

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

DESARROLLO DE UN HEMOLIZADO PARA CONTROL DE CALIDAD EN LA
DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA POR EL MÉTODO DE
HEMOGLOBINCIANURO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

EVA GISELA LÓPEZ TORAL

Director de tesis: Q.F.B. Roberto Cruz González Meléndez.

Asesor de tesis: Q.F.B. María del Pilar Ortiz Hernández.

México, D.F.

Abril 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

277964



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 esta 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.

MENCIÓN DE AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi amor eterno a quienes me dieron la razón para iniciar mi formación profesional, el ánimo para continuarlo y la firmeza para concluir exitosamente uno de los objetivos más importantes en mi vida. Con orgullo:

A mis padres: Hernán y Evita.

A mis hermanos: José Alberto, Osiris, Hernán, Enrique y Diana.

A mis cuñados: Sergio, Juanita, Luz, Mary y Carlos.

A mis "pequeños diablillos" que son una cajita llena de esperanzas y alegrías: mis sobrinos.

... a todos ellos a quienes amo por sobre todas las cosas. Gracias por creer en mí, por ser mi fortaleza y por apoyarme en todo momento.

MENCIÓN DE AGRADECIMIENTOS

Con respeto y admiración a:

Q.F.B. Roberto González Meléndez, por todas las atenciones y el invaluable apoyo brindados durante todo el desarrollo del presente trabajo; por las distinciones que siempre tuviste hacia mi como persona y por el espacio dedicado en un breve lapso de nuestra existencia...

Gracias por todo lo que alguna vez me proyectaste.

Así mismo, deseo hacer patente mi deuda de gratitud a: Q.F.B. Cesar Escamilla Flores, quien contribuyó con su amplio conocimiento y su vasta experiencia haciendo múltiples sugerencias y aportaciones al presente trabajo. Gracias por tu desmedido interés para mi bienestar.

Expreso también mi deuda de gratitud a la excelente cooperación del Dr. Rubén Marroquín Segura (L-313, Inmunología), por las facilidades prestadas para el cumplimiento de parte de los objetivos planteados en el proyecto.

MENCIÓN DE AGRADECIMIENTOS

A mi adorada Q.F.B. Luz Margarita Chávez Martínez, por haberme recibido con los brazos abiertos y por toda la confianza que depositaste en mí aún sin conocerme.

Finalmente, quiero manifestar mi agradecimiento a quienes leyeron y examinaron críticamente el presente trabajo y me favorecieron con sus opiniones, permitiéndome así eliminar fallas y aclarar conceptos, lo que ha sido posible en forma bastante amplia gracias a:

Q.F.B. Roberto González Meléndez.

Q.F.B. María del Pilar Ortiz Hernández.

Q.F.B. Patricia Vidal Millán.

Q.F.B. Antonino Sáez Prieto.

Q.F.B. Diego Portela Camacho.

TABLA DE CONTENIDO

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	1
1. HEMOGLOBINA	3
2. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERADA	16
3. CONTROL DE CALIDAD	26
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
5. OBJETIVOS	42
6. HIPÓTESIS	43
7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	44
8. MATERIAL Y MÉTODOS	46
8.1. EQUIPO, MATERIALES Y REACTIVOS.....	46
8.2. PREPARACIÓN DEL HEMOLIZADO	51
8.3. ELECTROFORESIS SOBRE ACETATO DE CELULOSA	53
8.4. APARIENCIA	55
8.5. DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA POR EL MÉTODO DE HEMOGLOBINCIANURO	55
8.6. PRUEBA DE pH	57
8.7. LIMITES MICROBIANOS	58
8.8. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERADA	59

8.9. CONTROL DE CALIDAD EN LA DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA	62
9. RESULTADOS Y ANÁLISIS	63
10. CONCLUSIONES	90
11. OBSERVACIONES Y SUGERENCIAS	91
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
13. APÉNDICE	98

RESUMEN.

Se prepararon 3 lotes de hemolizado con el método de fabricación⁽³⁸⁾ establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y se sometieron a un estudio de estabilidad acelerada a condiciones de 4, 10, 25 y 37 °C utilizando como material de empaque frascos viales color ámbar. Los periodos de muestreo se realizaron cada semana y para cada temperatura se evaluó apariencia, pH, valoración de hemoglobina y límites microbianos. De acuerdo a los resultados obtenidos en la valoración de la hemoglobina y variación de pH, se procedió a obtener la media (\bar{x}) de los valores de los 3 lotes evaluados y con base al promedio se estableció que la reacción de degradación de la hemoglobina se ajusta a una cinética de orden 2, determinándose con ello un periodo de caducidad tentativo del producto de 304.3 días a 4 °C y 107.7 días a 10 °C, conservado en frascos viales color ámbar.

Considerando los resultados del estudio de estabilidad acelerada, se enviaron dos lotes de hemolizado (1 control normal y 1 control bajo) a dos laboratorios de análisis clínicos de la F.E.S. "Zaragoza" para ser evaluado como material de control de calidad en la determinación de hemoglobina mediante un estudio ciego. Con los resultados se determinaron las X, DE y CV, se realizaron los gráficos de control, y, de sumas acumuladas (CUSUM) con los valores asignados para cada control. Con esto se analizaron las situaciones críticas de cada laboratorio tomando las acciones correctivas correspondientes que incluyen un buen control de calidad en las mediciones, comprobándose con ello la utilidad del producto como muestra de control de calidad para cuantificar hemoglobina.

INTRODUCCIÓN.

La premisa fundamental del control de calidad es detectar errores por medio de los especímenes de control, los cuales reflejan las deficiencias que ocurren en el procesamiento de los especímenes de los pacientes. Respecto a lo anterior, la Organización Mundial de Salud (OMS), implantó el desarrollo de principios de operación estandarizada para promover la calidad en el laboratorio clínico⁽¹⁾, dando instrucciones para la preparación de los materiales para la calibración y control⁽²⁾ en las diversas áreas del mismo. Pese a esto, el control de calidad en hematología ha enfrentado el problema de la inestabilidad de los materiales de control. En este sentido, es importante hacer notar que la función primaria de un material de control es proveer un dato de referencia estable, con el cual pueden compararse preparados de material similar. De esto se deduce que la estabilidad es una condición primordial para que una muestra control sea útil⁽³⁾.

Aunado a esto, cabe aclarar que el desarrollo de cualquier producto que sea usado como material de control de calidad, antes de ser lanzado al mercado, debe ser sometido a estudios de estabilidad, con lo cual se pueda estar seguro de la utilidad de la muestra, y se garantice que la concentración de los analitos presentes en éste sea sostenida y no se producirán reacciones de degradación que traigan como consecuencia cambios en la presentación y apariencia

física del nuevo producto. Es importante mencionar que junto a los estudios de estabilidad del producto se considere la fecha de caducidad, dato necesario para proteger su calidad y pureza hasta el momento en que es usado.

En nuestro país, el estudio de la estabilidad de los componentes químicos de los materiales de control almacenados a temperaturas cercanas o superiores a 0 °C reviste un interés que rebasa el marco puramente académico ya que los laboratorios clínicos pertenecientes al primer nivel de atención solo tienen posibilidades de almacenamiento en este rango de temperatura.

Es por ello que el presente trabajo se enfoca a la elaboración de un hemolizado con todas sus etapas de desarrollo que van desde la fabricación pasando por el estudio de estabilidad acelerada como herramienta para evaluar la estabilidad de la hemoglobina en el producto terminado, hasta su prueba como material de control en la determinación de hemoglobina en laboratorios de análisis clínicos monitoreando los procedimientos realizados para garantizar que los valores analíticos producidos en el laboratorio son suficientemente viables y adecuados.

1. HEMOGLOBINA

1.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

La hemoglobina es una proteína conjugada, roja, presente en los hematíes. Ocupa el 28 % de la masa celular, el resto son principalmente agua (71%) y algunos lípidos (7% colesterol y lecitina). Tiene un peso molecular de aproximadamente 64, 500 daltons. Cada molécula de hemoglobina contiene una molécula de globina y cuatro moléculas de grupo hemo. El hemo, una protoporfirina, es el responsable del color del compuesto íntegro y consta de cuatro anillos protoporfirínicos; cada anillo contiene un átomo de hierro (Fe) en el centro^(4, 5, 6, 7, 8). Los cuatro grupos hemo están localizados en la superficie de la molécula casi esferoide de globina (figura I).

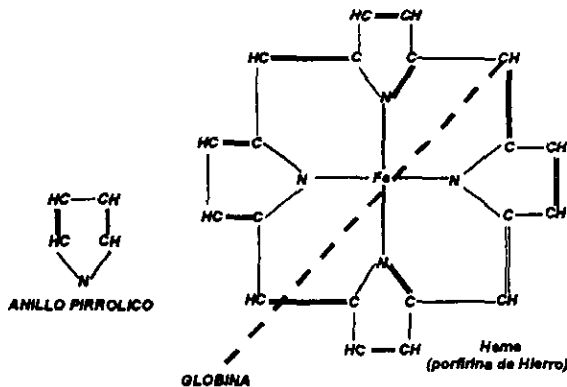


Figura I. Núcleo de porfirina de hierro. Existen cuatro de estos grupos hemo en cada molécula de hemoglobina, unidos a la proteína globina (Fuente: 16).

El hierro está presente en forma divalente (forma ferrosa) y a causa de su asociación con la globina, puede captar o ceder oxígeno sin producir ningún cambio en el grupo hemo y solo mínimos cambios en la configuración de la molécula de globina.

La hemoglobina normal del adulto (HbA_1) tiene dos pares de cadenas alfa y beta. La cadena alfa posee 141 ácidos aminados, en un orden bien conocido, que empieza con valina y termina con arginina. La cadena beta posee 146 ácidos aminados; también hay valina en un extremo, pero histidina en el otro. En el adulto existe además una pequeña cantidad de hemoglobina fetal (HbF) en la cual las dos cadenas beta son sustituidas por cadenas gamma. Otro componente secundario de la hemoglobina del adulto es HbA_2 , en la cual las cadenas beta son sustituidas por cadenas delta.

Se producen hemoglobinas anormales si el orden de ácidos aminados en la cadena peptídica difiere de las variedades alfa o beta habituales, o si deja de formarse una cadena, o se produce una recombinación anómala.

Debido a la estrecha asociación funcional de la globina y el hemo, cambios relativamente mínimos en cualquiera de los dos conducen a cambios fisicoquímicos en la molécula completa de hemoglobina modificando la oxigenación, solubilidad y curva de disociación del oxígeno. (4, 5, 6, 7, 8)

La hemoglobina es soluble en aproximadamente 7 partes de agua y se solubiliza lentamente en glicerol (5).

1.2. FUNCIÓN

La función de la hemoglobina es el transporte de oxígeno a los tejidos, la eliminación de anhídrido carbónico y la participación en la regulación ácido básica eliminando CO_2 en los pulmones y amortiguando los cambios de pH por acción de los grupos histidinimidazol de la hemoglobina. Esta regulación se logra por medio de la enzima intraeritrocitaria: la anhidrasa carbónica, que cataliza el dióxido de carbono y lo transforma en ácido carbónico. Los hidrogeniones del ácido carbónico son entonces tamponados por la desoxihemoglobina, moderadamente alcalina, y el ión bicarbonato difunde hacia el plasma (8,9).

1.3. VIA DE DEGRADACIÓN

El sistema reticuloendotelial degrada la hemoglobina liberada de las células. En primer lugar el hierro es liberado y transportado a la médula ósea para la reincorporación al hemo nuevamente sintetizado. Parte de este hierro puede entrar en el plasma en forma de ferritina. Alternativamente, una cierta porción del hierro puede permanecer almacenado, como ferritina o hemosiderina, dentro de las células reticuloendoteliales. Las cadenas peptídicas de la globina son hidrolizadas a sus componentes aminoácidos que entran de nuevo en el reservorio metabólico general para la síntesis de proteínas. El anillo porfirínico del hemo es degradado primero a biliverdina, un compuesto tetrapirrólico de cadena abierta, y pronto es reducido a bilirrubina (figura II), compuesto que debe ser transportado

al hígado para su excreción en la bilis y ulteriormente reducida por las bacterias aerobias en el colon a urobilinógeno^(3,7,8).

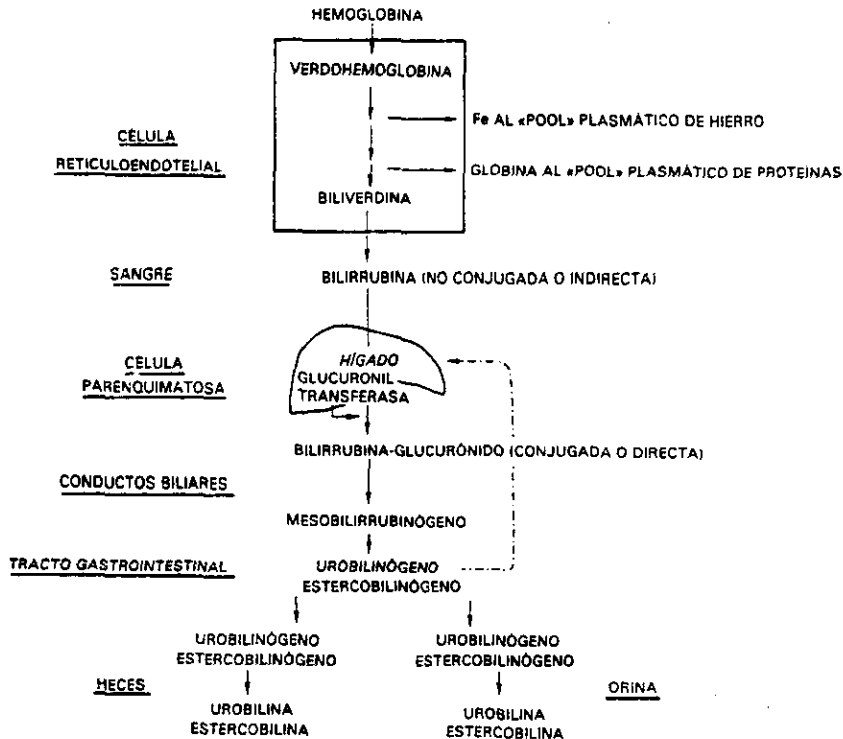


Figura II. Vía de degradación de la hemoglobina (Fuente:⁽⁴⁾).

El monóxido de carbono es generado constantemente con la conversión del hem a biliverdina, por eliminación oxidativa del átomo de carbono del puente alfa del hemo. Este monóxido de carbono es transportado como carboxihemoglobina a los pulmones y es excretado con el aire espirado^(3,7,8).

1.4. VALORES DE REFERENCIA

En unidades convencionales la hemoglobina se mide en gramos por decilitro (g/dl) y en el Sistema Internacional las unidades son milimoles por litro (mmol/L), y representa la cantidad de esta proteína por unidad de volumen. Este es un parámetro importante a emplear para determinar si hay o no anemia, es decir, si las cifras de hemoglobina son inferiores a los valores normales puede asegurarse que existe anemia. Las cifras "normales" o de "referencia" de la hemoglobina son variables y dependen de diversos factores que afectan su concentración, entre los cuales se citan los siguientes: edad, sexo, ejercicio, variaciones a lo largo del día, altura del sitio de residencia, etc. A la altura de la ciudad de México (2240 m sobre el nivel del mar), las cifras inferiores normales de hemoglobina en adultos sanos son de 12.5 g/dl (7.8 mmol/L) para mujeres y de 15.5 g/dl (9.6 mmol/L) para varones⁽¹⁰⁾. Las cuantificaciones de hemoglobina inferiores a las mencionadas permiten establecer el diagnóstico de anemia. Las cifras de hemoglobina superiores a 16.6 g/dl (10.3 mmol/L) para mujeres y 19.5 g/dl (12.1 mmol/L) para varones permiten establecer el diagnóstico de eritrocitosis, a la altura de la ciudad de México.

En la medición de hemoglobina es necesario establecer los valores de referencia, tomando en cuenta las variables antes anotadas. Para el caso específico de la variable altura del sitio de residencia existen ecuaciones algebraicas que permiten calcular los valores de referencia de cada uno de los parámetros e índices eritrocíticos

^(10, 11, 12, 13) -

1.5. HEMÓLISIS

La destrucción de los hematíes lleva consigo la pérdida de integridad de la membrana y la liberación de hemoglobina. La destrucción de células en desarrollo antes de que sean liberados de la médula ósea se conoce como *eritropoyesis ineficaz*. Si se destruyen células circulantes maduras antes de llegar a los 120 días de vida media, el proceso se llama *hemólisis*. La *eritropoyesis ineficaz* refleja siempre cualquier defecto congénito o adquirido en el desarrollo celular. Por otro lado la *hemólisis* puede reflejar una destrucción acelerada de hematíes intrínsecamente defectuosos, o bien el efecto dañino de algunos procesos extrínsecos sobre hematíes normales^(3,4,14).

Los términos *hemólisis intravascular* y *hemólisis extravascular* se refieren al lugar de destrucción del glóbulo rojo: en la circulación o fuera de ella respectivamente⁽³⁾. Así la *hemólisis intravascular* es el final habitual de la sensibilización de los eritrocitos por el complemento. La lisis de los eritrocitos tiene lugar normalmente por medio de la vía clásica.

En la *hemólisis extravascular* la destrucción de los eritrocitos se produce generalmente por fagocitosis. Los eritrocitos con el complemento fijado pueden ser atacados, por tanto por dichas células⁽³⁾.

Tanto la *hemólisis* como la *eritropoyesis ineficaz* requieren la existencia del sistema para eliminar la hemoglobina liberada de las células dañadas y para reemplazar o reponer la capacidad de transporte de oxígeno. Ciertas anormalidades metabólicas o

estructurales hacen a los glóbulos rojos anormalmente susceptibles a una hemólisis *in vitro*, así como una destrucción *in vivo* ⁽³⁾.

La cuantificación y diferenciación de las diferentes hemoglobinas precisa de una sangre hemolizada. En la mayor parte de los métodos la sangre anticoagulada se concentra por centrifugación y se hemoliza por adición de agua y tolueno o tetracloruro de carbono. Glóbulos blancos, plaquetas, estroma y proteínas plasmáticas se remueven por centrifugación pues interfieren en el filtrado ^(5,6).

1.6. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

Para la identificación de las diferentes hemoglobinas (normales y anormales), se incluyen métodos electroforéticos, no electroforéticos, análisis estructural y otros.

Los métodos electroforéticos en general separan hemoglobinas con base a las diferencias en carga eléctrica. Los métodos electroforéticos específicos pueden variar la fuerza del campo eléctrico, el pH, el tipo de amortiguador o el medio de soporte utilizado ^(4,6,15,16).

Para la cuantificación de fracciones de hemoglobinas individuales se utilizan métodos no electroforéticos. La prueba

de solubilidad, cromatografía en columna y desnaturalización alcalina son las más empleadas para las hemoglobinas S, A₂ Y F, respectivamente.

En estudios de comparación de métodos para identificar y cuantificar hemoglobina, se demostró que la electroforesis en acetato de celulosa identificaba y separaban correctamente todas las muestras de hemoglobina analizadas. Por esta razón el método de elección para la identificación de hemoglobina en este trabajo es la electroforesis en acetato de celulosa^(4, 5, 15, 16).

1.6.1. ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA

PRINCIPIO

La localización de diferentes especies moleculares de hemoglobina con técnicas electroforéticas, se basa en sus diferentes patrones de migración en un campo eléctrico. Dichas diferencias en las velocidades de migración son consecuencia de las cargas eléctricas de cada variante de hemoglobina, originadas por diversas sustituciones de aminoácidos en las cadenas polipeptídicas de la molécula. Las bandas de hemoglobina separadas se tiñen entonces con el colorante Ponceau S y se identifican por comparación con patrones conocidos de hemoglobina separados y teñidos de la misma forma^(4, 13, 17).

GENERALIDADES

La electroforesis en acetato de celulosa proporciona un método de identificación y cuantificación práctico, rápido, barato y reproducible separando las hemoglobinas S, F, C, A y A₂

(17) .

Hay muchos tipos diferentes de hemoglobina que resultan de las variaciones en la estructura de los aminoácidos en la porción globina de la hemoglobina. La forma más común de la hemoglobina normal que hay en el adulto es la hemoglobina A₁. Otras dos hemoglobinas normales que se encuentran solo en cantidades residuales en el adulto son A₂ y F (hemoglobina fetal).

Luego de la electroforesis, en la mayoría de los procesos se requiere una fijación (desnaturalización) de la hemoglobina, seguida de la tinción con colorantes para proteínas como el Ponceau S, para la mejor visualización de las fracciones separadas. La posición e intensidad de las bandas de hemoglobina resultantes se comparan con estándares conocidos (16) .

INTERPRETACIÓN

Todas las hemoglobinas se desplazan del punto de aplicación de la zona catódica o polo negativo (-) hacia el ánodo o polo positivo (+) en un sistema electroforético con una velocidad proporcional a la fuerza de su carga. El punto de aplicación puede ser poco visible y puede haber al mismo nivel una banda igualmente desviada no hemoglobínica de anhidrasa carbónica.

Las hemoglobinas A y F pueden no separarse adecuadamente si el hemolizado contiene cantidades normales de Hb F o si contiene grandes cantidades de una y pequeñas cantidades de la otra, puesto que estas dos hemoglobinas se mueven o desplazan juntas

(6) .

1.7. HEMOGLOBINOMETRÍA

DEFINICIÓN

La medición de la concentración de hemoglobina en sangre se conoce como hemoglobinometría ^(6,17) .

En la mayor parte de los laboratorios, los procedimientos manuales tradicionales para la determinación de la concentración de hemoglobina, han sido sustituidos por técnicas automatizadas que ofrecen varias ventajas, por ejemplo, disminución en los costos que implica la determinación, ahorro de material de vidrio, exactitud aunada a mayor velocidad de proceso, aumento en la reproducibilidad de los resultados. No olvidando que los equipos automatizados precisan una estandarización cuidadosa y una calibración exacta.

Existen diferentes métodos de cuantificación para hemoglobina, sin embargo el método colorimétrico es el más utilizado en esta determinación⁽¹⁵⁾ y solo hay dos métodos aceptables para la hemoglobinometría clínica:

- la medición espectrofotométrica como cianometahemoglobina.

Con el método de la oxihemoglobina se mide la hemoglobina capaz de ser convertida en oxihemoglobina; no sirve para precisar la carboxihemoglobina ni otros compuestos hemoglobínicos anómalos.

Con el método de la cianometahemoglobina (Hemoglobincianuro) se mide toda la hemoglobina y los derivados hemoglobínicos, con la posible excepción de la sulfohemoglobina. Cada método tiene su parte positiva.

La medición de la oxihemoglobina representa la capacidad de la sangre como portadora de oxígeno, prescindiendo de compuestos hemoglobínicos sin actividad fisiológica. Desde el aspecto fisiológico es más importante la cantidad de hemoglobina capaz de combinarse con el oxígeno que la hemoglobina total.

El método de hemoglobincianuro mide la hemoglobina total, ya sea activa o pasiva en el transporte de oxígeno, y aporta datos más fiables para el cálculo de HMC (Hemoglobina corpuscular media) y CHCM (Concentración de hemoglobina corpuscular media). Una ventaja de este método radica en la existencia de un estándar comercial de cianometahemoglobina, el cual hace posible que los laboratorios más pequeños dispongan de un método sencillo para calibrar los espectrofotómetros y comprobar periódicamente los resultados (6,17,18) -

1.8. MÉTODO DE HEMOGLOBINCIANURO (HiCN)

Este método es el resultado de la necesidad de mejorar la estandarización de las alteraciones de hemoglobina; es actualmente el método de elección.

El método HiCN fue recomendado por el International Committee for Standardization in Hematology, en 1966, y fue modificado en 1977 (ICSH, 1978). Tiene la ventaja de la comodidad y de una solución estándar estable y fácilmente disponible⁽¹⁷⁾.

Las soluciones de hemoglobincianuro son las más estables de los diversos pigmentos hemoglobínicos. Puede afirmarse que estas soluciones se mantienen estables por un periodo de no menos de seis meses en refrigeración. Otra ventaja de las soluciones de hemoglobincianuro es que se pueden estandarizar exactamente. La banda de absorción de la cianometahemoglobina en la región de 540 nm es más bien ancha que estrecha y, por consiguiente, sus soluciones pueden emplearse en fotómetros de filtro y en espectrofotómetros de banda estrecha ⁽¹⁷⁾.

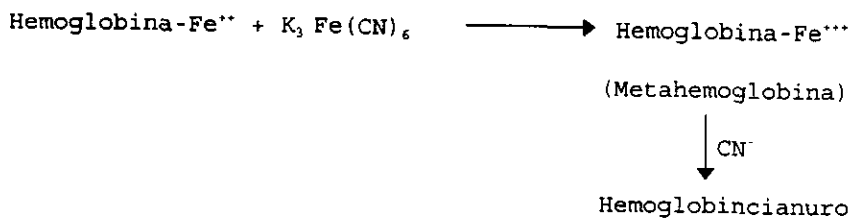
FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los eritrocitos son lisados por acción de un detergente tensoactivo presente en el reactivo de Drabkin, liberando su contenido de hemoglobina en la solución.

La hemoglobina liberada es oxidada a metahemoglobina por el ferrocianuro, siendo esta última convertida en hemoglobincianuro

(compuesto estable) por la presencia de cianuro. La absorbancia de hemoglobincianuro es medida a 540 nm, siendo la intensidad del color obtenida, directamente proporcional a la concentración de hemoglobina en la muestra (4, 17, 18, 19).

Reacción de Drabkin:



Una vez descritas las generalidades de la hemoglobina sobre su estructura, función y métodos de cuantificación entre otros, a continuación se consideran los puntos más importantes que contemplan un estudio de estabilidad acelerada para determinar las condiciones óptimas de almacenamiento de un producto y su periodo de caducidad.

2. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERADA

La estabilidad puede definirse como la propiedad de un medicamento o producto biológico contenido en un envase de determinado material para mantener durante el tiempo de almacenamiento y uso las características físicas, químicas, fisicoquímicas, microbiológicas y biológicas entre los límites especificados ⁽²⁰⁾.

Los estudios de estabilidad acelerada están diseñados para incrementar la velocidad de degradación química y/o biológica o el cambio físico de un medicamento o producto biológico, por medio del empleo de condiciones exageradas de almacenamiento. Con base en los resultados de estos estudios, se establece un periodo de caducidad, que es el tiempo estimado durante el cual el lote de producto permanece dentro de las especificaciones si se conserva bajo condiciones de almacenamiento normales o particulares ^(20, 21).

Cuando se habla de "condiciones extremas", el término se refiere a condiciones realmente degradativas de la formulación, aunque sean muy anormales con respecto a las condiciones naturales, puesto que lo que se pretende es determinar los parámetros que deterioran eficazmente al producto en estudio.

El estudio de estabilidad de un producto debe incluir las

pruebas para las características propias específicas de la forma de presentación del mismo, es decir, si se presenta en forma líquida, polvo y/ liofilizados, etc. En este caso la forma de presentación del producto es líquida^(20,22), por lo que los parámetros a evaluar son:

- Identificación del activo (hemoglobina)
- concentración
- características organolépticas
- pH
- límites microbianos.

Los estudios de estabilidad acelerada se deben llevar a cabo en tres lotes piloto o de producción con la formulación y el material de envase primario.

Los resultados del estudio de estabilidad acelerada se deben confirmar con un estudio de estabilidad a largo plazo (tiempo real), es decir, que se evalúen las características físicas, químicas, fisicoquímicas, biológicas o microbiológicas del producto durante el periodo de caducidad bajo condiciones de almacenamiento normales o particulares ⁽²⁰⁾.

2.1. ESTABILIDAD DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

La función primaria de un material de control es proveer un

dato de referencia estable, con el cual puedan compararse preparados de material similar. De esto se deduce que la estabilidad es una condición primordial para que una muestra control sea útil.

En general se preparan con alto grado de pureza y se eliminan al máximo todos los factores susceptibles de causar deterioro: calor, luz, humedad, oxígeno, contaminación microbiana, etc.

Con respecto a esto se trata de guardar el material de control a bajas temperaturas, en resguardo total de la radiación luminosa, se prepara y envasa en condiciones asépticas, etc. (21, 22).

Existen diversos métodos para evaluar la estabilidad de las muestras biológicas, sin embargo, el que ofrece mayores ventajas es el de envejecimiento acelerado por temperatura (22).

2.2. MÉTODO DE ENVEJECIMIENTO ACELERADO POR TEMPERATURA

Generalmente los procesos de degradación son reacciones químicas que consumen energía y que pueden acelerarse por aumento de la temperatura. La mayoría de los métodos por envejecimiento acelerado toman en cuenta este hecho y se fundan en mediciones de la velocidad de degradación a temperaturas superiores a la normal, para luego sacar inferencias de lo que sucedería a la temperatura ambiente (22, 23).

En general, este método es aplicado eficazmente para la predicción de la estabilidad de muestras biológicas (22).

2.3. DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS

La pérdida de estabilidad molecular de las proteínas ya sea por intervención de factores químicos o físicos traen como resultado problemas de bajas de concentración del activo y formación de otros productos de degradación del mismo.

La desestabilización química involucra cambios en sus enlaces covalentes, y, la física involucra cambios en la estructura tridimensional (espacial) provocando desnaturalización (22, 23, 24).

Los mecanismos de degradación química han sido investigados por diversos autores y los más comunes incluyen: hidrólisis y oxidación. No obstante, existen diversos factores que pueden ayudar a la estabilización de las proteínas (24, 25, 26), tales como:

- El mantenimiento de pH (encontrar el pH de máxima estabilidad),
- Temperatura de almacenamiento adecuados,
- % de humedad, etc.

Por ello resulta necesario realizar un estudio que permita establecer las condiciones óptimas de almacenaje y preservación de estos componentes.

2.4. CINÉTICA QUÍMICA

Todos los métodos aplicables a la predicción de un periodo útil están basados en principios fisicoquímicos, ya que la reacción comprende una o más reacciones cuya velocidad puede calcularse cinéticamente. La cinética es una disciplina fundamental y se hace imprescindible un conocimiento básico a fin de poder interpretar los resultados de un estudio de estabilidad de cualquier producto. Desde el punto de vista técnico, tiene varios objetivos:

- a) Obtener experimentalmente los datos cinéticos.
- b) Correlacionarlos mediante ecuaciones matemáticas.
- c) Proponer el mecanismo de la reacción o las reacciones.
- d) Diseñar las experiencias necesarias para confirmar la o las hipótesis propuestas.
- e) Establecer las condiciones para acelerar o disminuir la velocidad de la reacción según requerimientos preestablecidos.

Así, estudiando el mecanismo de degradación, se obtiene suficiente información como para lograr mayor estabilidad en formulaciones inestables ^(21, 22).

2.4.1. VELOCIDAD DE REACCIÓN

Es la velocidad con la cual cambia la concentración de una

sustancia que interviene en esa reacción. La sustancia en cuestión puede ser un reactivo o un producto de la reacción. Es de interés para la cinética determinar los caminos por los cuales se puede llegar del estado inicial al estado final^(21, 22, 27).

En la reacción: $A + B \longrightarrow C$

A y B son reactivos y C es el producto. La velocidad de reacción puede definirse como la velocidad de desaparición de A, la velocidad de desaparición de B o bien, la velocidad de aparición de C como producto.

Lo anterior puede esquematizarse de la siguiente manera:

$$V = \frac{-d(A)}{dt} = \frac{-d(B)}{dt} = \frac{d(C)}{dt}$$

2.4.2. ORDEN DE REACCIÓN

El concepto está basado en mediciones cinéticas, y se refiere al número de moléculas de cuya concentración depende la velocidad de reacción.

Así, en una reacción de orden cero, la velocidad de reacción es independiente de la concentración de los reactivos^(22, 27). La ecuación matemática que indica esta independencia es:

$$V = K$$

Si llamamos X a la concentración inicial de sustancia reactiva, puede abreviarse diciendo que la velocidad de disminución de X es independiente de esta, o sea, constante:

$$\frac{-dx}{dt} = K \quad \text{ó} \quad -dx = K \cdot dt$$

La forma integrada de la ecuación usando como límites la concentración inicial (Co) y la concentración al tiempo t(C) queda de la siguiente manera:

$$K = \frac{C_0 - C}{t}$$

La representación de la concentración en función del tiempo, en una reacción de orden cero, es una recta cuya pendiente es la constante de velocidad de reacción (-K), y la ordenada al origen, la concentración inicial (Co), cabe destacar que esta va a ser siempre una recta de pendiente negativa (-K), de modo que la constante de velocidad de reacción (K) será invariablemente positiva_(22, 27).

En una reacción de primer orden la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de uno de sus reactivos_(22, 27). En forma general, la expresión de velocidad de una reacción de primer orden:

$$\ln C = \ln C_0 - Kt \quad \text{ó} \quad K = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C}$$

La representación del logaritmo natural de la concentración actual en función del tiempo es una recta de pendiente igual a $-K$.

En una reacción de *segundo orden*, la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de dos reactivos o a la segunda potencia de uno de ellos^(22,27), lo que se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$1/C = 1/C_0 + Kt$$

La inversa de la concentración en función del tiempo es una recta de pendiente K y ordenada al origen $1/C_0$.

2.4.3. MÉTODO DE ARRHENIUS

La relación cuantitativa entre velocidad de reacción y temperatura dada por la ecuación de Arrhenius es:

$$K = A e^{-AH/RT}$$

$$\ln K = \ln A - \frac{AH}{RT}$$

RT

donde AH es la entalpía de activación, A una constante, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta. De la ecuación se deduce que si se representa ln K en función de 1/T se obtiene una recta de pendiente AHa/RT_(22,27).

Asimismo, si se conocen A y AH se puede calcular la velocidad de reacción a la temperatura que desee.

Para la aplicación correcta del método de Arrhenius deben tomarse en cuenta algunas consideraciones_(22,27):

- Seguridad sobre el orden de reacción. Para ello es necesario que la reacción haya avanzado lo suficiente, ya que en el primer 10 % de reacción es muy difícil distinguir un orden de otro. Una descomposición del 50 % es adecuada, aunque en algunas casos pueden obtenerse buenos datos con el 30 ó 35 %, pero no con un porcentaje menor.
- Exactitud en la medición de las temperaturas. Esto es tanto más necesario cuanto menor sea la diferencia entre una y otra.

Cuando el estudio de estabilidad acelerada se ha concluido y se han establecido las condiciones de almacenamiento y en este caso el periodo de caducidad del nuevo producto, puede salir al mercado para ser empleado como material de control de calidad indicando en la etiqueta las condiciones en que deberá ser conservado. Este control de calidad tiene varias facetas, los cuales son abordados en el siguiente capítulo.

3. CONTROL DE CALIDAD

3.1. DEFINICIÓN

Son las técnicas operativas y actividades necesarias para cumplir con los requisitos de calidad y concierne al monitoreo diario de los procedimientos realizados para asegurar que los productos finales, es decir, los valores analíticos regularmente producidos por un laboratorio clínico, sean suficientemente viables y adecuados a la finalidad que persiguen ^(1,3).

3.2. ANTECEDENTES

El control de calidad se remonta a los primeros esfuerzos de producción del género humano, no obstante, el concepto a pesar de ser tan viejo, se comenzó a aplicar hasta los comienzos de la producción en masa y la aparición de industrias que utilizaban el término "control de calidad" ⁽²⁰⁾.

Los principios básicos del control de calidad industrial fueron sentados por Walter A. Shewhart, en 1924, con la técnica de marcar datos estadísticos en gráficos especiales, de tal manera que contribuyeran al control de la calidad; a pesar de la comprobada efectividad del control de calidad estadístico, se tardó un tiempo mucho más prolongado para que los laboratorios clínicos adoptaran programas de control de calidad para sus análisis de rutina. El primer avance importante en este campo se produjo en 1950, cuando Levey y Jennings introdujeron la idea

de analizar un suero control cada día y representar los resultados graficamente sobre las gráficas de control o gráficos murales (28, 29) .

Posteriormente, en 1953, se comenzó a disponer comercialmente de sueros control. Grannis, en 1977, hizo una revisión de los mecanismos de desarrollo de los sistemas de control de calidad en la química clínica. En las últimas décadas la conciencia de la necesidad de un buen programa de control de calidad ha aumentado constantemente.

Respecto a esto la Organización Mundial de la Salud (OMS) implantó el desarrollo de principios de operación estandarizada para promover la calidad en el laboratorio clínico. El manejo de la calidad, que incluye los conceptos más tradicionales del control de calidad, el aseguramiento de la calidad y la evaluación externa de la calidad es un tratamiento integrado para obtener los estándares más altos del trabajo, la organización y todas las demás funciones del laboratorio (1) .

3.3. OBJETIVOS DEL CONTROL DE CALIDAD

El estado del paciente, la toma de la muestra, el manejo manual o automatizado de la identidad del paciente y de la muestra, su análisis, la validación y la transmisión de los

resultados; crean situaciones susceptibles de error que deben ser previstas y corregidas oportuna y escrupulosamente. En contraste con otras situaciones analíticas en las cuales el tiempo no es crítico y los análisis pueden repetirse tantas veces como sea necesario, el laboratorio clínico debe asegurarse de que sus resultados son completamente válidos tan pronto como son producidos^(30,31).

El control de calidad se ha convertido en una necesidad imprescindible en la práctica del laboratorio clínico, y los objetivos generales son los de asegurar la confiabilidad de resultados y el funcionamiento eficiente del laboratorio, detectando oportunamente los errores que se presenten en el proceso analítico, de manera que los médicos reciban resultados válidos o confiables y oportunos, de modo que puedan influenciar las decisiones médicas^(30,31).

Es necesario asegurar que se preste la debida atención a las fases pre-analítica, analítica y post-analítica en el tratamiento de las muestras para garantizar lo antes mencionado. Así, en términos generales:

FASE PRE-ANALÍTICA

Comprende el asegurar la apropiada recolección, transporte, almacenamiento y muestreo de los especímenes y hacer notar que todo esto es responsabilidad del laboratorio⁽¹⁾.

FASE ANALÍTICA

Incluye los criterios de desempeño y el control en la ejecución de todos los métodos analíticos incluyendo aquellos utilizados en emergencia. En la fase analítica se realizan las mediciones y observaciones en las diversas áreas que cubre el laboratorio y los procedimientos de control de cada uno de ellos⁽¹⁾.

FASE POST-ANALÍTICA

Independientemente del cuidado y la atención que se hayan dedicado a la fase pre-analítica y analítica, se deben tomar varios pasos importantes durante la fase post-analítica para asegurar la calidad y utilidad de los resultados de las mediciones de laboratorio. Esta fase incluye: confirmación de los resultados, intervalos de referencia, puntualidad, reporte de los resultados, confidencialidad.

Cada uno de estos puntos requiere de procedimientos y decisiones cuidadosos para incrementar la calidad de los resultados⁽¹⁾.

3.4. PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD

El programa de control de calidad debe estar escrito y debe comprender los siguientes aspectos⁽¹⁾:

- El material que se usa para el control de calidad y su forma de preparación.
- El método para establecer los valores aceptables, media, y desviación estándar, para el control de calidad.
- Especificar la frecuencia con que se deben analizar los materiales de control de calidad y la posición de estas muestras en cada corrida.
- Describir el proceso de decisión que se va a seguir para determinar si se acepta o se rechaza una corrida, y los procedimientos correctivos que se deben usar cuando los resultados se salen de los límites aceptables.
- Establecer la frecuencia de supervisión del control de calidad y los criterios que se deben usar en la misma.
- Describir la forma de presentación gráfica y los análisis estadísticos apropiados.

Una premisa básica del control de calidad es que los valores analíticos registrados por el laboratorio debieran corresponder exactamente a los valores correctos o esperados (3).

Para obtener los mejores resultados posibles en los análisis, un programa total de control de calidad deberá incluir distintos aspectos del funcionamiento adecuado del laboratorio con principios importantes:

- a) Procesamientos apropiados pre y postanalíticos de las muestras y los resultados de los análisis.
- b) Adquisición y preparación de los suministros de laboratorio de buena calidad.
- c) Métodos para detección de errores, tales como análisis de sueros control normales y anormales día a día, lo que permite mantener precisión y exactitud en todos los análisis.
- d) Decisiones a tomar cuando se presenten análisis fuera de control.
- e) Participación en programas de evaluación externas.
- f) Mantenimiento preventivo de instrumentos y equipos.
- g) Programas de entrenamiento y educación continua para personal del laboratorio.
- h) Documentación de la ejecución y resultados del programa de control de calidad.

Este plan debe aplicarse a todos los laboratorios clínicos con independencia de su importancia (30, 31).

Un buen programa de control de calidad produce resultados analíticos más exactos y la recompensa incluye al cuerpo clínico, al paciente y al personal de laboratorio.

3.5. MATERIALES DE CONTROL

Los materiales de control son las preparaciones utilizadas como controles de la exactitud y la precisión en las mediciones de diversos analitos en fluidos, secreciones, excreciones o tejidos corporales.

Algunas de las características de los materiales utilizados como control son los siguientes:

- Pueden ser especímenes o simular ser especímenes de pacientes: suero, líquido cefalorraquídeo, sangre, extractos de tejidos, etc., que contienen el o los analitos que van a investigarse.
- Los materiales para el control de la exactitud deben tener valores para los analitos presentes en ellos, asignados para mediciones múltiples para cada método o instrumento de

- medición especificados, realizados en laboratorios de referencia.
- Los niveles de concentración de los analitos deben corresponder a los de significancia y decisión médica.
- Debe conocerse su origen y en la mayoría de los casos la concentración de el o los analitos que contienen.
- Deben manipularse en condiciones asépticas y almacenarse a temperaturas de refrigeración.
- Deben estar libres de contaminación microbiana.
- Los materiales de control deben manipularse como si fueran capaces de transmitir el antígeno de la hepatitis y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

En este sistema de control interno, cada analista en el laboratorio clínico incluye las muestras de control de calidad en cada estudio analítico de modo sistemático. Los valores esperados para estas muestras son conocidos por el analista; el propósito de las muestras control es el de ayudar al analista a decidir si el sistema está produciendo resultados analíticamente confiables para el agente analizado (3).

La elaboración de las muestras control diarias constituye una función especializada que debe incluirse en el protocolo ordinario del personal o asignarse a un único individuo. Si no se toman precauciones como esta, cada resultado cuestionable puede "explicarse" como una muestra control errónea, pudiendo permanecer indetectables algunos problemas analíticos reales.

En el laboratorio clínico, el valor observado en un material biológico determinado del paciente está sujeto a varianza; mediante el uso de técnicas de control de calidad, se intenta medir esa varianza. Estas técnicas permiten al personal del laboratorio evaluar la confianza que puede depositar en el resultado de un paciente en particular ⁽¹²⁾.

Resulta factible considerar a continuación algunas técnicas de control de calidad necesarias para controlar un método analítico.

VARIANZA BAJO CONDICIONES ÓPTIMAS (VCO):

Al considerar un método analítico, la primera etapa es la determinación de la varianza bajo condiciones óptimas.

A este nivel, el objetivo es tratar de repetir los análisis en

las condiciones operatorias lo más ideales y constantes posibles, de ahí el término "condiciones óptimas". Tales técnicas implican que los análisis deben practicarse tan próximos en el tiempo como sea posible y bajo condiciones analíticas estables, de tal manera que la varianza en los resultados sea la más baja que un laboratorio clínico en particular puede alcanzar para un método analítico determinado y para esto es importante considerar las siguientes medidas⁽³²⁾:

- Utilizar el mismo aparato para todas las determinaciones
- Utilizar reactivos recientes y comprobados
- Practicar los análisis en material estable y homogéneo
- Comprobar las lecturas de los instrumentos y cálculos
- Practicar los análisis en el menor tiempo posible
- Controlar cuidadosamente la temperatura y el tiempo y evitar la luz excesiva
- Asegurarse de mezclar apropiadamente todos los reactivos
- Utilizar personal con experiencia, etc.

Después de haber realizado los análisis, se realizan los cálculos estadísticos que corresponden y los gráficos para determinar el paso a la siguiente fase del control que es la *variación en condiciones de rutina*₍₃₂₎.

VARIANZA BAJO CONDICIONES DE RUTINA (VCR):

El empleo de esta técnica involucra dos aspectos importantes para el control de calidad de los resultados de un método analítico: el uso de material de control a más de una concentración y el asegurarse de que los valores son desconocidos por el analista. Por estas razones, a estos métodos se les conoce como *varianza bajo condiciones de rutina en valores desconocidos* (VCRD)₍₃₂₎.

El material de control no debe recibir tratamiento especial por parte del personal de laboratorio. En la realidad, cierta dosis de tratamiento especial, probablemente resulta inevitable; no obstante, a pesar de este problema, la información que se obtiene de dichos análisis es extremadamente valiosa, y permite cubrir en gran parte los objetivos del control de calidad₍₃₂₎.

3.6. GRÁFICOS DE CONTROL

En la mayoría de los procedimientos utilizados para el control de calidad, los errores que afectan un lote de resultados de los pacientes, se detecta al examinar los resultados de los especímenes de control, analizados en la misma corrida o lote o serie de especímenes de pacientes. Estos resultados de los especímenes de control, son "muestras" en el sentido estadístico y el analista tiene que decidir en bases estadísticas, cuando la muestra pertenece a la misma población de muestras de los resultados de los especímenes de control que los que se obtuvieron en el estado inicial de definida ejecución^(1,30).

Las pruebas estadísticas deben efectuarse por cálculos, o de una manera más simple y rápida, graficando los resultados en carta de control.

La gráfica de control es una herramienta muy importante para el control de calidad. Básicamente, es una gráfica x-y en la que el periodo de las observaciones se grafica en la abscisa y los valores medidos x/unidad así como $(x-\bar{x})_s$ en la ordenada. Así se puede observar la distribución, a lo largo del tiempo, de los resultados obtenidos en el material de control.

De particular interés son las dos zonas de alarma entre los

límites $\bar{X}-3s$ hasta $\bar{X}-2s$ y $\bar{X}+2s$ hasta $\bar{X}+3s$. Si los valores tienen una distribución normal y el procedimiento de medición es estable, el 95 % de los valores caerán dentro de $\bar{X}\pm 2s$. Esto significa que en promedio una de cada 20 determinaciones darán un valor por fuera de estos límites sin que el proceso esté fuera de control. El término alarma se refiere a que un valor que caiga por fuera de esta zona debe indicarle al operador que hay sospecha de algún problema en el proceso, a pesar de la probabilidad estadística de que pueda ocurrir. Por otro lado, la probabilidad de que un valor control caiga fuera del límite de $\bar{X}\pm 3s$ por azar es de 1 en 330. Esta probabilidad es tan baja que no puede aceptarse desde el punto de vista del funcionamiento del laboratorio y por lo tanto se requiere acción correctiva^(1,33).

34.35) •

Después de las consideraciones anteriores se pueden definir zonas aceptables, de alarma y de acción. El objeto es que los valores de control caigan dentro de la zona aceptable. Si la cantidad de valores en la zona de alarma es mayor a la esperada estadísticamente (1/20) se considera como indicativo de que hay algún problema; si alternan entre los límites superiores e inferiores, el problema es de precisión; si se sitúan de un solo lado del promedio es un problema de exactitud⁽¹⁾.

Es esencial que los datos de control de calidad se presentan de una manera efectiva que facilite su rápida interpretación, toma de decisiones y sirvan para la educación continua.

3.7. RECOMENDACIONES GENERALES

Se recomienda que las cartas de control se coloquen cerca del área en la que se realizan los análisis. Si las cartas de control se trazaran con estadísticas tales como rango o desviación estándar, los datos originales deben estar a la vista para cualquier inspección^(30, 31).

Las cartas deben estar marcadas con los registros de los eventos que hayan influenciado la ejecución, tales como: estándares nuevos de calibración o reparación de los instrumentos.

Para evaluar los resultados del control de calidad se hacen las siguientes recomendaciones de tipo general^(30, 31, 36, 37):

- Si los resultados de los controles de calidad, tanto normal como anormal, están entre el valor medio $\pm 2DS$ (desviación estándar), se pueden reportar las muestras de los pacientes.
- Si ambos controles están por fuera del límite de $\pm 2DS$, es necesario retener los resultados de los pacientes y buscar la falla del método o del instrumento. Si ambos controles se encuentran por fuera en una misma dirección, esto es altamente indicativo de un error sistemático. Luego de que se haya solucionado el problema, se debe repetir la tanda completa de pacientes y controles.

Si un control está dentro del límite de $\pm 2DS$, y el otro está por fuera, pero dentro de $\pm 3DS$, hay dos opciones: la primera es asumir que el valor entre $2DS$ y $3DS$ es uno de los veinte (o el 5 %) que se espera caigan en esta región, pues por definición el rango aceptable incluye solo el 95 % de la población; en este caso se reportan los resultados de los exámenes de los pacientes y no se toma ninguna otra acción. Sin embargo, si en la próxima tanda se obtiene el mismo valor fuera de rango, no se deben reportar los resultados de los pacientes y se requiere buscar y solucionar el problema^(30, 31).

La segunda opción es repetir inmediatamente el control que está fuera de rango y si el control se encuentra dentro de $\pm 2DS$, se podrán reportar los resultados de los pacientes; pero si el control está aún por fuera de los límites, se debe proceder a buscar la fuente del problema.

La decisión de cual alternativa se debe seguir depende del tiempo y el número de muestras. Si el control de calidad se hace solo una vez al día, puede ser muy riesgoso esperar hasta la próxima tanda para identificar el problema; en cambio, si se incluye una muestra de control de calidad cada diez muestras de pacientes, puede ser aceptable esperar hasta la próxima tanda

(32) *

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cuantificación de la hemoglobina ya sea en sangre venosa, arterial o capilar, es de utilidad para el diagnóstico de variadas patologías como: anemias, leucemias y hemorragias, que alteran su concentración en la sangre, lo cual es esencial para que el transporte de los gases sea adecuado. En esta determinación el control de calidad ha tenido que enfrentar dos problemas fundamentales en relación a los materiales de control: la inestabilidad y las dificultades inherentes a la preparación.

De ahí surge la necesidad de contar con una muestra control cuya preparación sea fácil, rápida, el método de cuantificación esté validado, evaluado en cuanto a condiciones de estabilidad y con un periodo de caducidad establecido, a fin de mejorar de manera significativa la precisión y la exactitud en las mediciones de hemoglobina, y, se asegure con ello que los resultados informados por el laboratorio son confiables.

5. OBJETIVOS

- Preparar un hemolizado utilizando el método de fabricación establecido por la Organización Mundial de la Salud.
- Realizar un estudio de estabilidad acelerada al hemolizado para determinar un periodo de caducidad tentativo y condiciones de almacenamiento.
- Probar el hemolizado como muestra de control de calidad en la cuantificación de hemoglobina por el método de hemoglobincianuro en el trabajo diario de laboratorio.

6. HIPÓTESIS

Dado que la hemoglobina se encuentra en los eritrocitos que forman parte de un fluido biológico y la literatura correspondiente señala que en la mayoría de estos componentes sanguíneos, las temperaturas frías aminoran el proceso de degradación natural como crecimiento bacteriano y descomposición de enzimas y proteínas, al realizar un estudio de estabilidad acelerada a un hemolizado para calcular un periodo de caducidad tentativo y las condiciones de almacenamiento del mismo, se espera que la reacción de degradación de la hemoglobina siga una cinética de 2° orden ⁽³⁸⁾ y las condiciones óptimas de almacenaje del producto sean: temperatura de máxima estabilidad de 4 °C y protección contra la luz, lo que garantice un periodo de vida útil más prolongado y la calidad del producto como material de control, asegurando con ello la exactitud y la precisión en los resultados de los análisis del laboratorio clínico.

7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio de tipo experimental, prospectivo, descriptivo y longitudinal.

POBLACIÓN

3 paquetes eritrocitarios grupo AB Rh+ anticoagulados con solución ACD*, del Banco de sangre de Centro Médico Nacional "La Raza" .

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Paquete eritrocitario (extraído de sangre humana total) anticoagulado con solución ACD; negativo a Hepatitis B, Hepatitis C, Brucelosis, Sífilis y SIDA (anti-VIH). Se excluyen las muestras que no cumplan con esta especificación.

*ACD: Dextrosa monohidratada, Citrato trisódico dihidratada, Ácido

citrico monohidratado

VARIABLE DEPENDIENTE:

- Concentración de hemoglobina

VARIABLES INDEPENDIENTES:

- Tiempo
- Temperatura
- Límites microbianos
- Apariencia
- pH

8. MATERIAL Y MÉTODOS

a) EQUIPO

EQUIPO	ESPECIFICACIÓN
Centrífuga	IEC B-20A
Balanza analítica	Mettler H80
Balanza granataria	OHAUS
Refrigerador	Philips (4 °C)
Congelador-enfriador	Mabe (10 °C)
Agitador mecánico	Mixer K-550-G
Bomba de vacío	Feli Welch, 1410
Espectrofotómetro digital	Spectronic 20 D
Incubadora	Riosa 15 (37 °C)
Potenciómetro	Cole-Parmer
Cámara de electroforesis Sepratek	Gelman Sciences
Fuente de poder	BIO-RAD 200/2.0
Aplicador de 8 muestras para cámara Sepratek	Gelman Sciences

b) MATERIAL DE VIDRIO

Pipetas graduadas	Kimax, 10 ml
Pipetas volumétricas	Kimax, 1,2,3,5 ml
Matraz volumétrico	Pyrex, 1000 ml
Pipetas Pasteur	
Probetas	Kimax, 50, 100 ml
Tubos de ensayo	13 x 100 mm
	18 x 150 mm
Pipeta Sahli	0.02 ml
Frascos viales ámbar	10 ml
Embudo de Büchner	
Matraz Kitazato	Kimax, 1000 ml
Vasos de precipitado	Pyrex, 500 ml
Matraz Erlenmeyer	Kimax, 500 ml
Agitadores de vidrio	
Tubos capilares	
Cajas de Petri	Pyrex

c) MATERIAL DIVERSO

Frascos de plástico para	
centrífuga	100 ml
Papel de filtro Whatman	N°1 y N°2
Gradillas	
Agitadores de vidrio	
Perilla de seguridad	
Mechero Fisher	
Jeringa	Plastipak, 3 ml
Papel secante	Helena N°5, 034
Recipientes de plástico	Tupperware
Placas de vidrio	
Secadora	
Membranas de acetato de celulosa	Gelman Sciences
Bolsas de plástico	2 Kg
Papel parafilm	American can company

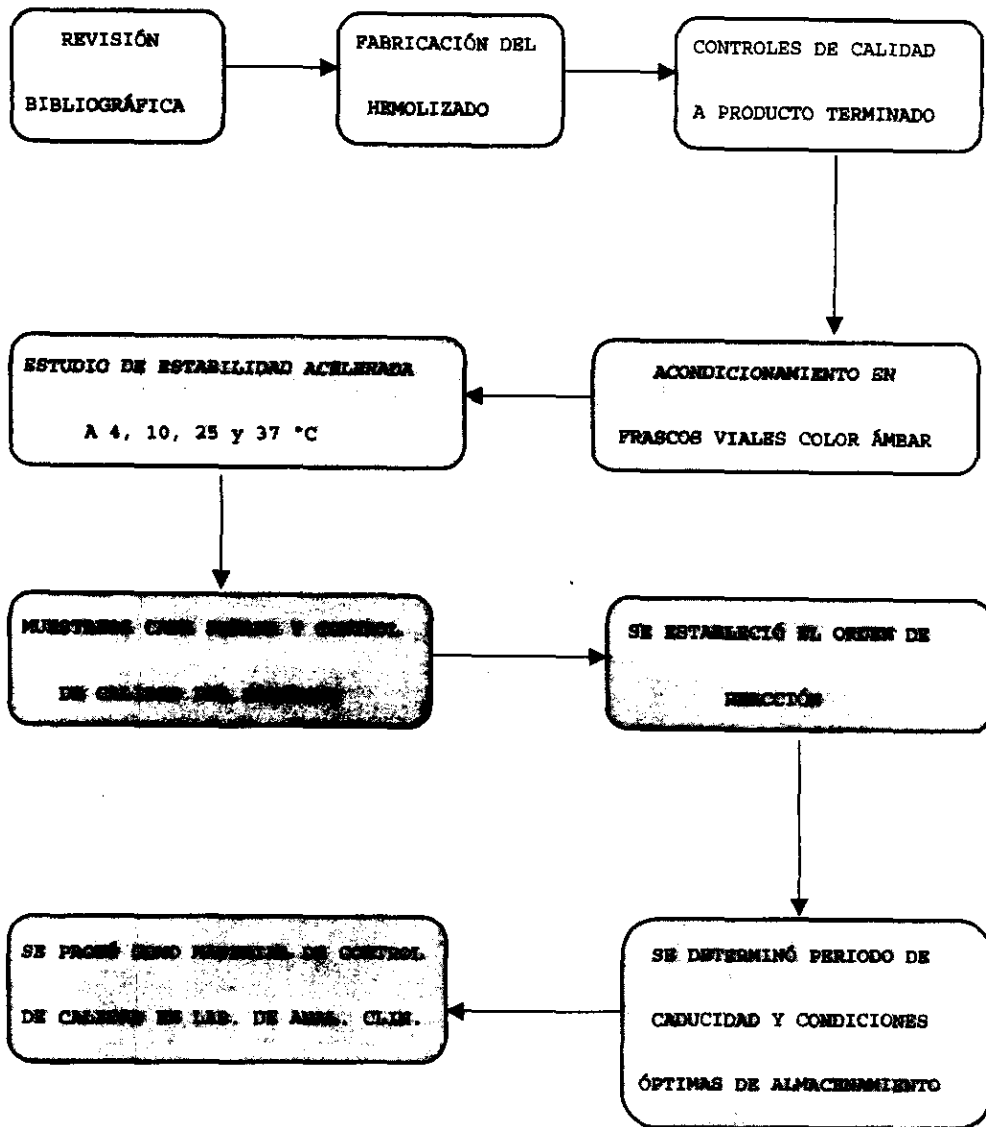
d) REACTIVOS

Tetracloruro de carbono	Baker analyzed
-------------------------	----------------

MATERIAL Y MÉTODOS

Cloruro de sodio cristales	J.T. Baker
Glicerol anhidro	J.T. Baker
Bencilpenicilina	Wyeth
Sulfato de estreptomina	Lakeside
Electra HR Buffer, pH 8.4 (Tris-EDTA-Borato)	Helena Lab.
Colorante Ponceau S	Gelman Sciences
Ácido acético al 5 %	Baker Analyzed
Sepra Clear II	Gelman Sciences
Reactivo de cianometahemoglobina	Hycel N° 70116
Solución reguladora de Biftalato pH 4	J.T. Baker
Solución reguladora de Fosfatos de Sodio y Potasio pH 7	Sigma de México
Agar de Soya Tripticaseína	Bioxón
Agar Dextrosa Papa	Merck
Agua destilada	
Soluciones patrón de cianuro de hemiglobina	Merckotest

METODOLOGÍA GENERAL



8.2. PREPARACIÓN DEL HEMOLIZADO (Modificado, 2)

1. Se centrifugó cada uno de los paquetes eritrocitarios (considerándolos como lotes independientes) en frascos de centrifuga con tapón de rosca. Se separaron el plasma y la capa de amortiguador. Todo lo anterior en condiciones asépticas.
2. Se adicionó a cada paquete de células rojas un exceso de solución salina fisiológica (9 g NaCl/L), se mezcló bien, y se volvió a centrifugar a 4000 rpm X 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y cualquier otro remanente de la "capa de amortiguador" .
3. Se repitió el lavado con solución salina dos veces para asegurar la remoción completa del plasma, las células blancas y las plaquetas, separando cada vez la capa superior del paquete de células rojas.
4. Cada uno de los lotes de producción se pasaron a matraces Erlenmeyer, se adicionó a las células lavadas la mitad de su volumen de tetracloruro de carbono, se sellaron los matraces con papel parafilm, se agitaron manualmente por 15 minutos y 15 minutos más en un agitador mecánico. Los lotes se refrigeraron hasta el día siguiente y se dejó que los desechos de lípidos y células formaran una interface semisólida entre el tetracloruro de carbono y el lisado.

5. Al día siguiente los lotes se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 minutos. Se separaron las capas superiores de lisado introduciendo una pipeta Pasteur al fondo del frasco de centrifuga y succionando la capa inferior de tetracloruro de carbono.

6. Usando papel filtro Whatman N° 1 en un embudo de Büchner, se filtró el lisado a un matraz Kitasato conectada a una bomba de succión.

7. Se repitió la filtración utilizando ahora papel filtro Whatman N° 42. Cabe aclarar que hubo necesidad de cambiar el papel filtro por aproximadamente 15-20 ml de lisado para no sobrecargarlo con los desechos de células sanguíneas y evitar así un filtrado lento.

8. Posteriormente, terminada la filtración, por cada 70 ml de lisado se le mezclaron 30 ml de glicerol.

9. Se adicionó al producto una mezcla de antibióticos para evitar desarrollo bacteriano y conservar la esterilidad: 10⁶ unidades de bencilpenicilina y 1 g de sulfato de estreptomycin por cada 500 ml de hemolizado.

10. Agitando continuamente, cada uno de los lotes se distribuyeron asépticamente en alícutas de 3 ml dentro de frascos viales color ámbar estériles, se ajustaron las tapas y se engargolaron.

NOTA: Es importante agitar continuamente el hemolizado durante el acondicionamiento para evitar variaciones de concentración del producto en cada uno de los frascos viales.

8.3. ELECTROFORESIS SOBRE ACETATO DE CELULOSA PARA HEMOGLOBINA (COMO CRITERIO DE PUREZA).

1. Se llenó el compartimento de la cámara de electroforesis con la solución buffer de pH 8.4, de tal forma que se diera un buen contacto con el puente que actúa como soporte de la tira de acetato de celulosa.
2. La membrana de acetato de celulosa se sumergió en un recipiente que contenía solución buffer pH 8.4, y se dejó humectar durante 10 minutos. Pasado este tiempo, se retiró la membrana de la solución y se secó el exceso de amortiguador entre dos trozos de papel secante. Posteriormente se colocó la tira de acetato de celulosa en la cámara de electroforesis y se fijó.
3. Utilizando tubos capilares, se llenaron los pocillos de la placa de muestras con el hemolizado, se cargó el aplicador de muestras y se aplicaron inmediatamente las muestras sobre el acetato de celulosa.

4. Se conectaron los electrodos a la cámara y a la fuente de poder. Se aplicó una corriente de 200 voltios durante 25 minutos a temperatura ambiente.
5. Pasado este tiempo, se procedió a bajar el voltaje a cero, a apagar la fuente de poder, desconectar electrodos y retirar la placa de acetato de celulosa de la cámara de electroforesis.
6. Se introdujo la membrana en colorante Ponceau S y se dejó teñir durante 10 minutos.
7. Se retiró la membrana del colorante y se lavó 3 veces consecutivas en solución de ácido acético al 5 % (la duración de cada lavado es de aproximadamente 2 minutos).
8. Posteriormente, se sumergió la membrana en la solución aclaradora Sepra Clear II por exactamente 5 minutos, con el fin de transparentarla.
9. Después de este tiempo, se retiró la membrana del aclarador y se dejó adherir a una placa de vidrio cuidando que no quedaran burbujas de aire dejando secar en forma inclinada utilizando una secadora eléctrica hasta que quedó totalmente transparente.
10. Las bandas fueron analizadas visualmente.

8.4. APARIENCIA

Esta prueba se llevó a cabo de manera cualitativa y se realizó por comparación visual del aspecto y cambio de color de la muestra problema a través del tiempo y a las diferentes temperaturas, contra una muestra del mismo material almacenado a temperatura de 4 °C y protegido de la luz evaluando así el cambio en la apariencia del producto.

8.5. DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA POR EL MÉTODO DE HEMOGLOBINCIANURO

1. Se colocaron exactamente 5 ml de solución reactivo de Drabkin en tubos de ensayo de 13 x 100 mm de acuerdo a la cantidad de muestras para analizar, utilizando una perilla de succión.
2. Se llenó la pipeta Sahli con la muestra a analizar hasta la marca de 0.02 ml.
3. Se limpió la sangre adherida al exterior de la pipeta Sahli.
4. Se descargó el contenido de la pipeta Sahli en los 5 ml de la solución diluyente de Drabkin en cada uno de los tubos

correspondientes, enjuagando ahí mismo tres veces la pipeta, aspirando y expeliendo cuidadosamente a fin de arrastrar toda la sangre de las paredes internas de la pipeta de Sahli.

5. Se mezclaron las muestras con la solución reactiva por inversión o rotación brusca del tubo.

6. Se dejaron reposar las muestras durante 10 minutos para que la conversión de hemoglobina en cianometahemoglobina (hemoglobincianuro) fuera total.

7. Se ajustó el espectrofotómetro con el blanco correspondiente (solución reactiva de Drabkin) a cero de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

8. Se colocó la solución de hemoglobincianuro en la celda espectrofotométrica y se efectuaron las lecturas en absorbancia de cada una de las muestras.

Los valores de absorbancia de cada una de las muestras se interpolaron en una curva patrón para obtener la concentración real de hemoglobina presente en cada una de ellas (Apéndice 1).

8.6. PRUEBA DE pH

FUNDAMENTO

Esta prueba se basa en la determinación de la actividad de los iones hidrógenos, empleando un instrumento potenciométrico, con sensibilidad para reproducir valores de pH de 0.05 unidades usando un electrodo indicador al ión hidrógeno como electrodo de vidrio y un electrodo de referencia apropiado, tal como el de calomel o el de cloruro de plata-plata₍₃₉₎.

PROCEDIMIENTO

1. Se calibró el potenciómetro con dos soluciones reguladoras para calibración a temperatura de 25 ± 2 °C.
2. Se lavaron los electrodos con agua destilada y se secaron con papel absorbente.
3. Posteriormente se introdujeron los electrodos en la muestra problema y se efectuó la medición de pH.
4. El procedimiento se repitió de acuerdo al número de muestras.

8.7. LÍMITES MICROBIANOS

FUNDAMENTO

Conjunto de pruebas cuyo objetivo es evaluar la calidad sanitaria de productos intermedios o terminados y/o materias primas, mediante el recuento de organismos mesofílicos aerobios, hongos filamentosos y levaduras; así como, la investigación de microorganismos objetables en dichos productos ⁽³⁹⁾.

8.7.1. CUENTA TOTAL DE MICROORGANISMOS MESOFÍLICOS AEROBIOS.

Debido a que en el método de cuantificación establecido en la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos se requiere de un volumen grande del producto para realizar la prueba, se procedió a modificar la cantidad de muestra y utilizar una microtécnica para evaluar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de hemolizado.

PROCEDIMIENTO

1. Se tomó una asada (asa calibrada a 4 mm) del frasco vial que contenía el hemolizado.
2. Se sembró por estrías masiva en el medio de Agar soya tripticaseína. Esto fue para cada uno de los frascos viales

sometidos a diferentes temperaturas y para cada uno de los lotes de producción.

3. Se incubaron las cajas de Petri a 37 °C y las lecturas se efectuaron a las 24 y 48 horas. Cabe aclarar que la técnica empleada indicaba que el conteo de las colonias se efectuaba multiplicando el número de colonias por 1000 para obtener el número de UFC por ml de producto.

8.7.2. CUENTA DE HONGOS Y LEVADURAS

PROCEDIMIENTO

Se procedió como se indicó en la cuenta de microorganismos mesofílicos aerobios, utilizando el medio de cultivo Agar dextrosa papa, y se incubó durante 5 a 7 días a temperatura ambiente.

8.8. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERADA

PROCEDIMIENTO

Para cada uno de los lotes de producción:

1. Se determinó la concentración inicial de hemoglobina presente en el hemolizado, el pH, apariencia, límites microbianos y la prueba de identidad (por electroforesis).
2. El producto acondicionado en frascos viales color ámbar de 5 ml, se sometió a 4 diferentes condiciones de temperatura: 4 °C, 10 °C, 25 °C y 37 °C (277.15 °K, 283.15 °K, 298.15 °K y 310.15 °K respectivamente).
3. Se realizaron muestreos del producto cada semana por tres meses y se determinó en cada muestreo la concentración de hemoglobina presente en el hemolizado, el pH y la apariencia. Cabe aclarar que la prueba de límites microbianos se evaluó solo en el muestreo inicial, a mitad del estudio y en el muestreo final.
4. Los datos de concentración de hemoglobina obtenidos al término del estudio de estabilidad acelerada, se agruparon en una tabla de concentración con respecto al tiempo y se obtuvo el valor medio de concentración de hemoglobina de los tres lotes con respecto al tiempo para cada una de las temperaturas
5. El promedio de los valores de concentración de hemoglobina se graficaron en las tres formas siguientes:
 - i) Por ciento de concentración de hemoglobina contra tiempo.

- ii) Logaritmo natural de la concentración de hemoglobina contra tiempo.
 - iii) Inverso de la concentración contra tiempo.
6. Se determinó para cada recta el valor del coeficiente de correlación.
 7. Se estableció el orden de reacción de la hemoglobina con base en el valor del coeficiente de correlación más cercano a 1.
 8. Se calcularon las pendientes de cada una de las rectas y se graficó el logaritmo natural de las pendientes contra el inverso de la temperatura en °K (Gráfico de Arrhenius) para obtener la constante de velocidad K a 4 °C y 25 °C (277.15 °K y 298.15°K).
 9. En la ecuación de orden de reacción correspondiente, se sustituyeron los valores de: K (constante de velocidad), Co (concentración inicial), Cn (cantidad de producto degradado).
 10. Se determinó el periodo de caducidad del producto.
 11. En la prueba de pH, con los datos obtenidos se realizaron gráficas de variación de pH con respecto al tiempo para cada una de las temperaturas a las que se sometió el producto para

observar el comportamiento a las diferentes condiciones. Considerando también las pruebas de : límites microbianos y apariencia física, se establecieron las condiciones óptimas de almacenaje del producto.

8.9. CONTROL DE CALIDAD

PROCEDIMIENTO

1. Se prepararon 2 lotes de hemolizado de diferente concentración (1 control normal y 1 control bajo) y se efectuaron en condiciones óptimas 20 determinaciones de hemoglobina en cada lote, calculando para cada uno de ellos la media(\bar{x}), desviación estándar(DE) y coeficiente de variación(CV).

2. Posteriormente se enviaron muestras de los mismos lotes evaluados en condiciones óptimas a dos de los laboratorios de análisis clínicos de la F.E.S. " Zaragoza " para ser empleados como material de control en la determinación de hemoglobina en condiciones de rutina, mediante un estudio ciego.

3. Los datos numéricos de cada uno de los controles se reportaron en cartas de control de calidad para cada uno de los laboratorios de análisis clínicos, y considerando el valor asignado de la concentración de hemoglobina presente en el hemolizado, se realizaron gráficos de sumas acumuladas para observar mejor el comportamiento de las mediciones.

9. RESULTADOS Y ANÁLISIS

PREPARACIÓN DEL HEMOLIZADO.

Se obtuvo un hemolizado cuya presentación y apariencia física aunado a los controles de calidad realizados al mismo como producto terminado demostraba la calidad y la utilidad del material para ser usado en el estudio de estabilidad acelerada y posteriormente emplearlo como material de control de calidad en hematología. No obstante, cabe aclarar que el método de fabricación establecido por la OMS, no especifica condiciones detalladas durante todo el proceso de la manufactura, por lo que el procedimiento en este trabajo quedó establecido con las siguientes observaciones y modificaciones:

- El centrifugado de las muestras con solución salina se hizo a 4000 rpm x 10 minutos.
- La agitación de los lotes de producción con tetracloruro de carbono se hizo por espacio de 15 minutos manualmente y 15 minutos más en un agitador mecánico vortex.
- El centrifugado de las muestras después de una noche de reposo en el refrigerador se hizo a 6000 rpm x 15 minutos.
- La separación de la fase de hemolizado y tetracloruro de carbono, se realizó introduciendo una pipeta Pasteur al fondo del frasco de centrífuga y succionando la capa inferior de tetracloruro de carbono.

- Al filtrar con papel Whatman N° 42, debido a que este se sobresaturaba con los desechos de las células sanguíneas, hubo necesidad de estar cambiando el papel filtro por aproximadamente cada 15-20 ml de lisado para no sobrecargar el embudo y evitar así un filtrado lento.

ELECTROFORESIS

La figura 3 muestra el comportamiento electroforético de la hemoglobina presente en cada uno de los lotes de hemolizado.

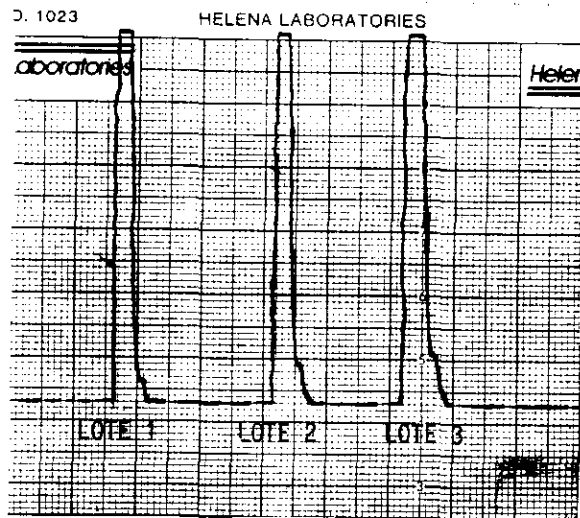


Figura III. Electroforesis sobre acetato de celulosa para hemoglobina.

En la figura III se puede observar y demostrar la pureza de la hemoglobina. La banda fue analizada visualmente y el pico indica la presencia de una hemoglobina normal y de alta pureza, no habiendo necesidad de cuantificarla puesto que no fue el objetivo del presente trabajo ya que se pretendía solamente evaluar que tan pura se encontraba la proteína en el hemolizado.

Este fue un parámetro importante a considerar para decidir si el producto cumplía o no con requerimientos mínimos necesarios para ser aprobado y presentado como material de control de calidad.

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD ACELERADA

APARIENCIA

En la tabla I se muestran los cambios en la apariencia física del hemolizado sometido a las diferentes temperaturas a través del tiempo.

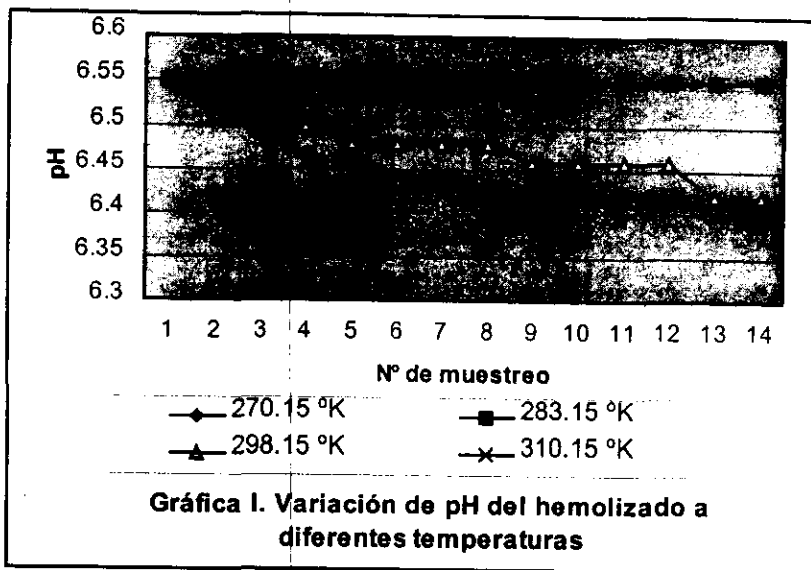
TIEMPO (SEM) TEMPERATURA (°K)	0-1	2-5	6-9	10-13
277.15	Líquido. Rojo oscuro	Líquido. Rojo oscuro	Líquido. Rojo oscuro	Líquido. Rojo oscuro
283.15	Líquido. Rojo oscuro	Líquido. Rojo oscuro	Líquido. Rojo oscuro	Líquido. Rojo oscuro
298.15	Líquido. Rojo oscuro	Líquido. café	Líquido con pequeños coágulos. café	Líquido con pequeños coágulos. café
310.15	Líquido. Rojo oscuro	Líquido grumoso. café	Líquido con coágulos. café	Semisólido. negruzco

Tabla I. Cambios en la apariencia física del hemolizado a través del tiempo.

Aquí se puede observar que el producto mantiene estable su apariencia física a temperaturas de 277.15 °K Y 283.15 °K (4 y 10 °C) durante el periodo en que se realizó el estudio de estabilidad acelerada. Sin embargo, a temperaturas de 298.15 °K (25 ° C) y sobre todo a 310.15 °K (37 °C) a partir del 2° muestreo, el hemolizado muestra degradación física reflejado en los cambios de color del producto, ya que se va tornando desde café con formación de pequeños coagulos hasta semisólido y negruzco en los últimos muestreos. Esto probablemente indique la desnaturalización paulatina de la hemoglobina por las "altas temperaturas" dado que es una proteína inestable a cambios de temperatura y pH.

pH

La gráfica I muestra la variación de pH durante el estudio de estabilidad acelerada.



En esta gráfica se puede observar que el pH se mantiene constante en 6.55 a las temperaturas de 277.15 °K y 283.15 °K (4 y 10 °C), y a las temperaturas de 298.15 °K y 310.15 °K (25 y 37 °C) el cambio no es tan significativo.

Esta ligera variación en el pH se atribuye a la degradación de la hemoglobina y a la probable formación de otros productos. Además hay que considerar que este parámetro se evaluó solamente como variable de control.

LIMITES MICROBIANOS

La tabla II muestra los resultados de la prueba de límites microbianos.

LOTE N°	TEMPERATURA (°K)	CUENTA MICROORGANISMOS MESOFÍLICOS AEROBIOS	TOTAL	CUENTA DE HONGOS Y LEVADURAS
1	277.15	No hubo crecimiento		No hubo crecimiento
	283.15			
	298.15			
	310.15			
2	277.15	No hubo crecimiento		No hubo crecimiento
	283.15			
	298.15			
	310.15			
3	277.15	No hubo crecimiento		No hubo crecimiento
	283.15			
	298.15			
	310.15			

Tabla II. Prueba de límites microbianos.

La tabla II muestra que en la cuenta total de microorganismos mesofílicos aerobios y en la cuenta de hongos y levaduras no hubo crecimiento microbiano, lo cual indica la pureza y las condiciones de asepsia en la fabricación del hemolizado garantizando así la calidad y la estabilidad a largo plazo del producto.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

La tabla III muestra los resultados de la cinética de degradación de hemoglobina en porcentaje (%) en las diferentes temperaturas a través del tiempo.

Tiempo (sem) / Temperatura (°K)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
277.15	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
283.15	100	99.72	99.39	98.05	97.98	97.95	97.44	96.82	96.76	96.62	95.81	95.76	95.76	95.72
298.15	100	98.10	96.50	94.90	93.10	91.72	90.12	88.53	86.50	85.34	83.74	82.15	79.30	79.26
310.15	100	95.26	92.96	89.97	86.90	85.60	84.26	75.72	75.56	75.49	73.25	71.93	69.96	67.00

Tabla III. Resultados de la estabilidad del contenido de hemoglobina con una valoración inicial del 100 %.

$$\begin{array}{l}
 r^2 = 0.944389 \\
 \swarrow \\
 283.15 \text{ } ^\circ\text{K} \\
 \searrow \\
 m = -0.348440
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 r^2 = 0.997260 \\
 \swarrow \\
 298.15 \text{ } ^\circ\text{K} \\
 \searrow \\
 m = -1.625802
 \end{array}$$

$$\begin{array}{l}
 r^2 = 0.969011 \\
 \swarrow \\
 310.15 \text{ } ^\circ\text{K} \\
 \searrow \\
 m = -2.438060
 \end{array}$$

RESULTADOS Y ANÁLISIS

La tabla IV muestra el logaritmo natural (ln) de cada una de las concentraciones de hemoglobina presentados en la tabla IV.

Tiempo (sem) / Temperatura (°K)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
277.15	4.6052	4.6052	4.6052	4.6052	4.6052	4.6052	4.6052	4.6052	4.6052	4.6052	4.6052	4.6052	4.6052	4.6052
283.15	4.6052	4.6024	4.5991	4.5855	4.5848	4.5845	4.5792	4.5729	4.5722	4.5708	4.5624	4.5618	4.5618	4.5618
298.15	4.6052	4.5860	4.5695	4.5528	4.5337	4.5187	4.5011	4.4833	4.4601	4.4466	4.4277	4.4085	4.3732	4.3727
310.15	4.6052	4.5566	4.5322	4.4995	4.4648	4.4497	4.4339	4.3270	4.3249	4.3240	4.2939	4.2757	4.2479	4.2047

Tabla IV. Resultados de ln de la concentración de hemoglobina presente en el hemolizado.

283.15 °K $\left\{ \begin{array}{l} r^2 = 0.946256 \\ m = -0.003569 \end{array} \right.$

298.15 °K $\left\{ \begin{array}{l} r^2 = 0.995948 \\ m = -0.018276 \end{array} \right.$

310.15 °K $\left\{ \begin{array}{l} r^2 = 0.975897 \\ m = -0.029745 \end{array} \right.$

La tabla V muestra los valores del inverso de la concentración de hemoglobina presentados en la tabla IV.

Tiempo (sem) Tempe- ratura (°K)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
277.15	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100	0.0100
283.15	0.0100	0.0100	0.0101	0.0102	0.0102	0.0102	0.0103	0.0103	0.0103	0.0103	0.0104	0.0104	0.0104	0.0104
298.15	0.0100	0.0102	0.0104	0.0105	0.0107	0.0109	0.0111	0.0113	0.0116	0.0117	0.0119	0.0122	0.0126	0.0126
310.15	0.0100	0.0105	0.0108	0.0111	0.0115	0.0117	0.0119	0.0132	0.0132	0.0132	0.0137	0.0139	0.0143	0.0143

Tabla V. Resultados del inverso de la concentración de hemoglobina

$r^2 = 0.948048$
 $m = 0.000037$

$r^2 = 0.992411$
 $m = 0.000206$

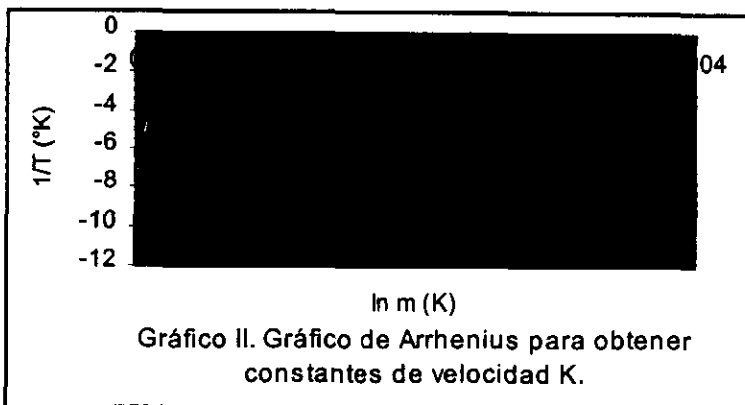
$r^2 = 0.977868$
 $m = 0.000366$

Las tablas III, IV y V muestran las medias (\bar{x}) de las concentraciones en %, \ln e inverso de la concentración de hemoglobina respectivamente, de los valores de los tres lotes evaluados a lo largo del estudio de estabilidad acelerada.

En estas se muestran también los coeficientes de determinación (r^2) para cada caso, encontrándose que la reacción de degradación de la hemoglobina se ajusta a una cinética de 2° orden fundamentado en el coeficiente de determinación más cercano a 1.

CÁLCULO DE PERIODO DE CADUCIDAD

La gráfica II muestra una recta obtenida graficando el \ln de las pendientes (m) de cada una de las rectas contra el inverso de la temperatura en °K (Gráfico de Arrhenius) mediante la cual por interpolación se obtiene la constante de velocidad K a 277.15 °K, 283.15 °K y 298.15 °K.



La tabla VII muestra los valores de K (constante de velocidad) obtenidos en el gráfico de Arrhenius, mismos que se sustituyen en la ecuación de 2° orden para obtener el periodo de caducidad del hemolizado considerando una concentración inicial de hemoglobina de 100 % y una cantidad de producto degradado de cero.

ln m (K)	K (1/s)
-10.670500	1.50E-05
-10.095029	1.50E-05
-8.787216	1.50E-05

Tabla VII. Valores de constante de velocidad K obtenidos en el Gráfico de Arrhenius

Los valores de K, concentración inicial(Co) y cantidad de producto degradado (Cn) se sustituyen en la ecuación de orden:

$$t = \frac{1}{(Cn)(Co)(K)}$$

y los valores están representados en la tabla VIII:

TEMPERATURA (°C)	PERIODO DE CADUCIDAD
4 (277.15 °K)	304.3 días
10 (283.15 °K)	170.7 días
25 (298.15 °K)	44.0 días

Tabla VIII. Periodos de caducidad del hemolizado a diferentes temperaturas.

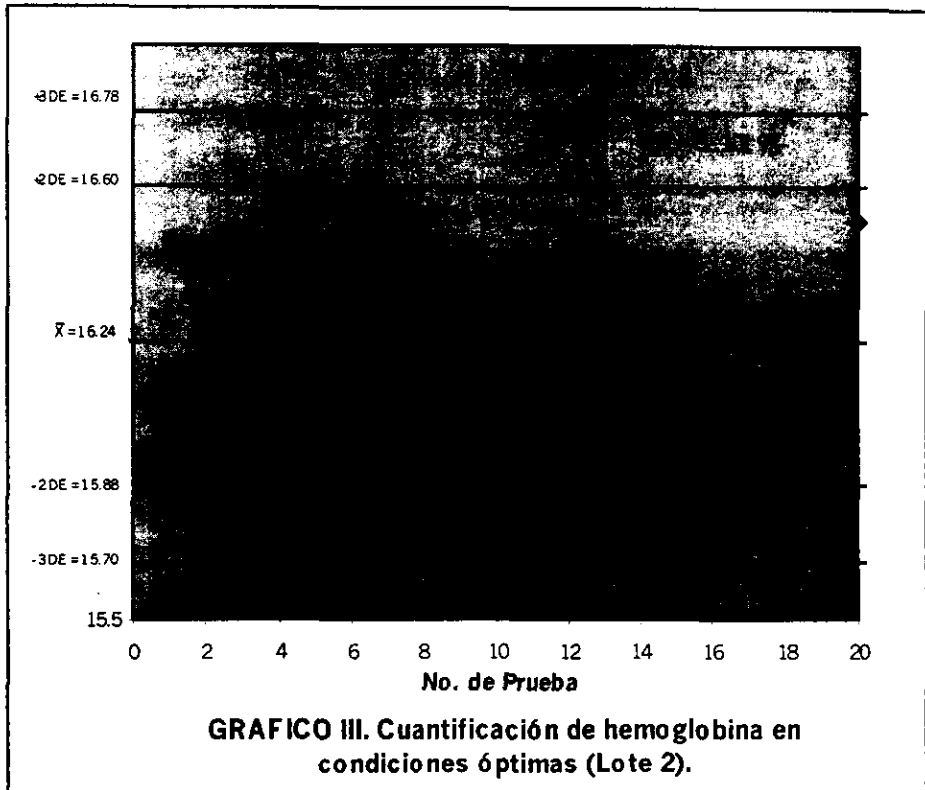
En la tabla se muestran los periodos de caducidad del hemolizado y ahí se puede observar que las temperaturas de máxima estabilidad son de 4 y 10 °C ya que prolongan la vida útil del material.

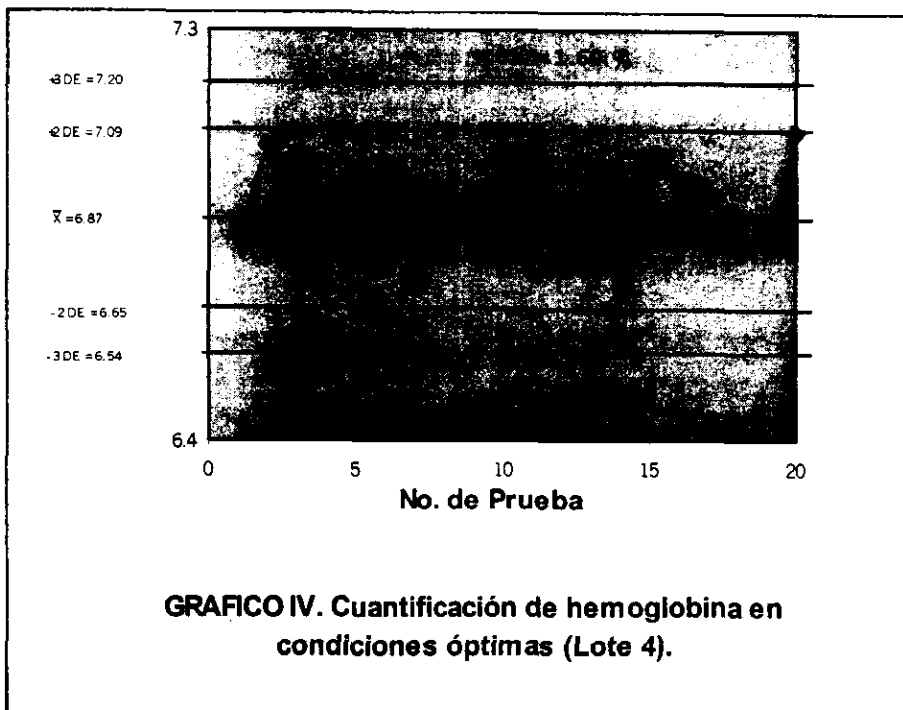
A la temperatura de 25 °C, el periodo de caducidad es muy corto y no sería idóneo almacenar el producto en esa condición puesto que mantiene la concentración de hemoglobina solo por 44 días, además hay que considerar que se presenta un cambio en la apariencia del producto por la temperatura relativamente alta que se maneja, por lo que se recomienda que el hemolizado se conserve a temperaturas de refrigeración para mantener su estabilidad por un periodo de tiempo más largo.

CONTROL DE CALIDAD

VARIACIÓN EN CONDICIONES ÓPTIMAS

Las gráficas III y IV muestran los resultados obtenidos en condiciones óptimas con dos lotes de hemolizado, uno de concentración normal (Lote 2) y otro de concentración baja (Lote 4) respectivamente, determinando hemoglobina por el método de hemoglobincianuro.

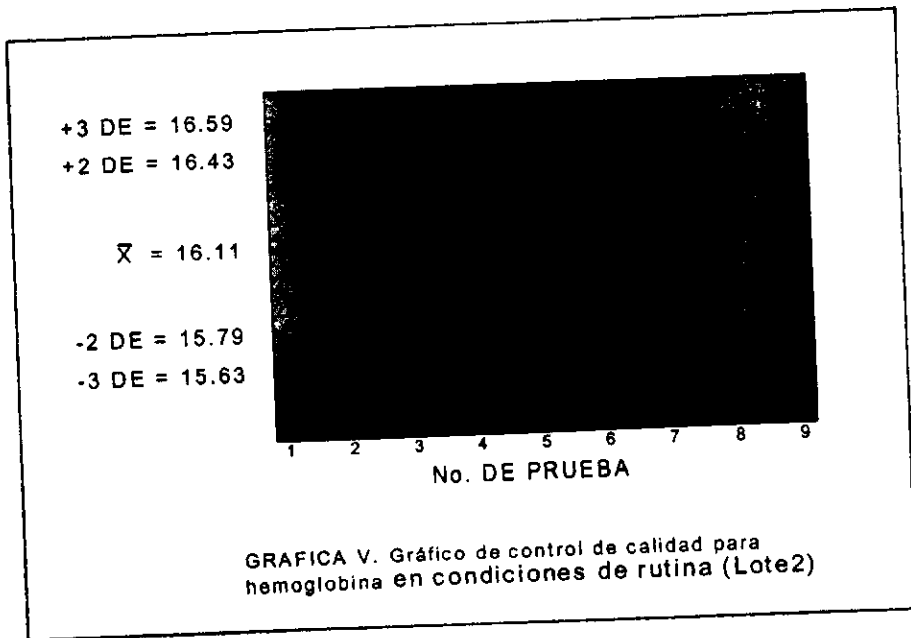




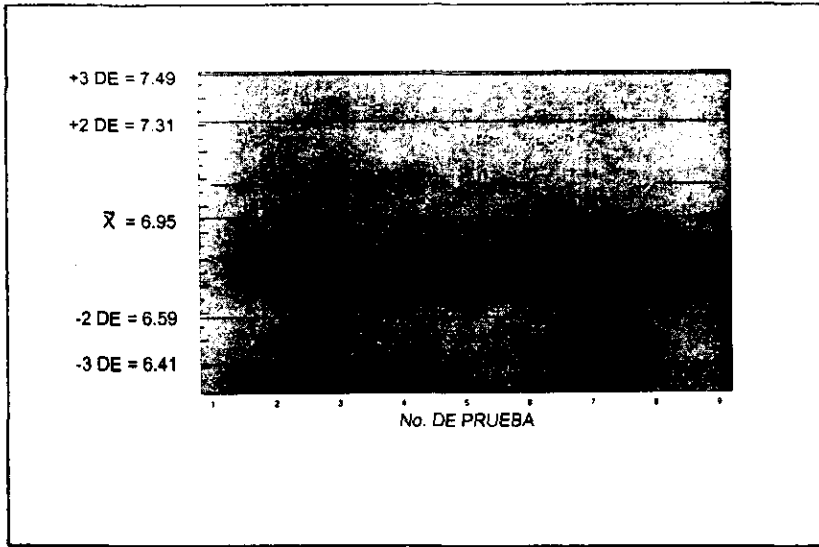
En estas gráficas se puede observar que la distribución de los resultados alrededor de la media es satisfactoria. Además el 100 % de los resultados están dentro de ± 2 DS respecto a la media y el número de resultados es aproximadamente igual en ambos lados de la media. Lo anterior indica que las condiciones de tratamiento de las muestras son óptimas considerando también los coeficientes de variación que son menores a 5 %, y el material de control puede ser usado en la siguiente etapa del control de calidad (variación en condiciones de rutina).

VARIACIÓN EN CONDICIONES DE RUTINA

Las gráficas V y VI muestran los resultados obtenidos en condiciones de rutina en el laboratorio de Análisis Clínicos "A", utilizando muestras de material de los lotes evaluados en condiciones óptimas.



PARA TESTES NO DEBE SAIR DA LA BIBLIOTECA



Gráfica VI. Gráfico de control de calidad para hemoglobina en condiciones de rutina (Lote 4).

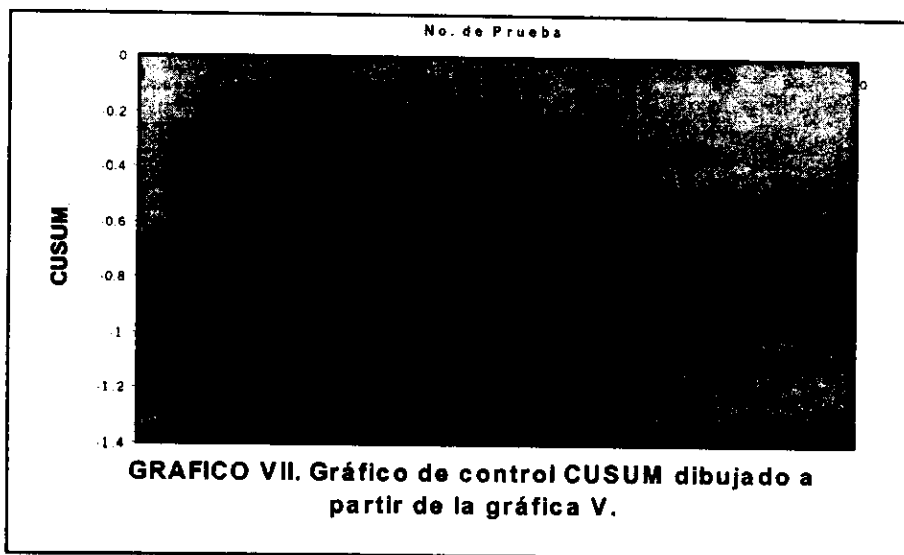
En la gráfica V se observa que casi el 90 % de los valores se sitúan de un solo lado del promedio, específicamente entre los límites de $\bar{X}-2DS$ y el resto cae dentro de la zona de alarma entre los límites de $\bar{X}+2DS$ hasta $\bar{X}+3DS$. Este comportamiento se atribuye a un error de tipo aleatorio por factores no controlados como corriente eléctrica, analista, etc., para el

punto que cae por encima del límite de $\bar{x}+2DS$. Sin embargo, en el caso de los demás puntos que se localizan por abajo de la media, el comportamiento puede deberse a: concentración alta del estándar por error de pipeteo, por impurezas en el reactivo de Drabkin o error en tiempos de reacción, lo que podría considerarse un error de tipo sistemático.

La gráfica VI muestra un comportamiento normal en donde la distribución de los resultados alrededor de la media es satisfactoria, lo que indica una ejecución estable en las mediciones garantizando un buen control de calidad en la determinación de hemoglobina.

GRÁFICOS DE SUMAS ACUMULADAS (CUSUM)

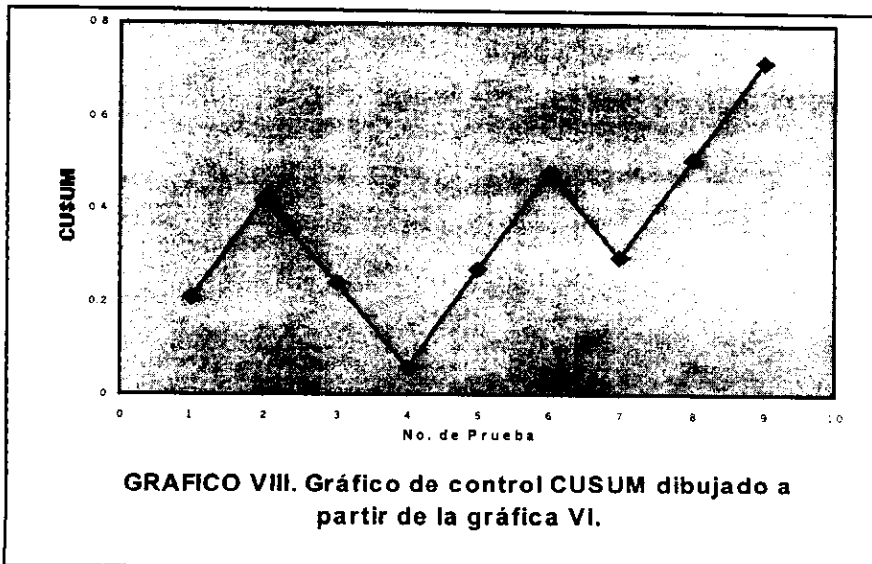
Con el fin de detectar cambios o tendencias en los gráficos de Levey Jennings (Gráficos V y VI), se realizaron gráficos de sumas acumuladas (Gráficos VII y VIII) considerando el valor asignado a la concentración de hemoglobina presente en el hemolizado.



En la gráfica anterior se puede distinguir que la tendencia de los valores se sitúan de la media hacia abajo, lo que puede atribuirse a :

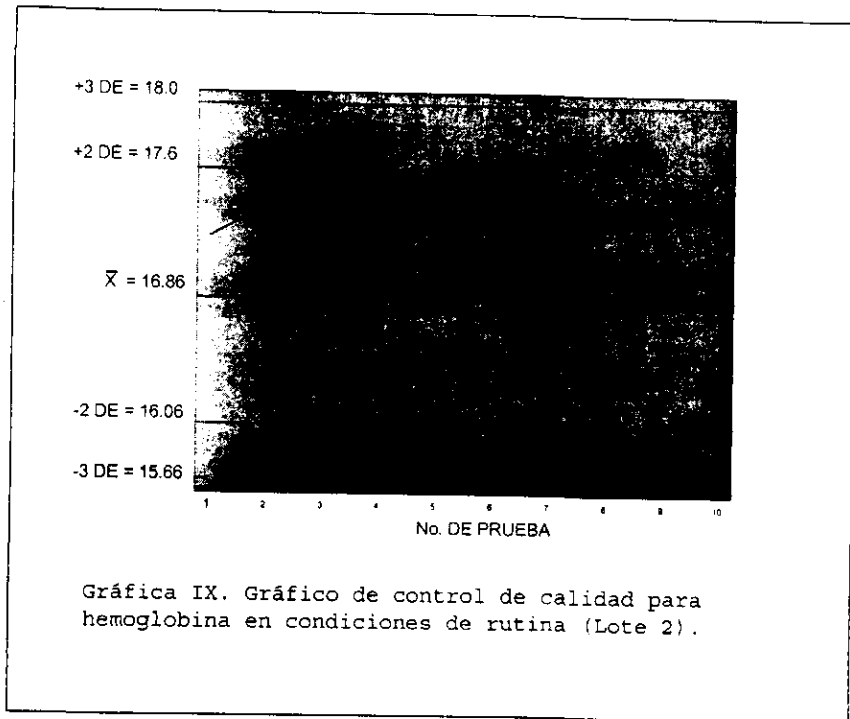
- Aumento de la concentración del estándar, generalmente por evaporación,
- Reactivos por deterioro,
- Calibración de instrumentos, pipeteos, etc.,
- Deterioro del control durante su almacenamiento.

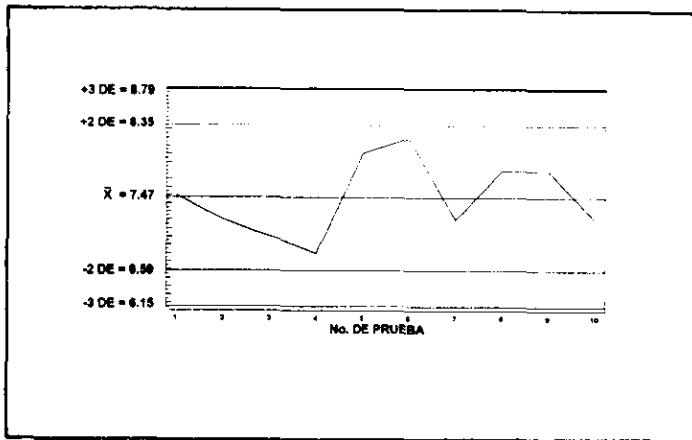
La gráfica VIII muestra los valores CUSUM para el lote 4.



La gráfica VIII muestra un comportamiento satisfactorio, puesto que la gráfica CUSUM es básicamente horizontal, lo cual quiere decir que la media de los valores observados para X, están cerca del valor correcto.

Las gráficas IX y X muestran los resultados obtenidos en condiciones de rutina en el Laboratorio de Análisis Clínicos "B", con muestras de material de los lotes evaluados en condiciones óptimas.





Gráfica X. Gráfico de control de calidad para hemoglobina en condiciones de rutina (Lote 4).

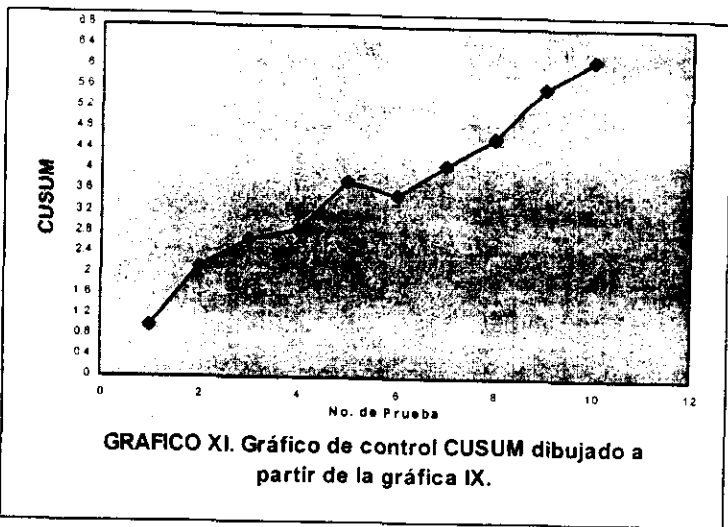
La gráfica IX muestra un comportamiento aceptable en donde la secuencia de los resultados de los análisis es satisfactoria, excepto en uno de ellos situado entre los límites de $\bar{X}-2\text{DS}$ hasta $\bar{X}-3\text{DS}$, lo que puede atribuirse a un error de tipo aleatorio.

En la gráfica X se puede observar que el 100 % de los resultados caen dentro de $\pm 2DS$ respecto a la media y la distribución de los resultados parece ser satisfactoria, sin embargo el coeficiente de variación es alto (CV=5.9%) por la relación existente con la desviación estándar (valor alto), lo que podría indicar una falta de precisión en los análisis atribuido a:

- Error en las mediciones de reactivos y/o muestras,
- Evaporación de las muestras,
- Error espectrofotométrico,
- Deterioro de los calibradores posterior a la reconstitución, etc.

No haciendo menos las variaciones entre corridas derivadas de nuevas calibraciones, posiblemente a las de nuevos reactivos y analistas.

GRÁFICOS DE SUMAS ACUMULADAS (CUSUM)



La gráfica XII muestra los valores CUSUM de los resultados reportados para el Lote 4.



En las gráficas anteriores, para los dos casos se observa que los valores tienden a subir al paso del tiempo, lo que puede atribuirse a:

- Concentración disminuída del estándar, ya sea por deterioro o contaminación,
- Estándar tratado en forma diferente al control y muestras,
- Deterioro de reactivos,
- Calibración de instrumentos y pipetas, etc.

10. CONCLUSIONES

1. La información técnica existente sobre las especificaciones de un hemolizado como producto terminado no es suficientemente amplia, de tal manera que permita soportar la decisión de si es aprobado o no; no obstante, con base en los resultados de la electroforesis sobre acetato de celulosa para hemoglobina, la apariencia física del producto, la concentración de hemoglobina presente y la prueba de límites microbianos, es posible afirmar que el hemolizado cumple con especificaciones aceptables de control de calidad como producto biológico terminado.
2. El estudio de estabilidad acelerada permitió establecer para el hemolizado, un periodo de caducidad tentativo de 304.3 días a 4 °C de temperatura , y de 170.7 días a una temperatura de 10 °C, conservado en frascos viales color ámbar.
3. El hemolizado, demostró mediante los gráficos de control de Levey Jennings, que puede ser usado como muestra control en la cuantificación de hemoglobina por el método de hemoglobincianuro en el trabajo diario de laboratorio, asegurando con ello la confiabilidad de los resultados informados por el laboratorio clínico.

Finalmente se espera que la información resultante en este trabajo sirva como base para la manufactura y/o el desarrollo de otra posible presentación de un hemolizado u otros estudios posteriores al mismo, manteniendo siempre presente los objetivos básicos del control de calidad.

11. OBSERVACIONES Y SUGERENCIAS:

- El hemolizado como material de control debe volverse a someter a temperatura de refrigeración tan pronto como se emplee para optimizar su estabilidad, limitándolo a que esté a temperatura ambiente durante menos de una hora.
- Hay que permitir que el hemolizado se equilibre antes de emplearlo, asegurándose de que alcance la temperatura ambiente, y, agitar ligeramente antes de su uso.
- Se sugiere hacer un estudio de estabilidad a largo plazo para verificar el periodo de caducidad a las condiciones de almacenamiento particulares del hemolizado dados por el estudio de estabilidad acelerada, y con base en esto establecer una fecha de caducidad del producto.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Castillo SM, Fonseca YM. Mejoría continua de la calidad. México: Ed. Médica Panamericana, S.A., 1995:9,53-72.
2. Garantía de calidad en hematología. Bioquímica 1991; 16(61):50.
3. Widmann KF, Serrano RF. Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio. España: Editorial JIMS, 1981: 37-38.
4. Miale JB. Hematología. Medicina de laboratorio. España: Ed. Reverté, S.A., 1985: 500-520, 985-987, 993, 994, 996, 1001.
5. The Merck Index. An Encyclopedia chemical Drugs and biologicals. Twelfth edition. NJ, U.S.A.: Edited by Budavari S. Merck and Co., Inc. Rahway, 1996: 794.
6. Bauer JD. Análisis clínicos. Métodos e interpretación. Barcelona : Ed. Reverté, s.a., 1986: 40-51.
7. Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. Hematology. Fourth edition. New York: Mc Graw-Hill, Inc.,1990: 377-389.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Lynch MJ, Raphael SS, Mellor LD, Spare PD, Inwood MH. Métodos de laboratorio. Vol. I. 2ª ed. México: Nueva Editorial Interamericana, S.A., 1977: 743-753.
9. Platt RW. Atlas de hematología en color. 2ª ed. España: Editorial JIMS, S.A., 1992:3-6.
10. Ruiz AG. Fundamentos de hematología. México: Editorial Médica Panamericana, S.A., 1994: 25,26.
11. Parrao J, Velez O. Hematología. México: Instituto Mexicano de Hematología, 1982: 38-47.
12. Balcells GA. La clínica y el laboratorio. 17a ed. Barcelona: MASSON, S.A., 1997: 154, 663.
13. Henry JR. Cannon CD, Winkelman WJ. Química clínica. Principios y técnicas. 2ª ed. Tomo I y II. España: Ed. JIMS, 1980: 94, 95, 1144, 1194, 1195.
14. Krzyzaniak JF, Raymond DM, Yalkowsky SH. Lysis of human red blood cells. PDA J pharm sci tech 1996; 50(4):223-226.
15. Sonnenwirth AC, Jarett L. Métodos y diagnósticos del laboratorio clínico. Tomo I. 8a ed. Argentina: Ed. Médica

- Panamericana, S.A., 1986: 753-758.
16. Pesce JA, Kaplan AL. Química clínica. Métodos. Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana, S.A., 1990: 1256, 1259-1260.
17. Henry JB. Clinical diagnosis management by laboratory methods. 18 th edition. U.S.A.: W.B. Saunders company, 1991:556-557.
18. McKenzie BS. Hematología clínica. México: Ed. El Manual Moderno, S.A., 1991: 24-50.
19. Albarrán C, Albarrán BL. Manual técnico del banco de sangre. México: La Prensa Médica Mexicana, S.A., 1985: 14-18.
20. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de Medicamentos. Diario Oficial de la Federación. Publicada el viernes 8 de Marzo de 1996: 59-66.
21. Young RW. Accelerated temperature pharmaceutical product stability determinations. Drug Dev and Indust Pharm 1990;16(4): 551-569.
22. Sbarbati EN. Estabilidad de medicamentos. México: Ed. Ateneo, 1975: 4-21, 77-89, 135, 150-152.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

23. Connors AK. Chemical stability of pharmaceuticals. Second edition. New York: John Wiley & Sons, 1986: 8-18.
24. Ahern TJ, Manning MC. Stability of protein pharmaceuticals. Part B. U.S.A.: Plenum Press, New York, 1992: 210-211.
25. Hageman MJ. The role of moisture in protein stability. Drug Dev Indust Pharm 1988; 14(14):2047.
26. Manning M, Patel K, Borchardt RT. Stability of protein pharmaceuticals. Pharm Res 1989; 6:903.
27. Carstensen JT. Drug stability. Principles and practices. Vol. 28. Second edition. u.s.a.: Marcel Decker, Inc., 1995: 7-10, 17-56.
28. Vaughn. Control de calidad. México: Ed. Limusa, 1995:18-20.
29. Besterfield HD. Control de calidad. 4ª ed. México:Prentice Hall Hispanoamericana, S.A., 1995: 3-4.
30. Buttner RJ. et al. Control de calidad. Bioquimia 1980;3(17): 504-511.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

31. Niño HV, Barrera LA. Garantía de calidad en el laboratorio clínico. Colombia: Editorial Médica panamericana, S.A., 1993:38, 39,40, 41.
32. Whitehead TP. Control de calidad en química clínica. España: John Wiley and Sons, 1977:7.
33. Smith SJ, Myers GL. Analyzing quality-control trends with moving slope charts. Clin chem 1991; 37(3): 341-346.
34. Pozzoli, Gómez VA, De Jimenez LV. Control de calidad en química clínica. Manual de Calidad. Instituto de Investigación en ciencias de la Salud, 1991:84-93.
35. Wesgard JO. Selecting appropriate quality control rules. Clin chem 1994; 40(3):499-500.
36. Cardone M. Detection and determination of error in analytical methodology. Part I In the method verification program. J assoc off anal chem 1983; 66(5):1257-1282.
37. Cardone M. Detection and determination of error in analytical methodology. Part II correction for corrigible

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

systematic error in the course of real sample analysis. J assoc off anal chem 1983; 66(2):1283-1294.

38. Jordán NG. Obtención de un patrón de hemoglobina de concentración conocida. Tesis. ENEP Zaragoza, UNAM, 1986.

39. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 6ª ed. Secretaría de Salud. 1995: 201-206, 223.

13. APÉNDICE 1

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN SALINA

Se disolvieron 9 g de Cloruro de Sodio en 1000 ml de agua destilada.

PREPARACIÓN DE REACTIVO DE DRABKIN

FÓRMULA DE PREPARACIÓN:

Bicarbonato sódico (NaHCO_3)	1 g
Cianuro potásico (KCN)	0.05 g
Ferricianuro potásico ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	0.2 g
Agua destilada, cbp	1000 ml

Se disuelve el ferricianuro potásico, cianuro potásico y el bicarbonato sódico en unos 900 ml de agua, se mezcla suavemente hasta que se hayan disuelto y se afora a 1 litro con agua destilada. Esta solución es estable si se conserva en un frasco oscuro en el refrigerador⁽¹⁵⁾.

Sin embargo, en el mercado ya existe una presentación comercial del reactivo de Drabkin que es el que se utilizó en este estudio.

El reactivo de Cianometahemoglobina Hycel N° 70116 (Reactivo de Drabkin) se preparó colocando aproximadamente 700 ml de agua destilada en un matraz volumétrico de 1 lt donde se vació el contenido de un vial y se mezcló por agitación, el vial se lavó 2 ó 3 veces con agua, añadiendo los lavados a la solución del matraz. Se mezcló bien hasta disolver y se aforó a un litro con agua destilada.

CURVA ESTÁNDAR PARA HEMOGLOBINA

La preparación de la curva estándar se realizó empleando un envase de Merckotest Hemiglobina Cianuro, soluciones patrón según DIN (Norma provisional, 58931), conteniendo 2 juegos de 4 ampollas, cada una con 5 ml de solución de cianuro de hemiglobina en las concentraciones siguientes:

- | | |
|-------------------|--------------------|
| 1. 27.7 mg/100 ml | 2. 59.1 mg/100 ml |
| 3. 79.1 mg/100 ml | 4. 231.9 mg/100 ml |

Con las soluciones patrón se preparó una serie de diluciones según el esquema siguiente:

1	231.9	3	3	29.1
3	79.1	5	0	19.8
5	231.9	1	4	11.6
7	59.1	3	3	7.4
9	27.7	2	3	2.8

Con los valores de absorbancia de cada una de las muestras se realizó la siguiente curva estándar de hemoglobina mediante una regresión lineal, a partir de la cual se obtuvieron las concentraciones de hemoglobina presente en el hemolizado.

