIENTE	TROMBOREL-S	L-1	L-2	L-3	L-4	L-5
1	26	29	28	26	28	26
2	19	22	23	23	23	24
3	24	26	26	27	28	28
4	21	24	23	24	24	25
5	20	24	24	23	24	25
6	25	27	28	29	29	29
7	18	20	17	19	19	20
8	25	29	29	29	30	29
9	21	27	26	25	28	26
10	41	42	42	42	40	42
11	19	25	22	22	24	22
12	23	24	24	25	24	26
13	23	25	26	26	26	25
14	29	31	31	30	31	31
15	23	26	27	27	27	28
16	16	17	17	16	17	17
17	23	26	26	26	26	27
18	38	39	40	40	42	42
19	32	34	33	32	33	32
20	32	34	36	34	34	33
21	21	23	22	23	23	25
22	21	22	22	23	22	23
23	28	29	29	29	30	32
24	27	28	30	32	30	30
25	39	39	41	43	42	42
26	22	24	25	24	25	24
27	24	27	27	27	28	26
28	21	25	24	23	24	26
29	45	29	30	30	42	45
30	23	25	24	28	27	26
31	19	24	24	24	22	22
32	17	19	19	21	21	20
33	35	39	38	40	37	37
34	30	33	35	35	35	36
35	20	24	25	25	24	25
36	60	50	60	59	59	59
37	21	23	22	22	23	21
38	27	32	35	36	31	36
39	25	30	34	31	32	31
40	32	32	32	35	30	32
41	29	35	31	35	34	33
42	24	29	30	34	35	39
43	27	33	33	33	33	28
44	35	40	40	40	41	41
45	45	47	47	50	45	47
46	44	46	48	49	50	50
47	34	35	36	35	36	36
48	29	31	31	30	34	32
49	69	81	81	82	82	82
50	41	43	43	43	45	43
51	42	41	39	42	41	40

TABLA 7.22 RESULTADOS DEL TP DE 60 PACIENTES CON TERAPIA DE ANTICOAGULANTES ORALES

PACIENTE	TROMBOREL S	L-1	L-2	L-3	L-4	L-5
52	19	20	19	21	23	21
53	19	19	19	24	21	20
54	18	18	18	19	21	19
55	23	22	22	23	23	22
56	22	22	21	25	25	25
57	17	17	17	19	21	20
58	24	21	21	26	26	22
59	35	33	31	32	31	29
60	32	30	33	32	30	28

TABLA 7.23 ANOVA DE UN FACTOR PARA EL TP EN SEGUNDOS DE 60 PACIENTES CON TERAPIA DE ANTICOAGULANTES ORALES.

FV	G.L.	SUMA de CUADRADOS	M de C	E de C	C de R
ENTRE	5	$SC_E = 438.78$	$MC_E = 87.75$	$F_C > F_{1-, f_1, f_2}$	$F_C = 0.7857$ $0.785 < 2.37$
DENTRO	354	$SC_D = 39536.15$	$MC_D = 111.6840$		
TOTAL	359	$SC_T = 39975.00$			

**TABLA 7.24 RESULTADOS DEL TP EN TERMINOS DE  
 PORCENTAJE DE ACTIVIDAD DE 60 PACIENTES CON TERAPIA  
 DE ANTICOAGULANTES ORALES**

PCT.	TROMBOREL S	L-1	L-2	L-3	L-4	L-5
1	23.0	24.5	26.1	28.6	25.1	29.1
2	36.1	41.8	36.9	35.6	36.1	38.3
3	22.6	29.7	28.4	28.6	28.1	26.4
4	29.8	34.7	35.9	31.8	34.5	31.2
5	32.3	34.7	34.4	33.6	34.5	31.2
6	21.2	26.0	26.3	24.9	23.6	19.1
7	55.6	52.5	67.2	43.6	63.6	48.1
8	21.2	24.4	25.5	14.9	22.3	25.1
9	29.2	26.0	30.1	30.1	25.2	29.4
10	10.1	13.8	15.2	16.0	13.9	15.2
11	36.1	32.0	39.9	35.6	34.5	36.4
12	24.6	34.7	34.4	30.1	34.5	29.4
13	24.6	32.0	30.1	28.6	29.3	31.2
14	16.5	21.8	23.1	23.9	21.1	22.8
15	21.2	29.7	28.4	27.3	27.1	26.4
16	55.6	64.8	67.2	56.3	96.7	61.9
17	24.6	29.7	30.1	28.6	29.2	27.8
18	11.2	15.3	16.2	16.9	18.9	15.2
19	14.2	18.8	20.0	22.1	18.9	21.6
20	14.2	18.8	18.7	20.6	18.1	20.9
21	29.3	37.9	39.9	33.6	36.1	31.2
22	29.3	41.8	39.9	33.6	42.3	38.7
23	17.5	24.5	25.5	23.0	22.3	21.8
24	18.5	26.0	24.2	22.1	22.3	20.6
25	10.6	15.3	15.7	15.6	13.0	15.2
26	26.7	33.3	32.1	31.8	31.6	32.2
27	22.8	26.0	28.4	27.3	25.1	29.4
28	29.3	32.0	34.4	33.6	34.5	29.4
29	8.9	24.5	24.2	23.9	13.0	13.9
30	24.6	32.0	34.4	26.1	27.1	29.4
31	36.2	34.7	34.4	31.6	42.3	38.4
32	47.1	60.1	52.8	38.0	47.7	45.2
33	12.6	15.3	17.4	16.9	15.7	17.9
34	14.9	19.7	19.5	19.9	17.2	18.6
35	32.3	34.7	32.1	30.1	34.5	31.2
36	6.2	10.8	9.8	10.9	8.2	10.0
37	29.3	37.9	39.9	35.6	38.1	41.5
38	18.6	20.7	19.4	19.2	21.1	18.6
39	21.2	23.1	20.2	23.0	20.1	22.9
40	14.3	20.7	22.0	19.9	22.3	21.8
41	16.6	18.0	23.1	19.9	16.1	20.9
42	22.8	24.5	20.1	20.6	17.2	16.7
43	18.5	19.7	20.0	21.3	18.9	26.4
44	12.6	14.8	16.2	16.9	13.5	15.7
45	8.9	11.8	13.2	13.1	11.6	13.3
46	13.1	18.0	12.8	13.4	10.2	12.3
47	13.1	17.6	18.7	19.9	16.4	16.5
48	16.6	21.3	23.1	23.9	18.1	21.0

**TABLA 7.24 RESULTADOS DEL TP EN TERMINOS DE PORCENTAJE DE ACTIVIDAD DE 60 PACIENTES CON TERAPIA DE ANTICOAGULANTES ORALES**

PCT	TROMBOREL S	L-1	L-2	L-3	L-4	L-5
49	5.3	5.9	6.9	7.6	5.5	6.9
50	10.1	13.4	14.8	15.6	11.8	14.7
51	9.8	12.5	16.8	16.0	13.5	10.2
52	36.2	60.1	52.8	28.0	36.1	41.5
53	36.2	70.4	52.8	31.8	47.7	42.5
54	41.8	40.9	59.1	43.6	47.7	49.7
55	24.6	41.8	39.9	30.1	38.1	38.4
56	26.7	41.8	43.5	30.1	31.6	31.2
57	26.7	84.8	67.2	43.6	47.7	45.2
58	47.1	45.5	43.5	28.6	29.2	36.4
59	12.6	19.7	23.1	22.1	21.1	25.1
60	14.3	23.1	36.9	22.1	22.3	26.4

**ANOVA PARA LOS RESULTADOS EN % DE ACTIVIDAD DE 60 PACIENTES CON TERAPIA DE ANTICOAGULANTES ORALES**

F de V	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	M de C	E de C	C de R
ENTRE	5	$SC_E = 2291.40$	$MC_E = 458.28$	$F_C = 2.68$	$2.68 > 2.37$
DENTRO	355	$SC_D = 170.38$	$MC_D = 170.38$		
TOTAL	359	$SC_T = 62608$			

**TABLA 7.25**

RESULTADOS DEL RANGO INTERNACIONAL NORMALIZADO (RIN)  
EN 60 PACIENTES CON TERAPIA DE ANTICOAGULANTES ORALES

TABLA 7.26 DE ISI Y DE TP MEDIO DE CADA LOTE DE  
TROMBOPLASTINA.

	TRÓMBOREL S	L-1	L-2	L-3	L-4	L-5
ISI	1.039	1.1515	1.1090	1.1423	1.0242	1.1170
TP	13.820	15.3800	15.1500	15.4500	15.0200	15.3700
PCT.	TROMBOREL S	L-1	L-2	L-3	L-4	L-5
1	1.327	2.075	1.974	1.811	1.891	1.797
2	1.391	1.509	1.587	1.574	1.546	1.644
3	1.773	1.830	1.896	1.811	1.891	1.953
4	1.543	1.669	1.587	1.652	1.615	1.720
5	1.467	1.669	1.664	1.574	1.615	1.720
6	1.850	1.911	1.974	2.015	1.960	2.031
7	1.163	1.352	1.135	1.265	1.271	1.341
8	1.850	2.075	2.053	2.051	2.030	2.031
9	1.543	1.911	1.819	1.731	1.891	1.797
10	3.093	3.179	3.096	3.132	2.726	3.071
11	1.391	1.749	1.511	1.494	1.615	1.451
12	1.696	1.669	1.664	1.731	1.615	1.797
13	1.696	1.749	1.819	1.811	1.753	1.720
14	2.158	2.241	2.210	2.132	2.099	2.188
15	1.850	1.830	1.896	1.890	1.822	1.953
16	1.163	1.122	1.135	1.040	1.134	1.118
17	1.696	1.830	1.819	1.811	1.753	1.875
18	2.858	2.919	2.933	2.962	2.865	3.071
19	2.391	2.492	2.369	2.296	2.238	2.267
20	2.391	2.292	2.609	2.460	2.307	2.346
21	1.543	1.589	1.511	1.574	1.546	1.720
22	1.543	1.509	1.511	1.574	1.477	1.567
23	2.081	2.075	2.053	2.214	2.030	2.267
24	2.004	1.993	2.131	2.296	2.030	2.109
25	2.936	2.919	3.014	3.217	2.865	3.071
26	1.620	1.669	1.741	1.652	1.684	1.644
27	1.773	1.911	1.896	1.890	1.891	1.791
28	1.543	1.749	1.664	1.574	1.615	1.797
29	3.407	2.075	2.131	2.132	2.865	3.317
30	1.696	1.749	1.664	1.971	1.822	1.797
31	1.391	1.669	1.664	1.652	1.477	1.491
32	1.239	1.275	1.284	1.419	1.408	1.341
33	2.624	2.919	2.771	2.962	2.516	2.666
34	2.313	2.408	2.529	2.543	2.377	2.585
35	1.467	1.669	1.741	1.731	1.615	1.720
36	4.594	3.886	4.590	4.618	4.059	4.490
37	1.543	1.589	1.511	1.496	1.546	1.416
38	2.004	2.324	2.529	2.626	2.099	2.585
39	1.850	2.158	2.449	2.214	2.169	2.188
40	2.391	2.324	2.290	2.543	2.030	2.267
41	2.158	2.577	2.210	2.543	2.307	2.346
42	1.773	2.075	2.131	2.460	2.377	2.827

PCT.	TROMBOREL S	L-1	L-2	L-3	L-4	L-5
43	2.004	2.408	2.396	2.378	2.236	1.953
44	2.624	3.005	2.933	2.962	2.795	2.990
45	3.407	3.619	3.507	3.822	3.075	3.483
46	3.329	3.530	3.590	3.735	3.426	3.732
47	2.546	2.577	2.609	2.543	2.447	2.585
48	2.158	2.241	2.210	2.132	2.307	2.671
49	5.313	6.773	6.414	6.726	5.686	6.485
50	3.093	3.266	3.178	3.217	3.075	3.153
51	3.172	3.092	2.852	3.231	2.795	2.908
52	1.391	1.352	1.284	1.419	1.546	1.416
53	1.391	1.275	1.284	1.652	1.408	1.391
54	1.315	1.198	1.209	1.265	1.408	1.266
55	1.698	1.509	1.511	1.574	1.546	1.491
56	1.620	1.509	1.435	1.731	1.684	1.720
57	1.239	1.122	1.135	1.265	1.408	1.341
58	1.773	1.431	1.435	1.811	1.753	1.491
59	2.624	2.408	2.210	2.296	2.099	2.031
60	2.391	2.158	1.587	2.296	2.030	1.953

TABLA 2.27

ANOVA DE UN FACTOR PARA EL RIN ( $\alpha = 0.05$ )

F V	G L	SUMA DE CUADRADOS	M de C	E de C	C de R
ENTRE	5	$SC_E = 0.7613$	$MC_E = 0.1522$	$F_C > F_{1-}$	$f_1, f_2$
				$F_C = 0.2051$	$0.205 < 2.37$
DENTRO	355	$SC_D = 263.4753$	$MC_D = 0.7421$		
TOTAL	359	$SC_T = 264.1886$			

DETERMINACION DE HEMOGLOBINA

TABLA 7.28 RESULTADOS DE LA CONCENTRACION DE HEMOGLOBINA EN LA TTLCC.

LOTE	ABS. [Hb] TT LIQ. (mg/ml)	ABS. [Hb] TT Liof. (mg/vial)		
1	0.02	0.20	0.10	0.96
3	0.03	0.26	0.12	1.00
5	0.035	0.28	0.11	0.88

Las fracciones de elución mostraban turbidez .

TABLA 7.29 ANALISIS MICROBIOLOGICO

LOTE	MEDIO DE CULTIVO		
	E M B	S M	P D A
1	-	-	-
3	-	-	-
5	-	-	-

TABLA 7.30 DE TP EN SEGUNDOS DE LOS CINCO LOTES PROBADOS EN 25 PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE CHAN

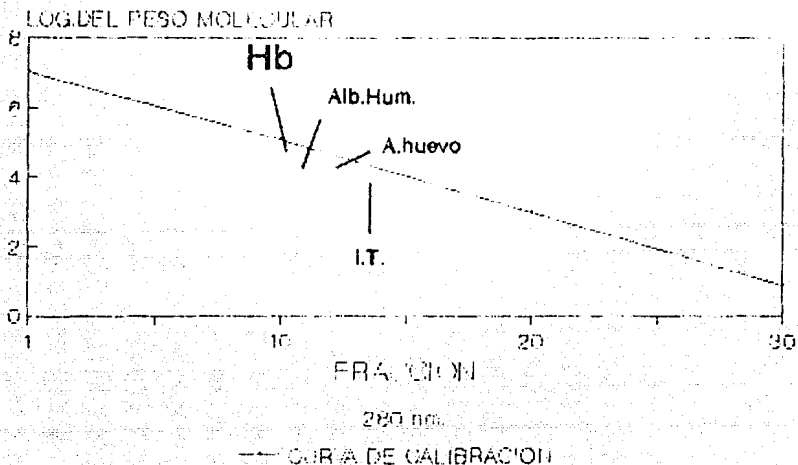
PACIENTE	STD	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3	LOTE 4	LOTE 5
1	19	16	15	15	15	14
2	22	25	20	21	21	19
3	16	14	14	14	16	15
4	19	16	17	16	15	14
5	23	18	17	17	18	17
6	23	20	18	20	20	17
7	26	24	21	22	23	21
8	21	21	20	20	19	18
9	21	22	23	22	22	22
10	16	16	15	16	16	16
11	18	17	17	17	18	18
12	19	18	16	17	17	17
13	21	23	24	24	22	22
14	29	27	30	28	30	31
15	15	18	19	18	21	20
16	22	19	18	18	17	19
17	16	15	16	15	16	14
18	22	20	18	18	21	18
19	13	13	14	13	12	12
20	13	13	14	13	12	12
21	18	18	17	17	17	16
22	18	18	18	17	18	16
23	28	30	29	28	28	29
24	23	20	19	20	19	19
25	18	17	18	18	17	17

TABLA 7.31 ANOVA PARA LA EVALUACION DEL TP EN PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE CHAN ( Alfa = 0.05 ).

F. V.	G L	SUMA DE CUADRADOS	M. de C.	E de C	C de R
ENTRE	5	$SC_E = 17196.85$	$MC_E = 3439.37$		
				$F_{cal} = 8.61$	$8.61 > 2.29$
DENTRO	144	$SC_D = 5749.78$	$MC_D = 399.3$		
TOTAL	149	$SC_T = 74896.63$			



# CALIBRACION DE LA COLUMNA CON PROTEINAS DE PM CONOCIDO

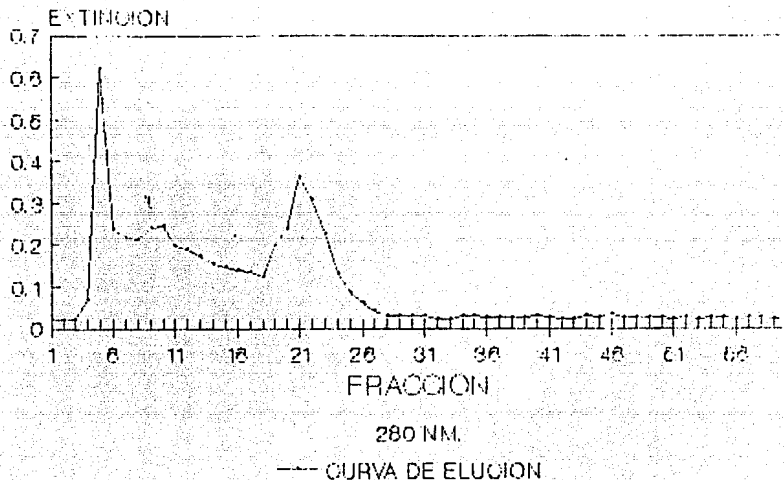


GRAFICA 7.18

# FRACCIONAMIENTO DE LA TT LIQUIDA

LOTE 1

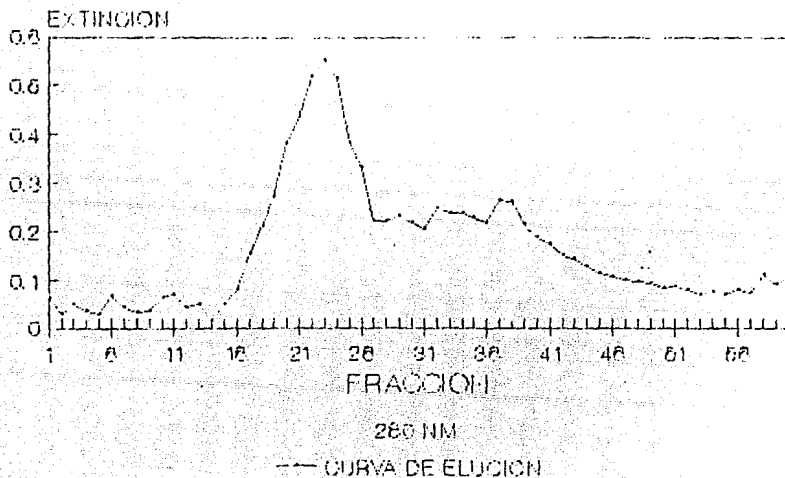
78



GRAFICA 7.19

# FRACCIONAMIENTO DE LA TT LIOFILIZADA

LOTE 3

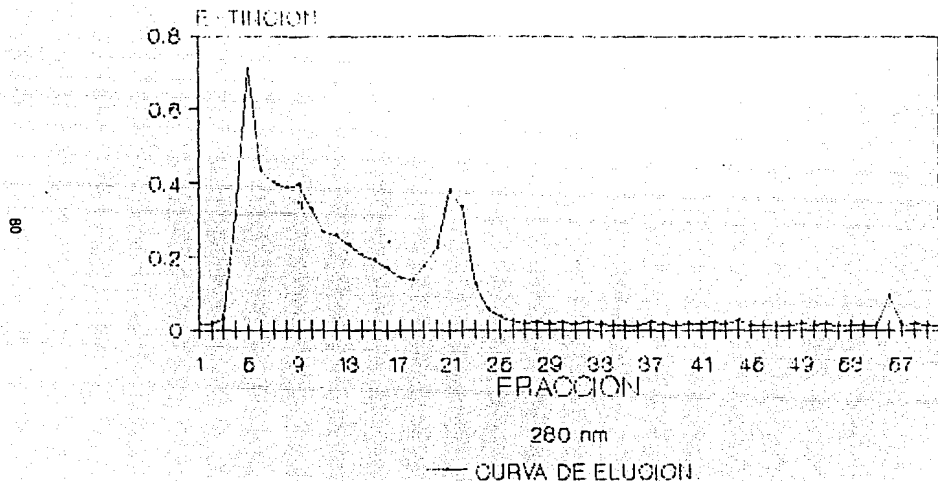


GRAFICA 7.22

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

# FRACCIONAMIENTO DE TT LIQUIDA

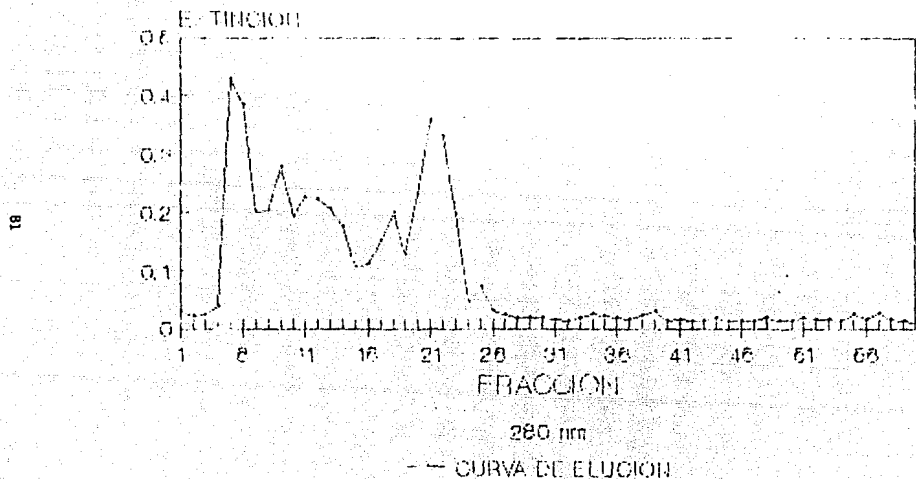
LOTE 6



GRAFICA 7.21

# FRACCIONAMIENTO DE LA TT LIQUIDA

LOTE 3

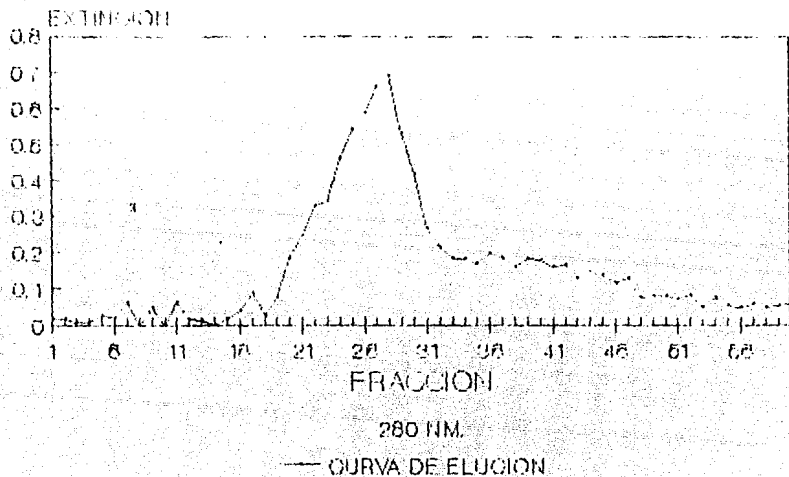


GRAFICA 7.20

# FRACCIONAMIENTO DE LA TT LIOFILIZADA

LOTE 6

82



GRAFICA 7.23

## 8. DISCUSION DE RESULTADOS

Al realizar las curvas de dilucion de los lotes de TTL, se observa que cada lote presenta diferente actividad esto es importante debido a que si solo tomamos el TP en segundos, de dos o más tromboplastinas utilizadas para un mismo paciente, quizás muestre el mismo resultado en segundos pero la actividad sera diferente y por lo tanto la interpretacion de la prueba.

En terminos generales el 100% de actividad de los 5 lotes de TTL producidos se encuentran entre 12 y 15.5 segundos.

Se considera importante hacer las curvas de dilucion para cada nuevo lote de tromboplastina que sea utilizada en el laboratorio clinico, aunque desde luego si trabajamos con tromboplastinas de ISI conocido, es recomendable realizar el reporte del resultado de la prueba de TP en terminos de RIN (Rango de Internacional Normalizado) mas aun en pacientes que se encuentran con terapia de anticoagulantes orales dado que para ellos, como se vera mas adelante, es la medida mas consistente del reporte del resultado de esta prueba.

### CALIBRACION DE LA TTLCC (TROMBOPLASTINA TISULAR LIOPILIZADA DE CEREBRO DE CONEJO.)

En lo que respecta a la calibracion de los lotes de TTL, el ISI de cada lote producido es muy semejante al ISI de las tromboplastinas utilizadas como referencia (Tromborel E, LOTE 505682A, ISI=1.039) sin embargo esta similitud en los resultados del ISI no indica de ninguna forma que la calibracion tuvo una buena precision, es por esto que la OMS (Organización Mundial de la Salud) establecio que un buen indicador de la precision de la calibracion es el coeficiente de variacion del ISI de la preparacion de trabajo que se usó en la calibracion, obtenido a partir del metodo de regresion ortogonal, fijo un rango de coeficiente de variacion menor o igual al 3 %, que indica que existe una relacion de calibracion adecuada, e incluso admite hasta un coeficiente de variacion del 5 % para la tromboplastina de trabajo, con base en lo anterior, los lotes 1, 2, y 5 de TTLCC se encuentran dentro de los limites propuestos por dicha organizacion, como se observa en resultados varian desde 2.77 a 4.70 %.

El lote número 3 y 4 de TTLCC tiene un coeficiente de variacion de 5.3 % y 5.65 respectivamente, que aunque se salen del rango establecido se considera correcto pues la diferencia entre el limite fijado y el valor obtenido en minima 10.3 % y 0.65 %

respectivamente).

#### RANGO INTERNACIONAL NORMALIZADO

Se realizó el TP a 60 pacientes con terapia de anticoagulantes orales y los resultados son reportados en tres diferentes formas a saber :

- a) En segundos
- b) En % de actividad ( con curva de dilución salina )
- c) En Rango Internacional Normalizado (RIN)

Los resultados del analisis estadistico muestran que no existe diferencia significativa en los resultados de los diferentes lotes para el reporte en segundos de la prueba, es decir existe una baja homosedasticidad (variación) entre los lotes del producto respecto al reactivo comercial utilizado como referencia, sin embargo al compararlo con los resultados para los mismos datos solo que en % de actividad encontramos que existe diferencia significativa entre los diferentes lotes, lo cual lo podemos explicar diciendo que esta diferencia puede ser debida a que la forma de reportar en % de actividad presenta grandes problemas de interpretación dado que varía en función de una serie de factores, porque cuando observamos los resultados en terminos de RIN (que es la forma recomendada de reporte del TP para pacientes con terapia de anticoagulantes orales, por el comite de expertos en estandarización de biológicos de la OMS.) encontramos que no existe diferencia significativa entre los diferentes lotes lo cual reafirma que la calibración efectuada a los lotes del producto obtenido fue correcta (a un nivel de significación del 5% ) aunque uno de los lotes presenta un coeficiente de variación ligeramente superior al limite máximo establecido por la OMS.



## CONTROL MICROBIOLÓGICO

Se observa que los resultados son negativos respecto al crecimiento de algún microorganismo, lo cual no significa necesariamente que el producto se encuentre estéril, sin embargo habla de un manejo correcto del material biológico utilizado durante todo el proceso de manufactura.

Ahora bien, no es necesario que el producto sea estéril puesto que no es para uso humano, ya que es un reactivo de diagnóstico clínico, pero sí es importante que la carga microbiana sea baja o nula, debido a que ciertos microorganismos podrían alterar la integridad del producto (degradándolo o contaminándolo con metabolitos bacterianos, tales como los generos Staphylococcus y Pseudomonas).

## HEMOGLOBINA

Se analizaron los lotes 1, 3 y 5 de Tromboplastina en forma líquida y liofilizada, a cada muestra se le eluyó, en una columna de Sephadex G100, a las fracciones se les determinó su extinción a 260 nm. región de absorción máxima de proteínas, con lo que se obtuvieron las graficas de elución que aparecen en resultados.

Se pretendía la determinación cuantitativa de hemoglobina en cada lote (debido a que la OMS recomienda que toda preparación de tromboplastina debe ser exenta de hemoglobina) al mismo tiempo que se buscaba ver si por este método era posible separar la hemoglobina de las fracciones con actividad biológica pronunciada de tromboplastina.

Los resultados obtenidos demuestran por un lado que se tiene aproximadamente un miligramo de Hemoglobina por vial de tromboplastina liofilizada mientras que para los extractos líquidos de los lotes la concentración de Hemoglobina fluctúa alrededor de 0.25 mg/ml. Esta variación de las concentraciones puede ser atribuible a los siguientes factores:

- 1.- El método de Drabkin para cuantificar hemoglobina es espectrofotométrico (basado en la formación de un complejo colorido de un derivado de la hemoglobina la cianmetahemoglobina) no únicamente se detecta la extinción registrada por dicho complejo, sino que también, estuvieran absorbiendo o desarrollando turbidez otras proteínas presentes en los eluidos.

2.- Se observa que los lotes de tromboplastina en su forma liofilizada presentan el quintuple de concentración de hemoglobina respecto a su forma líquida, lo anterior se debe a que el producto liofilizado usa como soporte leche en polvo, por lo que se piensa que las proteínas de esta interfieren en la determinación ya sea formando complejos coloridos con el reactivo o contribuyendo con turbidez. Así mismo a las diferentes fracciones de elución de la columna, se les determino la prueba de TP, observándose que de las fracciones 6 a 24, tenían actividad coagulante ( con tiempos que variaban entre 38 seg a 2 minutos ) lo anterior demuestra que la tromboplastina presenta una estructura química muy heterogénea con un amplio rango de peso molecular, (22) pues eluye el producto en varias fracciones y como sabemos el mecanismo de separación de las columnas de Sephadex es por gradientes de peso molecular , donde las moléculas más grandes seran las que eluyan primero.

Se encontró además que por este metodo no es posible la separación molecular de la tromboplastina del contaminante de hemoglobina, pero que este contaminante no alteró significativamente al producto en su actividad biológica como se ha demostrado en los resultados de la calibración y determinación del RIN.

Al comparar las curvas de elución de la TT Líquida encontramos que existen semejanzas entre los picos de máxima absorción, los cuales se observan en las fracciones 5 y 23 para los lotes analizados, lo cual demuestra que la columna separaba de manera homogénea (gráficas 7.19 a 7.21).

En lo que respecta a las gráficas 7.22 y 7.23 para la TLCC se observa un unico pico máximo de absorción alrededor de la fracción 26, para los lotes probados, este resultado se puede explicar argumentando que en esas fracciones están contenidos una diversidad de proteínas de semejante peso molecular pero de diferente composición tales como las proteínas de la leche, las de la tromboplastina , la hemoglobina y otras. Por lo expuesto anteriormente las curvas de elución de la tromboplastina antes y despues de liofilizar son diferentes, por el tratamiento adicional dado a la muestra en el proceso de liofilización.

## DETERMINACION DEL TP EN PACIENTES CON DIAGNOSTICO CONFIRMADO DE CHAN

Al ser el CHAN una enfermedad que afecta la funcionalidad hepática, directamente se ven afectados los factores de la coagulación sintetizados en este órgano, contribuyendo a que los resultados de las pruebas de coagulación se vean alterados (aumentados). Los resultados se obtuvieron en segundos pero se analizaron en porcentaje de actividad debido a que el mismo resultado de TP en segundos con dos o más tromboplastinas pueden tener muy diferente actividad. En los resultados se encontró que existe diferencia significativa entre los diferentes lotes para la realización de TP en estos pacientes lo anterior obedece a que el reporte del TP en % de actividad presenta variación debido a varios factores.

## 9. CONCLUSIONES

La tromboplastina producida no muestra variación significativa de los resultados de la prueba de TP en comparación con el reactivo comercial (tromborel S) utilizado como estándar secundario. Como se demuestra en los índices de sensibilidad internacional (ISI), así como la determinación del coeficiente de variación para cada lote, el cual se encuentra comprendido en el rango de variación establecido por la OMS.

La calibración de la TTLCC de acuerdo al método propuesto por BIGGS y DENSUN (1977) y adoptado por la OMS como método de referencia para la calibración de tromboplastinas de trabajo resultó adecuado para dicho producto como lo demuestran los datos obtenidos de la calibración.

La TTLCC presenta trazas de Hemoglobina no eliminables por cromatografía en columna de Sephadex, sin embargo esta Hemoglobina no afecta de forma significativa los resultados de la prueba de TP.

El control microbiológico de la TTLCC es importante únicamente para observar la prevalencia o ausencia de microorganismos que pudieran en un momento dado degradar al producto o contaminarlo con sus desechos metabólicos, se encontró para esta prueba que la carga microbiana es baja o nula esto se ve favorecido por el proceso de fabricación del reactivo. (liofilización).

Por otra parte queda demostrado que el reportar los resultados de TP en pacientes con terapia de anticoagulantes orales en términos de RIN no muestra variación significativa al compararlos los mismos resultados pero en términos de % de actividad en los que sí hubo variación significativa.

El estudio del TP en pacientes con diagnóstico confirmado de CHAN muestra que sí hubo variación significativa de los lotes de TTLCC al compararlos con el reactivo usado como referencia, sin embargo dicha diferencia se debe a la forma de reportar los resultados (en este caso % de actividad) y no en sí a diferencias que existan entre los diferentes lotes producidos.

## 10. SUGERENCIAS

En trabajos previos relacionados con este se ha encontrado el método Optimo de obtencion de la tromboplastina tisular de cerebro de conejo, posteriormente se encontró la forma de mantener dicho producto estable por tiempo relativamente largo, es decir, la liofilización de la tromboplastina, así como el encontrar el mejor soporte para dicho producto (la leche descremada).

En el presente trabajo se realizó el control de calidad del producto liofilizado, por lo que se hacen las siguientes sugerencias para continuar con la línea del proyecto :

1.- Que se realice la calibración de la TTLCC con una preparación de referencia internacional, debido a que en este proyecto dicha calibración se realizó en forma indirecta, es decir, tomando como referencia un reactivo comercial de tromboplastina.

2.- Que se continúe con este proyecto para encontrar el método más adecuado para eliminar el contaminante de hemoglobina de la tromboplastina, dado que es una especificación dada por la OMS para todos los reactivos de tromboplastina usados como reactivos de diagnóstico clínico.

3.- Probar el producto con mayor número de pacientes, así como, con más variedad de trastornos de la coagulación para verificar la efectividad (sensibilidad) del producto en dichos padecimientos.

## ANEXO 1

### RECOMENDACIONES PARA LA OBTENCION DE LA MUESTRA SANGUINEA PARA SU MEJOR CONTROL DE CALIDAD

Las muestras de sangre deben obtenerse de tal forma que se conserve la integridad de los factores de la coagulación. En la sangre que se obtiene lentamente o con dificultad, el mecanismo de la coagulación puede ser activado y las pruebas pueden demostrar una actividad de los factores alta y un falso número bajo de plaquetas. Además la sangre puede contaminarse con tromboplastina tisular, la cual activará los mecanismos de la coagulación invalidando por lo tanto los resultados de las pruebas.

Las jeringas plásticas o siliconizadas se deben de usar para recoger la sangre. No se recomienda usar tubos al vacío pues pueden dar volúmenes no deseables y además producir espuma, accidente que desnaturalizan al fibrinógeno y los factores V y VIII. El vaciado de la sangre de la jeringa al tubo debe de realizarse evitando la formación de espuma o turbulencia excesiva y mezclar la sangre por inversión suave.

La sangre y el plasma deben de ser guardados preferentemente en tubos plásticos y todo el manejo se debe de hacer también con pipetas plásticas.

Si las pruebas no son terminadas dentro del lapso de cuatro horas, se deben de congelar en forma rápida en alcohol y hielo seco y guardarlas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para ser utilizado nuevamente el plasma debe de ser descongelado rápidamente a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Algunas de las pruebas de coagulación necesitan el uso de soluciones amortiguadoras para asegurar que la reacción tenga lugar en un pH fisiológico.

Estas soluciones deben de ser preparadas cuidadosamente y comprobado su pH antes de ser guardadas en refrigeración.

El agua destilada o desionizada se usa en las pruebas y en la preparación de los reactivos, agua con un pH alto prolonga los resultados si el sistema no está correctamente amortiguado.

Los tubos para las pruebas y para mantener el plasma deben estar limpios y sin quebraduras. El lavado ácido se considera como el mejor método para la cristalería que se utiliza en estudios de coagulación. La cristalería debe ser apropiadamente lavada para remover todas las trazas de ácido.

La detección del punto final requiere un baño de agua a temperatura controlada y un cronómetro, la temperatura del agua debe de ser  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

## ANEXO 2

### ABREVIATURAS USADAS EN ESTE TRABAJO.

IRP= Preparación de Referencia Internacional.  
WRP= Preparación de Referencia de Trabajo  
TTL= Tromboplastina Tisular Liofilizada.  
TTLCC= Tromboplastina Tisular Liofilizada de Cerebro de Conejo.  
C = Pendiente de la recta de calibración, graficando en escala logarítmica el TP en segundos de WRP en las abscisas y el TP en segundos de IRP en las ordenadas.  
TP= Tiempo de Protrombina.  
ISI= Índice de Sensibilidad Internacional.  
RIN= Rango Internacional Normalizado.  
CCI= Constante de Calibración Internacional.  
SE= Error Estandar de estimación.  
CV= Coeficiente de Variación.  
ANOVA= Analisis de Varianza.  
FV= Fuente de Variación.  
GL= Grados de Libertad.  
M de C= Media de Cuadrados.  
E de C= Estadígrafo de Contraste.  
C de R= Criterio de Rechazo.  
Hb= Hemoglobina.  
IT= Inhibidor de Tripsina.  
CHAN= Cirrosis Hepático Alcohólica Nutricional.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- 1.-Escribá Polo A. y Maluenda C.M.P.;Fisiología de la Hemostasia.Medicine,primera serie,número 7:60-90.(1982).
- 2.- Yale Nemerson;Tissue Factor and hemostasis;Blood,vol 71,No 1(january).1-8;(1988).
- 3.- Byru E.Leavel;Hematogía Clínica;4a ed., edit. Interamericana,542-552.(1986).
- 4.-Chesteman C.N.;Coagulación Intravascular Diseminada y cuadros Relacionados.Medicine,la serie,No 7:91-97.(1982).
- 5.- Schafer I.A.;Annals Of Internal Medicine;102 814-28.(1985).
- 6.- Linman W.J.;Hematology:Physiologic ,pathophysiologic and clinical principles.Mcmillan publishing Co.,Inc (1975).
- 7.-Cattaneo M.Et Al;Effect of Aspirin and Sodium Salicylate on Thrombosis,Fibrinolysis,Prothrombin Time,and Platelet Survival in Rabbits With Indwelling Aortic Cateters.Blood,Vol 61,No 2(February);353-361;(1983).
- 8.- Muhlfelder W.T.;Glucocorticoids inhibit the Generation of Leucocyte Procoagulant (tissue Factor) Activity.Blood,Vol 60.No 5(November);1169-1172.(1982).
- 9.- W.H.O. EXPERT Committee on Biological Standardization,Thirty Third Report,technical Report Series 687 ; W.H.O.Genova,1983,pp. 81-105
- 10.- Fenton W.J.;Regulation Of Trombin Generation And Functions;Seminars in Thrombosis and Hemostasis,Vol 14,No 3, 234-237;(1988).
- 11.- Jordan V.G.;"Obtención de un patrón de Hemoglobina de concentración conocida",Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo . ENEP ZARAGOZA UNAM,1986.
- 12.- Sindet-Pedersen S.Et Al.;Hemostatic Effect Of Tranexamic Acid Mouthwash In Anticoagulant Treated Patients Undergoing Oral Surgery;The New England Journal Of Medicine,No 13,840-843;(1989).
- 13.- Kirkwood T.B.L.;Calibration Of Reference Thromboplastins And Standardisation Of Prothrombin Time Ratio;Thromb.Haemostas.49(3),238-244;(1983).



14.- Huoltin B.M. ,Modulation Of Thrombin-Mediated Activation of Factor VIII:c By Calcium Ions,phospholipid and platelets,Blood, Vol 66, No 1 (July)1985:pp 53-58.

15.- Taberner D.A. Et Al.; Effect Of International Index (ISI) Of Thromboplastins On Precision Of International Normalised Ratios J Clin Pathol 1989,42:92-96 (1989).

16.- Wintrobe H.M.;Hematologia Clinica. 2a ed. , edit. Reverte,EsPaRa,pp. 194-200:(1984).

17.- Poller L.,Hirsh J.M.D.,A Simple System for The Reporting Of Prothrombin Time Results Whit North American Thromboplastin Reagents,A.J.C.P.Vol:92,No.1 (1984).

18.- Hirsh J.M.D.,Mechanism Of Action And Monitoring Of Anticoagulants,Seminars Of thrombosis And Hemostasis,Vol:12.No.1:(1986).

19.- Searcy R.L.,Evaluation Of Thromboplastins For Plasma Prothrombin Estimatio,Praceding Of The Hematology ,Vol. 2 ,Edit. UNAM (1964).

20.- Brooks A.R.,Bradley M.D. Quality control Of Determinations Of Prothrombin Time,A.J.C.P.,Vol 42,No.3 (1964).

21.-Palmer N.R.,Harvey R.G.,Cold-Induced Contact Surface Activation Of The Prothrombin Time In Whole,Blood,Vol 51,No. 1 (1982).

22.-Furie B.,Liebman A.H.,Comparison Of The Native prothrombin Antigen And The Prothrombin Time For Monitoring Oral Anticoagulants Therapy,Blood,Vol 64,No. 2 (August)1984,445-451.

23.- Iovine E.,El Laboratorio Y La Clinica,Edit. Panamericana,3a Ed.,Argentina 1985.

24.- Cartwright E.G.;Diagnostic Laboratory Hematology,Editorial Cientifico-medica,cuarta edicion ,(1973).

25.-Goodman And Gilman , Las Base Farmacologicas de la Terapeutica

26.-Poller L.Laboratory Control Of Anticoagulant therapy,Seminars Of Thrombosis And Haemostasis,Vol 12 No. 1 (1986).

27.- Van Der Basselar A.M.H.P., Standardization Of The Prothrombin Time in Oral Anticoagulant Control, Haemostasis, 15:271-277(1985).

28.-Loeliger E.A., Van Der Vasselar A.M.H.P., Reliability And Clinical Impact Of The Normalization Of The Prothrombin Time In oral Anticoagulant Control.

29.-Gogstad G.O.,Wadt P.S.,Utility of a Modified Calibration Model for Reliable conversion of Thromboplastin Times to International Normalized Ratios, Thrombosis and Haemostasis 56(2)178-183:1986

30.- Loeliger E.A.,Laboratory Control ,Optimal Therapeutic Ranges And Therapeutic Quality Control in Oral Anticoagulation, Acta Hematologica, 74:125-131(1985).

31.- Loeliger E.A.,Brockmans A.W.,Optimal Therapeutic Anticoagulation, Haemostasis 15:283-292(1985).

32.-Poller L., INR and therapeutic range, Biologia & Clinica Haematologica 9, 203-213, 1987.

33.- Poller L., Et Al., Survey of prothrombin time in External Quality Assesment Scheme exercises(1980-1987), j Clin Pathol 1988;41:361-364

34.- Steven D.C.Et Al., Protein Co-isolated With Tissue Factor Impairs Recovery Of actyivity , Blood Vol 71, No 2(February), 1988:pp 520-523.

35.- Poller L. Et Al, Effect Of automation on prothombin time test in NEQAS surveys, j.Clin Pathol 1989;42:97-100.

36.- Tejada Rosales Maria Elena "Obtención de la Tromboplastina tisular liofilizada"; Tesis para obtener el Título de Químico Farmacuetico Biologo. ENEP Zaragoza. UNAM. 1989.

37.- Poller L. Et Al. Stability Of Reference Thromboplastins, The Lancet, January 21, 1978.

38.-Tocantins M.L. ; Progresos en Hematologia, editorial científico médica, Barcelona España, 1961 pp.

39.- Van Assendelft D.W., Et Al, Metodo recomendado para la determinacion de la concentracion de hemoglobina en sangre, Bioquímica, Vol 15 No.58 1990.

- 40.- Erslev J.A., Gabuzna G.T., Hematologia Aspectos Fisiopatológicos, Interamericana, Mexico D.F (1981) pp 173-188.
- 41.- Kaplan P.A. and Silverberg M., The Coagulation-Kinin Pathway of Human Plasma, Blood, Vol 70, No 1 (July), 1987: pp 1-15.
- 42.- Kenereth A.B and Rosenberg R.D., The Pathophysiologic of the Prethrombotic state in humans: Insights Gained From Studies Using Markers of Hemostatic System Activation, Blood, Vol 70, No 2 (August), 1987: pp 343-350.
- 43.- Turitto T.V, et al, Factor VIII/Von Willebrand Factor in Subendothelium Mediates Platelet Adhesion, Blood, Vol 65, No 4 (April) 1985: pp 823-831.
- 44.- Mariar R.A et al, Serial Studies of Protein C and its plasma inhibitors in patients with disseminated intravascular coagulation, Blood, Vol 66, No 1 (July), 1985, pp 59-63.
- 45.- Boerger L.M, et al, Oral Contraceptives and Gender Affect Protein C Status, Blood, Vol 69, No 2 (February) 1967, PP 692-694.
- 46.- Bayer A.K., Et al, Hemostatic Enzyme Generation in de Blood of patients with hereditary protein C deficiency, Blood, Vol 71, No 5 (May), 1988 pp 1418 - 1426 .
- 47.- Kane H.W. and Davic W.E., Blood Coagulation Factors V an VIII structural and Functional similarities and their Relationship to Hemorrhagic and thrombotic Disorders, Blood, Vol 71, No. 3 . (March) 1988 , pp. 539 - 555.
- 48.- Furie B. And Furie C.B., Molecular Basis of Vitamin K-Dependent Gamma Carboxylation, Blood, Vol 75, No. 9 (May), 1990: pp 1753-1762.
- 49.- Mann L.K. Et Al., Surface-Dependent Reactions of the Vitamin K-dependent Enzyme Complexes, Blood Vol. 76, No. 1, (July) 1990, pp 1-6.
- 50.- Bernard J. Et Al., Manual de Hematología, 3<sup>era</sup> ed., TORAY-MASSON, Barcelona España, (1982).
- 51.- Williams J.W, Et Al., HEMATOLOGY, 3<sup>rd</sup> edition McGraw-Hill, USA, (1976).