

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 177**

51 Int. Cl.:

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2011** **PCT/AU2011/001221**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012** **WO12037609**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2011** **E 11826220 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018** **EP 2619540**

54 Título: **Preparación de suero**

30 Prioridad:

20.09.2010 AU 2010904233

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.06.2018

73 Titular/es:

Q-SERA PTY LTD (100.0%)
Level 9, 31 Queen Street
Melbourne, Victoria 3000, AU

72 Inventor/es:

MASCI, PAUL;
DE JERSEY, JOHN;
LAVIN, MARTIN;
PHILLIPS, JULIE y
DIMESKI, GOCE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 674 177 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparación de suero

- 5 La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional australiana 2010904233 titulada "Preparación de suero", presentada el 20 de septiembre de 2010.

Campo de la invención

- 10 La presente invención se refiere, en general, al uso de procoagulantes para producir muestras de suero sanguíneo de alta calidad para ensayos de patología y otros ensayos biológicos. La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier objeto identificado en la solicitud como "invención", "realización", "aspecto", etc., que exceda el alcance de la invención representada por las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada, sino que solo sirve como información contextual para comprender mejor la invención.

15 Antecedentes de la invención

- 20 Los dispositivos de extracción de sangre, incluyendo los tubos, se usan para recoger sangre con el fin de producir suero o plasma que, a su vez, se usa para ensayos bioquímicos u otros ensayos de patología.

- 25 El suero se produce dejando coagular la muestra de sangre y luego centrifugando la muestra para separar el coágulo sanguíneo, incluyendo las células del suero. Actualmente, por lo general, se usan tubos de plástico (en lugar de vidrio), y se requieren procoagulantes (normalmente, partículas de sílice micronizadas) para potenciar el proceso de coagulación. En general, se prefiere el suero frente al plasma para las pruebas biológicas a menos que se requieran resultados urgentes, en cuyo caso el tiempo de coagulación para un tubo de suero se considera demasiado largo. Incluso con los procoagulantes existentes, en la mayoría de los tubos comerciales, el tiempo de coagulación mínimo recomendado por los fabricantes es de 30 minutos para las muestras de sangre de pacientes normales y mucho mayor (normalmente de 60 minutos o más) para las muestras de pacientes que toman agentes terapéuticos anticoagulantes tales como la warfarina o la heparina. Para las muestras de pacientes en situaciones de emergencia (departamentos de urgencias, cuidados intensivos, quirófanos, etc.), el tiempo es demasiado largo y, por lo tanto, se suele preferir el plasma, que puede producirse mucho más rápido, al suero. Una alternativa que pretende abordar este problema es un tubo de extracción de sangre para la producción de suero, recientemente desarrollado por Becton-Dickinson (designado BD Rapid Serum Tube, BDT o BD RST), que contiene trombina diseñada para aumentar la velocidad y el grado de coagulación sanguínea en muestras sanguíneas.

- 35 El plasma se forma extrayendo sangre en tubos que contienen anticoagulantes, seguido de una centrifugación que puede realizarse inmediatamente después de la extracción para separar las células y así obtener plasma para su análisis. La heparina de litio es el anticoagulante más comúnmente usado en estos tubos. El citrato, el fluoruro de sodio/oxalato de potasio y EDTA son otros anticoagulantes que se usan en algunos tubos para producir plasma para la estimación de un pequeño número de otros analitos.

Coagulación incompleta

- 45 El proceso de coagulación en la preparación de una muestra de suero consume fibrinógeno, y atrapa plaquetas y otras células dentro de una red de fibrina. Tras la centrifugación, se separa el suero del coágulo, ya sea mediante un separador de suero del dispositivo de extracción o mediante la toma de una alícuota del suero en un recipiente secundario, para evitar el contacto con las células. Esta separación permite que la muestra permanezca estable durante largos períodos de tiempo. Esta estabilidad es particularmente importante si las muestras no se analizan de inmediato, o si se requiere un nuevo análisis o análisis adicionales.

- 50 Para algunas muestras de suero, la coagulación no se completa tras los tiempos de espera recomendados. Este problema de coagulación incompleta es especialmente frecuente en pacientes con tratamiento anticoagulante o en muestras recogidas de tomas o cánulas anticoaguladas. También se puede producir la contaminación de la muestra con agentes anticoagulantes durante la extracción. Dicha sangre puede tardar mucho más que el tiempo de espera recomendado por el fabricante en coagularse o, de hecho, puede que nunca se coagule por completo en un tubo de suero convencional (por ejemplo, sangre de pacientes de cirugía cardíaca que están completamente heparinizados). Si se centrifuga una muestra de suero antes de completarse la coagulación, la coagulación puede continuar en el suero, dando lugar a coágulos, microcoágulos o formación de filamentos de fibrina capaces de causar problemas específicos del analizador o analito. También se puede producir la formación de microcoágulos y filamentos de fibrinógeno durante la preparación de la muestra en tubos de plasma, en especial, tras el almacenamiento a bajas temperaturas. Si no se invierten de forma oportuna los tubos de heparina de litio tras la extracción de sangre se puede producir la formación de pequeños coágulos alrededor del tapón de caucho. Se coagularán gotitas de sangre no heparinizada de manera oportuna, y los coágulos no se desintegrarán con la heparinización.

- 65 Incluso los coágulos más pequeños son capaces de producir errores clínicamente significativos. Por lo tanto, para mayor precisión, las muestras deben verificarse manualmente a simple vista o usando sistemas de detección

automatizados, si se dispone de ellos, para garantizar que estén libres de filamentos de fibrina o coágulos. Si hay filamentos o coágulos de material insoluble, la muestra requiere un submuestreo en un nuevo recipiente y una nueva centrifugación antes del análisis de ensayo. Las muestras que presentan coagulación latente repetida pueden necesitar la transferencia a un tubo de heparina de litio para detener la coagulación en curso. Estas acciones requieren un tiempo adicional. Además, los filamentos de fibrina o coágulos no siempre se detectan (por ejemplo, pueden incluso ocurrir después del muestreo del analizador), y los consiguientes errores de muestreo pueden conducir a tomar decisiones de atención al paciente basadas en resultados inexactos.

Contaminación celular en tubos de plasma

Las muestras obtenidas en tubos de plasma, en concreto, plasma de heparina de litio, pueden contaminarse con células. Los tubos de gel de heparina de litio, cuando se centrifugan, siempre presentarán una pequeña "capa leucocítica" en la parte superior del gel de la parte inferior del plasma. Esta capa contiene fibrina, células y estroma celular. El rápido movimiento del gel durante la centrifugación deja algunas células en el plasma. Si la muestra de plasma se mezcla (por ejemplo, durante el submuestreo o la manipulación), se volverá turbia debido a la suspensión de material que contiene células y a la fibrina, lo que reduce la integridad de la muestra. Además, pueden formarse agregados de plaquetas que también pueden contener fibrina y/o glóbulos blancos. Estos agregados pueden ser lo suficientemente grandes como para ser visibles a simple vista, y se los ha denominado "materia particulada blanca" debido a su típico color blanco, y presentan problemas similares a la coagulación incompleta tratada anteriormente.

La presencia de células en la muestra puede afectar a las concentraciones de analito. Ciertos analitos (por ejemplo, la glucosa) pueden reducirse por la actividad celular, y otros pueden aumentar por filtración o lisis celular (por ejemplo, lactato deshidrogenasa, potasio, fosfato).

Interferencia de los analitos

Aunque, en general, no hay diferencia en la concentración de analitos medida en tubos de suero o de plasma, existen algunas excepciones.

Los tubos de plasma que usan heparina no son adecuados para el análisis de la heparina o los ensayos basados en células. Los tubos de plasma de heparina de litio no son adecuados para el análisis del litio. El plasma puede ser poco fiable para la prueba adicional o la repetición de la prueba, debido a la presencia de las células y la formación de fibrina insoluble tras un almacenamiento prolongado a 2-8 °C.

Además, ha habido informes de algunos tubos de suero o plasma que producen resultados inexactos de los niveles de analito, debido a la interacción con los agentes procoagulantes o anticoagulantes dentro de los tubos, o de otra manera (Ciuti *et al.*, 1989; Cowley *et al.*, 1985; Davidson *et al.*, 2006; Dimeski *et al.*, 2004; Dimeski *et al.*, 2005; Dimeski *et al.*, 2010; Hartland *et al.*, 1999; Miles *et al.*, 2004; O'Keane *et al.*, 2006; Wannaslip *et al.*, 2006).

Tamaño de la muestra

Es deseable reducir el tamaño de la muestra necesario para las pruebas, en especial, en pacientes en estado crítico, pacientes que reciben transfusiones de sangre y lactantes, a fin de reducir el volumen de sangre extraído de un paciente. Por lo tanto, es óptimo poder ejecutar todas las pruebas necesarias usando una muestra tomada en un solo tubo de extracción de sangre. Para conseguir esto, se han desarrollado métodos de prueba en los que se usan volúmenes de muestra muy pequeños (por ejemplo, 2 µl), por lo que, normalmente, se usa un tubo de suero o plasma para al menos 21 pruebas, pero pueden usarse entre 50-60 o incluso 70-80 pruebas, dependiendo del volumen de muestra necesario para cada prueba. Sin embargo, cuando hay dudas sobre la precisión de la medición de un analito en particular en un tubo de suero o plasma, puede ser necesario tomar tanto un tubo de suero como un tubo de plasma del paciente, y ello frustra el objetivo de reducir el volumen de sangre tomado del paciente.

Los problemas que surgen del uso de las metodologías actuales para la preparación de suero y plasma a partir de sangre muestran que, en general, se requieren mejoras para lograr resultados analíticos oportunos y fiables de una variedad más amplia de muestras de sangre.

Activadores de la protrombina del veneno de serpiente

Muchos venenos de serpiente contienen activadores de la protrombina, que tienen el fin de producir una rápida coagulación de la sangre de su presa. Estos activadores de la protrombina son enzimas proteolíticas que convierten la protrombina presente en la sangre en trombina, lo que, a su vez, causa la coagulación.

Si bien los activadores de la protrombina del veneno de serpiente son conocidos procoagulantes, también se sabe que poseen actividad proteolítica similar a la tripsina (Schieck *et al.*, 1972; Parker, H. W. y Grandison A. G. C., 1977; Masci, P. P., 1986; Nicholson *et al.*, 2006; Lavin y Masci, 2009). Se ha postulado que puede haber una razón evolutiva por la que los activadores de la protrombina poseen tanto propiedades procoagulantes como proteolíticas, y es que actúan tanto para matar como para digerir la presa (Masci, P. P., 1986, página 143). Por ejemplo, la ecarina

(activador de la protrombina purificado del veneno de *Echis carinatus*) ha demostrado tener actividad procoagulante, así como otras actividades proteolíticas tales como fibrinogenólisis, gelatinólisis, cesionólisis y hemorragia (Schiek *et al.*, 1972), y un activador de la protrombina purificado del veneno de *Pseudonaja textilis* (PtPA) es activo contra una selección de sustratos peptídicos cromogénicos diseñados para diferentes enzimas proteolíticas (Masci, P.P., 1986).

Muchas pruebas de analitos que pueden realizarse en muestras de sangre, suero o plasma incluyen proteínas, incluyendo las pruebas que miden proteínas como analitos (por ejemplo, proteína total, albúmina); pruebas que miden la actividad enzimática de proteínas sanguíneas (por ejemplo, gamma-glutamyl transpeptidasa usada en la prueba de la gamma-glutamyl transferasa, la aspartato aminotransferasa, la lactato deshidrogenasa, la creatina quinasa, lipasa); pruebas usando proteínas como reactivos (por ejemplo, inmunoensayos); pruebas usando enzimas en el método analítico (por ejemplo, glucosa oxidasa). Otras pruebas comúnmente usadas que incluyen proteína incluyen análisis de glucosa, urea, urato, alanina aminotransferasa, creatina quinasa, colesterol de lipoproteína de alta densidad, colesterol, triglicéridos, transferrina, proteína C reactiva, troponina, cortisol, tiroxina libre, triiodotironina libre, hormona estimulante de la tiroides y ferritina.

Por lo tanto, a pesar de sus propiedades procoagulantes, estos activadores de la protrombina del veneno de serpiente nunca se han considerado adecuados para su uso en tubos de suero para pruebas de analitos, basándose en que su actividad proteolítica degradaría los analitos que se miden (por ejemplo, cuando el analito es una proteína) o degradaría las proteínas que se usan en la reacción para medir los niveles de analito (por ejemplo, cuando la prueba del analito implica el uso de una proteína tal como la glucosa oxidasa).

Tubos de trombina

Aunque los tubos que contienen trombina se han convertido recientemente en tubos de coagulación más rápida, y la trombina posee tanto actividad proteolítica como procoagulante, se sabe que la trombina tiene una alta especificidad para cortar enlaces del fibrinógeno, proteína C activada (APC) y Factor Va. Por lo tanto, a diferencia de la actividad similar a la tripsina informada de los activadores de la protrombina del veneno de serpiente, se espera que la trombina no interfiera en las pruebas de analitos.

En el trabajo que condujo a la presente invención, se descubrió que los tubos que contienen trombina no se pueden usar con todas las muestras de sangre. Se sabe que la trombina es inhibida rápida y completamente por el complejo de heparina-antitrombina III presente en las muestras de sangre heparinizadas. Al investigar los tubos BD RST, se descubrió que estos tubos son ineficaces en la coagulación de muestras de pacientes que contienen altas dosis de heparina (Dimeski *et al.*, 2010).

Desarrollo de la invención

Sorprendentemente, los presentes inventores descubrieron que cuando se usan en dispositivos de extracción de sangre, incluyendo los tubos, los activadores de la protrombina, en general, pueden producir suero de alta calidad en un tiempo aceptable a partir de una amplia variedad de muestras de sangre (incluyendo las tomadas de pacientes con alta concentración de terapia anticoagulante, incluyendo la heparina), disminuyendo tanto el tiempo de preparación de la muestra de suero como el riesgo de problemas de análisis debidos a la coagulación incompleta y a la contaminación por células y componentes celulares.

Además, los inventores también descubrieron que, sorprendentemente, las muestras de suero obtenidas de muestras de sangre mediante la adición de activadores de la protrombina dan los mismos resultados en una amplia selección de pruebas analíticas de bioquímica convencionales que las muestras de suero producidas en tubos de extracción de sangre existentes.

Estos descubrimientos sugirieron que los activadores de la protrombina serían adecuados para producir suero con el fin de medir una amplia selección de analitos, y se han reducido a la práctica en recipientes de extracción de sangre para preparar muestras de suero útiles en la detección de analitos, usos y métodos relacionados, como se describe a continuación en el presente documento.

Sumario de la invención

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona el uso de una composición de coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en un activador de la protrombina en la preparación de una muestra de suero que es adecuada para detectar un analito.

El activador de protrombina (a veces conocido como protrombinasa) muestra de manera adecuada actividad similar a la tripsina, y activa la protrombina (es decir, convierte la protrombina en trombina).

La presente invención también proporciona un recipiente para preparar una muestra de suero que sea adecuada para detectar un analito de interés que está presente en la muestra, recipiente que contiene una composición de

coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en un activador de la protrombina como se define en el presente documento.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una composición de coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en un activador de la protrombina como se define en el presente documento en la preparación o fabricación de un recipiente para preparar una muestra de suero adecuada para detectar un analito. En otro aspecto, la presente invención proporciona un recipiente que comprende una composición de coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en un activador de la protrombina como se define en el presente documento y una muestra de sangre, para preparar una muestra de suero adecuada para detectar un analito.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una muestra de suero para detectar un analito de interés, comprendiendo el método poner en contacto una muestra de sangre con una composición de coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en un activador de la protrombina como se define en el presente documento y en condiciones suficientes para preparar una muestra de suero. De manera adecuada, el método se lleva a cabo en un recipiente como se ha definido ampliamente con anterioridad. De manera adecuada, la sangre se pone en contacto con la composición de coagulación durante un tiempo y en condiciones suficientes para preparar una muestra de suero y células coaguladas. De manera adecuada, el método comprende además separar la muestra de suero de las células coaguladas. En algunas realizaciones, el método comprende mezclar la composición de coagulación y la muestra de sangre, proporcionando un recipiente que contenga la muestra de sangre y añadiendo la composición de coagulación al recipiente, o proporcionando un recipiente que contenga la composición de coagulación y añadiendo o recogiendo la muestra de sangre en el recipiente.

La presente invención también proporciona una muestra de suero producida al poner en contacto una muestra de sangre con una composición de coagulación como se ha descrito ampliamente con anterioridad durante un tiempo y en condiciones suficientes para producir la muestra de suero.

La presente invención proporciona además métodos para detectar un analito de interés. En general, estos métodos comprenden analizar una muestra de suero preparada mediante el método de la presente invención para determinar la presencia o la cantidad del analito de interés.

La presente invención también proporciona métodos para diagnosticar la presencia, ausencia o gravedad de una enfermedad o afección en un sujeto, en los que la presencia, ausencia o gravedad de la enfermedad o afección está asociada con la presencia, ausencia o cantidad anómala de un analito de interés en el sujeto. En general, estos métodos comprenden proporcionar una muestra de suero preparada de acuerdo con los métodos ampliamente descritos con anterioridad; y detectar la presencia, ausencia o cantidad anómala del analito en la muestra de suero para determinar de ese modo la presencia, ausencia o gravedad de la enfermedad o afección en el sujeto.

Breve descripción de las secuencias

A continuación, se proporciona una breve descripción de las secuencias de la lista de secuencias.

NÚMERO DE ID DE SECUENCIA	SECUENCIA
SEQ ID NO: 1	Secuencia polipeptídica para la ecarina de <i>Echis carinatus</i>
SEQ ID NO: 2	Secuencia polipeptídica parcial para la basparina del veneno de <i>Bothrops asper</i>
SEQ ID NO: 3	Secuencia polipeptídica parcial para la carinactivasa-1 del veneno de <i>Echis carinatus</i> (preparada según lo descrito en Yamada, D., <i>et al.</i> , (1996)) - subunidad de 62 kDa
SEQ ID NO: 4	Secuencia polipeptídica parcial para la multactivasa del veneno de <i>Echis multisquamatus</i> (preparada según lo descrito en pYamada, D., <i>et al.</i> , (1997))
SEQ ID NO: 5	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor V de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis</i>
SEQ ID NO: 6	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor V de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis</i>
SEQ ID NO: 7	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor V de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis</i>
SEQ ID NO: 8	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor V de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis</i>
SEQ ID NO: 9	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor V de OspA (u oscutarina C) de <i>Oxyuranus scutellatus</i>

NÚMERO DE ID DE SECUENCIA	SECUENCIA
SEQ ID NO: 10	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor V de OspA (u oscutarina C) de <i>Oxyuranus scutellatus scutellatus</i>
SEQ ID NO: 11	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor V de OspA (u oscutarina C) de <i>Oxyuranus scutellatus scutellatus</i>
SEQ ID NO: 12	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor V de OspA (u oscutarina C) de <i>Oxyuranus scutellatus</i>
SEQ ID NO: 13	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor V de OspA (u oscutarina C) de <i>Oxyuranus scutellatus</i>
SEQ ID NO: 14	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor V de omicarina C (u oscutarina C de <i>Oxyuranus microlepidotus</i>
SEQ ID NO: 15	Secuencia de nucleótidos que codifica el factor V de <i>Homo sapiens</i>
SEQ ID NO: 16	Secuencia polipeptídica para el factor V de <i>Homo sapiens</i>
SEQ ID NO: 17	Secuencia de nucleótidos que codifica el factor V de <i>Bos taurus</i>
SEQ ID NO: 18	Secuencia polipeptídica para el factor V de <i>Bos taurus</i>
SEQ ID NO: 19	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor X de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis</i>
SEQ ID NO: 20	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor X de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis</i>
SEQ ID NO: 21	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor X de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis</i>
SEQ ID NO: 22	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor X de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis textilis</i>
SEQ ID NO: 23	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor X de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis textilis</i>
SEQ ID NO: 24	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor X de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis</i>
SEQ ID NO: 25	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor X de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis</i>
SEQ ID NO: 26	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor X de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis</i>
SEQ ID NO: 27	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor X de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis</i>
SEQ ID NO: 28	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor X de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis textilis</i>
SEQ ID NO: 29	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor X de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis textilis</i>
SEQ ID NO: 30	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor X de PtPA (o pseutarina C) de <i>Pseudonaja textilis</i>
SEQ ID NO: 31	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor X de OspA (u oscutarina C) de <i>Oxyuranus scutellatus</i>
SEQ ID NO: 32	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor X de OspA (u oscutarina C) de <i>Oxyuranus scutellatus</i>
SEQ ID NO: 33	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor X de omicarina C (u oscutarina C de <i>Oxyuranus microlepidotus</i>
SEQ ID NO: 34	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor X de omicarina C de <i>Oxyuranus microlepidotus</i>
SEQ ID NO: 35	Secuencia de nucleótidos que codifica componentes de tipo Factor X de porfarina D de <i>Pseudechis porphyriacus</i>
SEQ ID NO: 36	Secuencia polipeptídica para componente de tipo Factor X de porfarina D de <i>Pseudechis porphyriacus</i>
SEQ ID NO: 37	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor X de hopsarina D de <i>Hoplocephalus stephensii</i>
SEQ ID NO: 38	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor X de hopsarina D de <i>Hoplocephalus stephensii</i>
SEQ ID NO: 39	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor X de

NÚMERO DE ID DE SECUENCIA	SECUENCIA
	notecarina D de <i>Notechis scutatus</i>
SEQ ID NO: 40	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor X de notecarina D de <i>Notechis scutatus</i>
SEQ ID NO: 41	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor X de trocarina D de <i>Tropidechis carinatus</i>
SEQ ID NO: 42	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor X de trocarina D de <i>Tropidechis carinatus</i>
SEQ ID NO: 43	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor X del activador de la protrombina de <i>Demansia vestigiata</i>
SEQ ID NO: 44	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor X del activador de la protrombina de <i>Demansia vestigiata</i>
SEQ ID NO: 45	Secuencia de nucleótidos que codifica el componente de tipo Factor X del activador de la protrombina de <i>Demansia vestigiata</i>
SEQ ID NO: 46	Secuencia polipeptídica para el componente de tipo Factor X del activador de la protrombina de <i>Demansia vestigiata</i>
SEQ ID NO: 47	Secuencia de nucleótidos que codifica el factor X de <i>Homo sapiens</i>
SEQ ID NO: 48	Secuencia polipeptídica para el factor X de <i>Homo sapiens</i>
SEQ ID NO: 49	Secuencia de nucleótidos que codifica el factor X de <i>Bos taurus</i>
SEQ ID NO: 50	Secuencia polipeptídica para el factor X de <i>Bos taurus</i>
SEQ ID NO: 51	Secuencia polipeptídica parcial para la carinactivasa-1 del veneno de <i>Echis carinatus</i> (preparada según lo descrito en Yamada, D., <i>et al.</i> , (1996)) - subunidad de 17 kDa
SEQ ID NO: 52	Secuencia polipeptídica parcial para la carinactivasa-1 del veneno de <i>Echis carinatus</i> (preparada según lo descrito en Yamada, D., <i>et al.</i> , (1996)) - subunidad de 14 kDa

Breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1 muestra el perfil de elución en el aislamiento de la ecarina, carinactivasa-1 y carinactivasa-2 del veneno de *E. carinatus* usando filtración en gel en una columna Superdex 200 como se describe en el Ejemplo 1a. Se sometió el veneno de *E. carinatus* 157 mg, 122 unidades de A₂₈₀) a filtración en gel en Superdex 200 (2,5 x 95 cm) usando tampón de Tris-HCl 0,05 M a pH 8,0. Las fracciones agrupadas (28,3 unidades de A₂₈₀) de los tres activadores de la protrombina (ecarina, carinactivasa-1 y carinactivasa-2) están indicadas por la barra.
- 10 La Figura 2 muestra el perfil de elución de la cromatografía en azul de Sefarosa de las fracciones activas (procoagulantes) de la cromatografía de filtración en gel Superdex 200 descrita en el Ejemplo 1a (que también se muestra en la Figura 1). Se sometieron las fracciones activas a una columna de azul de Sefarosa y se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl. Se recogieron fracciones de 3 ml. Las fracciones indicadas por las barras se agruparon como carinactivasa-1, carinactivasa-2 y ecarina, respectivamente.
- 15 La Figura 3 muestra el perfil de elución para la cromatografía del veneno de *P. textilis* reconstituido (50 mg en 5 ml) en una columna (2,5 x 95 cm) de Sephacryl S-300 en tampón de Tris-HCl 0,05, pH 7,4; 4 °C; caudal, 17 ml/h; A₂₈₀ (•); actividad específica de S-2222 (°); 'A' y 'B' representan el volumen vacío (167 ml) y el volumen de elución del máximo de actividad de S-2222 (250 ml), respectivamente, tal como se describe en el Ejemplo 1b.
- 20 La Figura 4 muestra el perfil de elución de veneno de *P. textilis* (1 g: 30 ml) usando el método de cromatografía de afinidad de Con A-Sefarosa descrito en el Ejemplo 1b. La flecha indica la posición de la aplicación de metil- α -D-mannopiranosido 0,2 M para eluir PtPA (marcado como "a").
- 25 La Figura 5 muestra los resultados de PAGE nativa a pH 8,6 de fracciones agrupadas denominados "a" en la Figura 4, en la que el carril A es 25 μ g y el carril B es 50 μ g.
- 30 La Figura 6 muestra los resultados de PAGE nativa a pH 8,6 de PtPA purificada, donde el gel se tiñó con azul de Coomassie, y se cortó un gel duplicado en cortes de 5 mm, que fueron cada uno equilibrados con 1 ml de mezcla de ensayo S-2222 para localizar la actividad, tal como se describe en el Ejemplo 1b. El gráfico muestra un diagrama de la actividad de S-2222 (el eje Y dice: "VELOCIDAD DE HIDRÓLISIS DE S-222 (ΔA_{410} / min)) frente al número de cortes de gel (el eje X dice: "NÚMERO DE CORTES DE GEL").
- 35 La Figura 7 muestra los resultados de SDS-PAGE de las preparaciones de PtPA y OsPA purificadas por afinidad en condiciones reductoras y no reductoras como se describe en el Ejemplo 1b, en la que los carriles son (de

izquierda a derecha): marcador; OsPA red. (mg/ml); PtPA red. (mg/ml); OsPA red. (2 mg/ml); PtPA red. (2 mg/ml); OsPA no red. (mg/ml); PtPA no red. (1 mg/ml); OsPA no red. (2 mg/ml); PtPA no red. (2 mg/ml); marcador; en la que "red." indica los componentes en presencia de β -mercaptoetanol (es decir, reducidos) y "no red." indica los componentes en ausencia de β -mercaptoetanol (es decir, no reducidos).

5 La Figura 8 muestra el perfil de elución en el aislamiento de notecarina a partir de veneno de *N. scutatus* usando cromatografía con Sephacryl S-300 como se describe en el Ejemplo 1c. Las fracciones agrupadas de notecarina se indican mediante la barra marcada como "PA".

10 La Figura 9 muestra los resultados de PAGE nativa a pH 8,9 de los activadores de la protrombina: carinactivasa-1, carinactivasa-2, ecarina, PtPA, OsPA y notecarina, preparados en el Ejemplo 1a, 1b y 1c. En esta figura, Los marcadores representan lo siguiente: (I) protrombina; (II) alfa-trombina; (III) ecarina; (IV) carinactivasa-1; (V) carinactivasa-2; (VI) PtPA; (VII) OsPA; (VIII) notecarina (se cargaron 20 μ g de cada activador de la protrombina).

15 La Figura 10 muestra la caracterización por SDS-PAGE de los activadores de la protrombina preparados en los Ejemplos 1a, 1b y 1c, en presencia de β -mercaptoetanol, en la que los carriles son los siguientes: (1) carinactivasa-1; (2) carinactivasa-2; (3) ecarina; (4) PtPA; (5) OsPA; (6) notecarina; (7) trombina; y (M) marcador de peso molecular.

20 La Figura 11 muestra la caracterización por SDS-PAGE de los activadores de la protrombina preparados en los Ejemplos 1a, 1b y 1c, en ausencia de β -mercaptoetanol, en la que los carriles son los siguientes: (1) carinactivasa-1; (2) carinactivasa-2; (3) ecarina; (4) PtPA; (5) OsPA; (6) notecarina; (7) trombina; y (M) marcador de peso molecular.

25 La Figura 12 muestra la SDS-PAGE sin β -mercaptoetanol (A) y con β -mercaptoetanol (B) de muestras incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente en presencia de Ca^{2+} 5 mM, y con los siguientes activadores de la protrombina: carinactivasa-1 (carril 2); carinactivasa-2 (carril 3); ecarina (carril 4); PtPA (carril 5); OsPA (carril 6); notecarina (carril 7). El carril 1 contenía la muestra de protrombina humana sola en tampón (sin activador de la protrombina), y el carril 8 contenía la muestra de α -trombina altamente purificada (sin activador de la protrombina), y "m" representa el marcador de peso molecular. Este experimento se describe con más detalle en el Ejemplo 2a.

30 La Figura 13 muestra la SDS-PAGE de la evolución en el tiempo de la activación de la protrombina (14 μ M) en trombina por parte de PtPA(6 nM) y de notecarina (6 nM), como se describe en el Ejemplo 2b.

35 La Figura 14 es una imagen anotada de parte de los resultados de SDS-PAGE de la Figura 13, en la que se eluyeron las bandas seleccionadas y se sometieron a secuenciación N-terminal usando análisis de espectrometría de masas para asignar dominios moleculares específicos.

40 La Figura 15 es un gráfico de la absorbancia del pNA generado a partir del S-2238 por diferentes concentraciones de trombina durante 155 segundos como se describe en el Ejemplo 2d. Los cálculos en el lado derecho del gráfico se alinean con cada línea del gráfico, por ejemplo, el cálculo superior es la línea más alta, y así sucesivamente.

45 La Figura 16 es un gráfico de la curva patrón derivada de los resultados en la Figura 15, en concreto, se representaron las pendientes de las ecuaciones para cada reacción hasta 180 segundos en la Figura 15 frente a la concentración de trombina para proporcionar la ecuación de regresión lineal mostrada en la Figura 16.

50 La Figura 17 es un gráfico que muestra la tasa de generación de trombina por concentraciones 0,6 nM de los activadores de la protrombina: PtPA, OsPA, ecarina (Ecr), notecarina (Ntcr), carinactivasa-1 (CA-1) y carinactivasa-2 (CA-2) durante 180 segundos como se describe en el Ejemplo 2d.

55 La Figura 18 muestra el análisis de ajuste de curva de la hidrólisis catalizada por la trombina de S-2238 como se describe en el Ejemplo 2e. Las concentraciones de trombina están indicadas en las curvas de progreso.

La Figura 19 representa gráficamente la activación por parte de PtPA de la protrombina a las concentraciones de PtPA descritas en el Ejemplo 2e.

60 La Figura 20 representa gráficamente la activación por parte de OsPa de la protrombina a las concentraciones de OsPA descritas en el Ejemplo 2e.

La Figura 21 representa gráficamente la activación de la protrombina por parte de la ecarina a las concentraciones de ecarina descritas en el Ejemplo 2e.

65 La Figura 22 representa gráficamente la activación por parte de carinactivasa-1 de la protrombina a las concentraciones de carinactivasa-1 descritas en el Ejemplo 2e.

- La Figura 23 representa gráficamente la activación por parte de carinactivasa-2 de la protrombina a las concentraciones de carinactivasa-2 descritas en el Ejemplo 2e.
- 5 La Figura 24 representa gráficamente la activación de la protrombina por parte de la notecarina a las concentraciones de notecarina descritas en el Ejemplo 2e.
- La Figura 25 muestra un ejemplo de un gráfico TEG (parte de la formación de coágulos) con los parámetros de coagulación marcados, como se analiza en el apartado de Ejemplos.
- 10 La Figura 26 representa gráficamente las curvas de progreso para la hidrólisis de S-2238 mediante diferentes concentraciones de trombina por duplicado de 45 a 225 nM durante un período de incubación de 5 minutos en plasma citrado normal como se describe en el Ejemplo 3g.
- 15 La Figura 27 muestra la curva patrón de la trombina derivada de la pendiente de las reacciones de la Figura 26 en la marca de incubación de 5 minutos en forma logarítmica, en la que el eje x muestra ln de la pendiente (unidades de absorbancia/minuto); y el eje y muestra ln (concentración molar de trombina).
- La Figura 28 muestra los ensayos de la trombina que queda tras la eliminación del coágulo en sueros generados por tres concentraciones diferentes de PtPA (por duplicado), como se describe en el Ejemplo 3g.
- 20 La Figura 29 muestra los ensayos de la trombina que queda tras la eliminación del coágulo en sueros generados por tres concentraciones diferentes de OsPA (por duplicado), como se describe en el Ejemplo 3g.
- La Figura 30 representa gráficamente las pendientes de la Figura 28 (proporcionales a las concentraciones de trombina) frente a la concentración de PtPA, como se describe en el Ejemplo 3g.
- 25 La Figura 31 representa gráficamente las pendientes de la Figura 29 (proporcionales a las concentraciones de trombina) frente a la concentración de OsPA, como se describe en el Ejemplo 3g.
- La Figura 32 muestra las curvas de progreso para la hidrólisis de S-2238 por la trombina que queda en el suero tras la eliminación del coágulo en presencia de heparina 4.300 nM (10 UI), como se describe en el Ejemplo 3g. La trombina fue generada por PtPA y OsPA, o se añadió.
- 30 La Figura 33 muestra las curvas de reacción con muestras que contienen diferentes concentraciones de heparina usando PtPA 1,5 nM como se describe en el Ejemplo 3g.
- 35 La Figura 34 muestra las curvas de reacción con muestras que contienen diferentes concentraciones de heparina usando OsPA 1,5 nM como se describe en el Ejemplo 3g.
- La Figura 35 muestra los cambios de absorbancias durante el período de 5 minutos en plasma citrado "normal" agrupado, representando cada línea un tubo BD RST lleno con un volumen diferente de plasma de citrato normal agrupado, como se describe en el Ejemplo 3h.
- 40 La Figura 36 muestra la relación entre las pendientes medidas de la Figura 35 y las concentraciones de trombina correspondientes leídas de la curva patrón de la Figura 16, como se describe en el Ejemplo 3h.
- La Figura 37 muestra los cambios de absorbancias durante el período de 5 minutos en plasma citrado "normal" agrupado, representando cada línea un tubo BD RST lleno con 1 ml o 4 ml de plasma de citrato normal agrupado y una concentración diferente de heparina, como se describe en el Ejemplo 3h.
- 50 La Figura 38 muestra los rastros TEG para la comparación del tubo sencillo, los tubos de suero disponibles en el mercado y el tubo que contiene PtPA como se describe en el Ejemplo 4c.
- La Figura 39 muestra gráficos TEG de los resultados del Ejemplo 5a.
- 55 La Figura 40 muestra gráficos TEG de los resultados para el voluntario "W1" en el Ejemplo 5c.
- La Figura 41 muestra gráficos TEG de los resultados para el voluntario "W2" en el Ejemplo 5c.
- 60 La Figura 42 muestra rastros TEG para la coagulación de sangre citratada recalcificada de un participante heparinizado con PtPA u OsPA como se describe en el Ejemplo 5d.
- La Figura 43 muestra las rastros TEG de los resultados del Ejemplo 5e.
- 65 La Figura 44 muestra los gráficos TEG de los resultados del Ejemplo 6a.

La Figura 45 muestra los gráficos TEG de los resultados del Ejemplo 6b.

La Figura 46 representa gráficamente los tiempos de coagulación de los venenos de serpiente que contienen activador de protrombina de la especie: *Pseudonaja textilis* (Pt), *Oxyuranus scutellatus* (Os), *Oxyuranus microlepidotus* (Om), *Notechis scutatus* (Ns) y *Echis carinatus* (Ec) a diferentes concentraciones según lo descrito en el Ejemplo 7.

La Figura 47 muestra un tubo de plasma Greiner con precipitado gelatinoso como se describe en el Ejemplo 8.

La Figura 48 muestra la coagulación posterior a la centrifugación (latente) en varios tubos como se describe en el Ejemplo 8.

La Figura 49 muestra una comparación de muestras de suero en diferentes tubos como se describe en el Ejemplo 8.

La Figura 50 muestra el intervalo de concentraciones de fibrinógeno/fdp/FDP medido en tubos de suero Greiner de 48 pacientes seleccionados al azar que requieren la determinación del analito como se describe en el Ejemplo 9a. La barra muestra una media de 17,5 µg/ml y el intervalo es de 4,4 a 32 µg/ml.

La Figura 51 muestra la comparación de la concentración de fibrinógeno/fdp/FDP medida mediante ELISA en 36 muestras de suero normal preparadas usando tubos de suero Greiner (GS) con o sin la adición de PtPA como se describe en el Ejemplo 9b.

La Figura 52 muestra las concentraciones de fibrinógeno/fdp/FDP medidas mediante ELISA en los sueros de 9 muestras de sangre normales recogidas en cuatro tubos de suero diferentes: suero Greiner (GRS), suero BD (BDS), RST y PtPA de BD (300 ng/ml) como se describe en el Ejemplo 9b.

La Figura 53 muestra las concentraciones de fibrinógeno/fdp/FDP medidas mediante ELISA en los sueros de 5 muestras de sangre normales recogidas en tubos de suero Greiner (GRS), tubos sin aditivos Greiner con 300 ng/ml de PtPA (PTPA), tubos sin aditivos Greiner que contienen 125 ng/ml de OsPA (OSPA) y tubos sin aditivos Greiner que contienen 0,16 U/ml de ecarina purificada (ECARINA) como se describe en el Ejemplo 9b. Las barras representan la media ± desviación típica.

La Figura 54 muestra las concentraciones de fibrinógeno/fdp/FDP medidas mediante ELISA en los sueros de 3 pacientes sometidos a diálisis renal recogidas en tubos de suero Greiner (GRS), tubos BD SST II (BDS), Tubos BD RST (BDRST) y tubos Greiner sin aditivos con 1,2 µg/tubo de 4 ml de PtPA (PTPA) añadidos como se describe en el Ejemplo 9c.

La Figura 55 muestra las concentraciones de fibrinógeno/fdp/FDP medidas mediante ELISA de plasma y suero de 2 pacientes cardíacos recogidos en tubos de plasma Greiner (GRLH), tubos de suero Greiner (GRS), tubos BD RST (BDRST), tubo Greiner Vacuette™ sin aditivos con 300 ng/ml de PtPA (PTPA), tubo Greiner Vacuette™ sin aditivos con 125 ng/ml de OsPA (OSPA), tubo Greiner Vacuette™ sin aditivos con 0,31 U/ml de ecarina (EC1) añadidos y tubo Greiner Vacuette™ sin aditivos con 0,63 U/ml de ecarina (EC2) añadidos según lo descrito en el Ejemplo 9c.

La Figura 56 muestra portaobjetos de Cytospin teñidos con Giemsa que muestran el contenido celular por encima de la barrera del gel como se describe en el Ejemplo 9b, en la que los portaobjetos de izquierda a derecha son: (P) - suero de PtPA; (S) - suero Greiner; (LH) - plasma de heparina de litio Greiner diluido; y (LH) - plasma de heparina de litio Greiner sin diluir.

La Figura 57 muestra la determinación de la proteína total llevada a cabo bajo procedimientos convencionales de Pathology Queensland en muestras de suero y plasma normales, (n = 26), todas muestras de suero y plasma (n = 61) y muestras de pacientes cardíacos (n = 11) como se describe en el Ejemplo 12a.

La Figura 58 muestra el tiempo necesario para que dos concentraciones diferentes de PtPA coagulen el plasma en puntos de tiempo seleccionados durante un período de dos semanas (336 horas) cuando se almacenan a diferentes temperaturas, como se describe en el Ejemplo 15a.

La Figura 59 muestra la actividad de OsPA contra el sustrato cromogénico S-2765 tras la irradiación en tubos sencillos Greiner (P) y en tubos de suero Greiner que contienen sílice y tensioactivo (siP), como se describe en el Ejemplo 15b.

La Figura 60 muestra la actividad de coagulación de plasma citrado de OsPA en tubos sencillos Greiner (P) y en tubos de suero Greiner que contienen sílice y tensioactivo, como se describe en el Ejemplo 15b.

La Figura 61 muestra la actividad (A_{405}/mm) de OsPA contra el sustrato cromogénico S-2765 durante un período de hasta 14 días a 23 °C en comparación con una nueva dilución de reserva, como se describe en el Ejemplo 15c.

- 5 La Figura 62 muestra un ejemplo de un dispositivo (dispositivo de análisis de diagnóstico inmediato en forma de jeringa) diseñado para producir suero de alta calidad para su análisis, como se describe en el Ejemplo 17.

Descripción detallada de la invención

10 1. Definiciones

Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido normalmente por los expertos habituales en la materia a la que pertenece la invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos. Para los fines de la presente invención, a continuación, se definen los siguientes términos.

Los artículos "uno" y "una" se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "*un elemento*" significa un elemento o más de un elemento.

Por "*aproximadamente*" se entiende una cantidad, un nivel, un valor, un número, una frecuencia, un porcentaje, una dimensión, un tamaño, una cantidad, un peso o una longitud que varía, como mucho, en un 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % de la cantidad, el nivel, el valor, el número, la frecuencia, el porcentaje, la dimensión, el tamaño, la cantidad, el peso o la longitud de referencia.

La expresión "*fragmento biológicamente activo*", cuando se aplica a fragmentos de una secuencia polinucleotídica o polipeptídica de referencia o de longitud completa, se refiere a un fragmento que tiene al menos aproximadamente un 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% % de la actividad de una secuencia de referencia. Se incluyen dentro del alcance de la presente invención los fragmentos biológicamente activos, incluyendo aquellos de al menos aproximadamente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500, 2.000 nucleótidos o restos de longitud, que comprenden o codifican una actividad de un polinucleótido o polipéptido de referencia. Los fragmentos biológicamente activos representativos, en general, participan en una interacción, por ejemplo, una interacción intramolecular o intermolecular. Una interacción intermolecular puede ser una interacción de unión específica o una interacción enzimática (por ejemplo, la interacción puede ser transitoria, y se forma o se rompe en enlace covalente). Los fragmentos biológicamente activos de un polipéptido de longitud completa incluyen péptidos que pueden comprender secuencias de aminoácidos suficientemente similares a o derivadas de las secuencias de aminoácidos de un (supuesto) polipéptido de longitud completa. Por lo general, los fragmentos biológicamente activos comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de un polipéptido de longitud completa. De manera adecuada, el fragmento biológicamente activo tiene no menos del aproximadamente 1 %, 10 %, 25 %, 50 % de una actividad del polipéptido de longitud completa del que se deriva.

Por "*secuencia codificante*" se entiende cualquier secuencia de ácido nucleico que contribuya al código para el producto polipeptídico de un gen. Por el contrario, la expresión "*secuencia no codificante*" se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico que no contribuye al código para el producto polipeptídico de un gen.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a no ser que el contexto requiera lo contrario, las palabras "*comprenden*", "*comprende*" y "*que comprende*" se entenderán como la inclusión de una etapa o elemento, o grupo de etapas o de elementos indicados, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento, o grupo de etapas o de elementos. Por lo tanto, el uso de la expresión "*que comprende*" y similares indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes. Por "*que consiste en*" se entiende que incluye, y se limita a, lo que hay detrás de la expresión "*que consiste en*". Por lo tanto, la expresión "*que consiste en*" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "*que consiste esencialmente en*" se entiende que incluye cualquier elemento enumerado después de la expresión, y se limita a otros elementos que no interfieren ni contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación de los elementos enumerados. Por lo tanto, la expresión "*que consiste esencialmente en*" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales, y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos enumerados.

Los términos "*complementario*" y "*complementariedad*" se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T", es complementaria a la secuencia "T-C-A". La complementariedad puede ser "parcial", en la que solo algunas de las bases de los ácidos nucleicos coinciden de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. O bien, puede haber una complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre

las cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficacia y la fuerza de la hibridación entre las cadenas de ácido nucleico.

Por "*corresponde a*" o "*correspondiente a*" se entiende (a) un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es esencialmente idéntica o complementaria a toda o una parte de una secuencia polinucleotídica de referencia o que codifica una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos de un péptido o una proteína; o (b) un péptido o polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es esencialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos de un péptido o una proteína de referencia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "*detección de un analito*" significa determinar la presencia, ausencia, cantidad o concentración de uno o más analitos en una muestra.

Por "*gen*" se entiende una unidad de herencia que ocupa un locus específico en un cromosoma y que consiste en secuencias reguladoras de la transcripción y/o de la traducción y/o una región codificante y/o secuencias no traducidas (es decir, intrones, secuencias 5' y 3' no traducidas).

"*Homología*" se refiere al número porcentual de ácidos nucleicos o aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservativas. La homología se puede determinar usando programas de comparación de secuencias tal como GAP (Devereux *et al.*, 1984). De esta forma, se podrían comparar secuencias de una longitud similar o esencialmente diferente a las citadas en el presente documento mediante la inserción de huecos en la alineación, determinándose dichos huecos, por ejemplo, mediante el algoritmo de comparación usado por GAP.

La expresión "*célula hospedadora*" incluye una célula individual o un cultivo celular que puede ser o ha sido receptor de uno cualquiera o varios vectores recombinantes o polinucleótido aislado de la invención. Las células hospedadoras incluyen la progenie de una sola célula hospedadora, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en el complemento de ADN total) a la célula parental original debido a una mutación y/o cambio natural, accidental o deliberado. Una célula hospedadora incluye células transfectadas o infectadas *in vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido de la invención. Una célula hospedadora que comprende un vector recombinante de la invención es una célula hospedadora recombinante.

El término "*hibridación*" se usa en el presente documento para denotar el emparejamiento de secuencias de nucleótidos complementarias para producir un híbrido de ADN-ADN o un híbrido de ADN-ARN. Las secuencias de bases complementarias son aquellas secuencias que están relacionadas por las reglas de emparejamiento de bases. En el DNA, A se empareja con T, y C se empareja con G. En el ARN U se empareja con A, y C se empareja con G. En este sentido, los términos "coincidencia" y "falta de coincidencia", como se usan en el presente documento, se refieren al potencial de hibridación de nucleótidos emparejados en cadenas de ácido nucleico complementarias. Los nucleótidos coincidentes se hibridan eficazmente, tal como el par de bases A-T y G-C clásico mencionado anteriormente. Las faltas de coincidencia son otras combinaciones de nucleótidos que no se hibridan eficazmente.

Por "*aislado*" se entiende un material que está sustancial o esencialmente exento de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un "*polinucleótido aislado*", como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido, que se ha purificado a partir de las secuencias que lo flanquean en un estado natural, *por ejemplo*, un fragmento de ADN que se ha eliminado de las secuencias que normalmente están adyacentes al fragmento. Como alternativa, un "*péptido aislado*" o un "*polipéptido aislado*" y similares, como se usa en el presente documento, se refiere al aislamiento y/o la purificación *in vitro* de una molécula peptídica o polipeptídica de su entorno celular natural, y de la asociación con otros componentes de la célula, *es decir*, no está asociada con sustancias *in vivo*.

Por "*obtenido de*" se entiende que el polipéptido o complejo, por ejemplo, está aislado, o derivado de, una determinada fuente.

La expresión "*oligonucleótido*" como se usa en el presente documento se refiere a un polímero compuesto de una multiplicidad de restos de nucleótidos (desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o variantes estructurales relacionadas o análogos sintéticos de los mismos) unidos a través de enlaces fosfodiéster (o variantes estructurales relacionadas o análogos sintéticos de los mismos). Por lo tanto, aunque el término "oligonucleótido" normalmente se refiere a un polímero de nucleótidos en el que los restos de nucleótidos y los enlaces entre ellos son naturales, se entenderá que la expresión también incluye dentro de su alcance diversos análogos, incluyendo pero sin limitación, ácidos peptidonucleicos (APN), fosforamidatos, fosforotioatos, metil-fosfonatos, ácidos 2-O-metil-ribonucleicos y similares. El tamaño exacto de la molécula puede variar según la aplicación en particular. Un oligonucleótido es normalmente de una longitud bastante corta, en general, de aproximadamente 10 a 30 restos de nucleótidos, pero la expresión puede referirse a moléculas de cualquier longitud, aunque el término "*polinucleótido*" o "*ácido nucleico*" normalmente se usa para oligonucleótidos de gran tamaño.

La expresión "*operativamente unido*", como se usa en el presente documento, significa la colocación de un gen estructural bajo el control regulador de un promotor, que luego controla la transcripción y, opcionalmente, la

traducción del gen. En la construcción de combinaciones heterólogas de promotor/gen estructural, en general, se prefiere colocar la secuencia genética o el promotor a una distancia del sitio de inicio de la transcripción del gen que sea aproximadamente igual a la distancia que hay entre esa secuencia genética o promotor y el gen que ejerce el control en su entorno natural; es decir, el gen del que se deriva la secuencia genética o el promotor. Como es sabido en la técnica, se puede adaptar alguna variación en esta distancia sin pérdida de función. Asimismo, la colocación preferida de un elemento de secuencia reguladora con respecto a un gen heterólogo que se colocará bajo su control está definida por la colocación del elemento en su entorno natural; es decir, los genes de los que se deriva.

Los términos "*paciente*", "*sujeto*" e "*individuo*" se usan indistintamente, y se refieren a pacientes, sujetos e individuos humanos u otros mamíferos, e incluyen cualquiera en el que se deseen detectar niveles de analitos o diagnosticar la presencia, ausencia o gravedad de una enfermedad o afección usando la invención. Sin embargo, se entenderá que "*paciente*" no implica la presencia de síntomas. Los mamíferos adecuados que entran dentro del alcance de la invención incluyen, pero sin limitación, primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés), animales de granja (por ejemplo, ovejas, vacas, caballos, burros, cerdos), animales de ensayo de laboratorio (por ejemplo, conejos, ratones, ratas, cobayas, hámsteres), animales de compañía (por ejemplo, gatos, perros) y animales salvajes en cautividad (por ejemplo, zorros, ciervos, dingos).

El término "*polinucleótido*" o "*ácido nucleico*" como se usa en el presente documento designa ARNm, ARN, ARNc, ADNc o ADN. El término normalmente se refiere a la forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN monocatenarias o bicatenarias.

La expresión "*variante de polinucleótido*" y el término "*variante*" y similares se refieren a polinucleótidos que presentan una identidad de secuencia sustancial con una secuencia polinucleotídica de referencia o polinucleótidos que se hibridan con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas que se definen más adelante. Estos términos también engloban polinucleótidos que se distinguen de un polinucleótido de referencia por la adición, eliminación o sustitución de al menos un nucleótido. Por consiguiente, la expresión "*variante de polinucleótido*" y el término "*variante*" incluyen polinucleótidos en los que uno o más nucleótidos se han añadido o eliminado, o reemplazado por nucleótidos diferentes. En este sentido, se entiende bien en la técnica que pueden realizarse ciertas alteraciones que incluyen mutaciones, adiciones, eliminaciones y sustituciones en un polinucleótido de referencia mediante las que el polinucleótido modificado conserva la función o actividad biológica del polinucleótido de referencia. La expresión "*variante de polinucleótido*" y el término "*variante*" también incluyen variantes alélicas de origen natural.

"*Polipéptido*", "*péptido*" y "*proteína*" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos, y a variantes y análogos sintéticos de los mismos. Por lo tanto, estos términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son aminoácidos sintéticos no naturales, tales como un análogo químico de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural.

La expresión "*variante polipeptídica*" se refiere a polipéptidos que se distinguen de un polipéptido de referencia en la adición, eliminación o sustitución de al menos un resto de aminoácido. En determinadas realizaciones, una variante polipeptídica se distingue de un polipéptido de referencia en una o más sustituciones, que pueden ser conservativas o no conservativas. En determinadas realizaciones, la variante polipeptídica comprende sustituciones conservativas y, en este sentido, se conoce bien en la técnica que algunos aminoácidos pueden cambiarse por otros con propiedades ampliamente similares sin cambiar la naturaleza de la actividad del polipéptido. Las variantes polipeptídicas también engloban polipéptidos en los que se han añadido o eliminado uno o más aminoácidos, o se han reemplazado por diferentes restos de aminoácidos.

Por "*cebador*" se entiende un oligonucleótido que, cuando se empareja con una cadena de ADN, es capaz de iniciar la síntesis de un producto de extensión de cebador en presencia de un agente polimerizador adecuado. El cebador es preferentemente monocatenario para obtener una máxima eficacia en la amplificación, pero, como alternativa, puede ser bicatenario. Un cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente polimerizador. La longitud del cebador depende de muchos factores, incluyendo la aplicación, la temperatura que se vaya a emplear, las condiciones de reacción del molde, otros reactivos y la fuente de los cebadores. Por ejemplo, en función de la complejidad de la secuencia diana, el cebador oligonucleotídico normalmente contiene de 15 a 35 o más restos de nucleótidos, aunque puede contener menos restos de nucleótidos. Los cebadores pueden ser polinucleótidos grandes, tales como de aproximadamente 200 restos de nucleótidos a varias kilobases o más. Los cebadores se pueden seleccionar para que sean "sustancialmente complementarios" a la secuencia en el molde designado para que se hibriden y sirvan como un sitio para el inicio de la síntesis. Por "*sustancialmente complementario*", se entiende que el cebador es suficientemente complementario para hibridarse con un polinucleótido diana. Preferentemente, el cebador no contiene faltas de coincidencia con el molde designado para su hibridación, pero esto no es esencial. Por ejemplo, los restos de nucleótidos no complementarios se pueden unir al extremo 5' del cebador, siendo la secuencia restante de cebador complementaria al molde. Como alternativa, los restos de nucleótidos no complementarios o un tramo de restos de nucleótidos no complementarios se pueden intercalar en un cebador, siempre que la secuencia de cebador

tenga suficiente complementariedad con la secuencia del molde para hibridarse con él y formar así un molde para la síntesis del producto de extensión del cebador.

"Sonda" se refiere a una molécula que se une a una secuencia específica o subsecuencia u otra fracción de otra molécula. A menos que se indique otra cosa, el término "sonda" normalmente se refiere a una sonda de polinucleótido que se une a otro polinucleótido, a menudo denominado "*polinucleótido diana*", mediante el emparejamiento de bases complementarias. Las sondas se pueden unir a polinucleótidos diana que carecen de complementariedad de secuencia completa con la sonda, dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas pueden marcarse directa o indirectamente.

La expresión "*resultado de referencia*" incluye un resultado tomado del mismo sujeto en un momento diferente, un resultado de un sujeto normal o de un grupo de sujetos normales, o un patrón de referencia usado en una prueba analítica.

Por "*elemento regulador*" o "*secuencia reguladora*" se entiende secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en una determinada célula hospedadora. Las secuencias reguladoras que son adecuadas para las células procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor y, opcionalmente, una secuencia que actúe en *cis*, tal como una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Las secuencias de control que son adecuadas para las células eucariotas incluyen promotores, señales de poliadenilación, potenciadores de la transcripción, potenciadores de la traducción, secuencias líder o remolque que modulan la estabilidad del ARNm, así como secuencias de dirección que dirigen un producto codificado por un polinucleótido transcrito a un compartimiento intracelular dentro de una célula o al ambiente extracelular.

La expresión "*identidad de las secuencias*", como se usa en el presente documento, se refiere a la extensión en la que las secuencias son idénticas en cuanto a los nucleótidos o en cuanto a los aminoácidos en una ventana de comparación. Por lo tanto, un "*porcentaje de identidad de secuencia*" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas en una ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el resto de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gin, Cys y Met) aparece en ambas secuencias para obtenerse el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. Para los fines de la presente invención, se puede entender que "*identidad de secuencia*" significa el "*porcentaje de coincidencia*" calculado por el programa informático DNASIS (Versión 2.5 para Windows; disponible en Hitachi Software Engineering Co., Ltd., San Francisco del sur, California, EE. UU.) usando los valores predeterminados convencionales como se usan en el material de referencia que acompaña al software.

La expresión "*similitud de secuencias*" se refiere al porcentaje de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservativas como las definidas en la siguiente Tabla 2. La similitud se puede determinar usando programas de comparación de secuencias tales como GAP (Devereux *et al.*, 1984). De este modo, se podrían comparar secuencias de una longitud similar o esencialmente diferente a las citadas en el presente documento mediante la inserción de huecos en la alineación, determinándose dichos huecos, por ejemplo, mediante el algoritmo de comparación usado por GAP.

Las expresiones usadas para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "*secuencia de referencia*", "*ventana de comparación*", "*identidad de secuencias*", "*porcentaje de identidad de secuencia*" e "*identidad sustancial*". Una "*secuencia de referencia*" es de al menos 12, pero, con frecuencia, de 15 a 18, y a menudo, de al menos 25 unidades de monómero, incluyendo los nucleótidos y restos de aminoácidos, de longitud. Debido a que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, solo una parte de la secuencia polinucleotídica completa) que sea similar entre los dos polinucleótidos; y (2) una secuencia que sea divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos se realizan normalmente comparando las secuencias de los dos polinucleótidos en una "*ventana de comparación*" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "*ventana de comparación*" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, normalmente, de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más normalmente, de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en el que una secuencia se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas una vez que las dos secuencias estén alineadas de manera óptima. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, espacios) del aproximadamente 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni eliminaciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede realizarse mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE. UU.) o mediante inspección y la mejor alineación (es decir, que da lugar al porcentaje de homología más alto en la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST según lo descrito por Altschul *et al.*, 1997. Se puede encontrar una descripción

detallada del análisis de secuencias en la Unidad 19.3 de Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.

"*Rigurosidad*" como se usa en el presente documento, se refiere a las condiciones de temperatura y fuerza iónica, y a la presencia o ausencia de ciertos disolventes orgánicos, durante la hibridación y procedimientos de lavado. Cuanto mayor sea la rigurosidad, mayor será el grado de complementariedad entre las secuencias de nucleótidos diana inmovilizadas y las secuencias de polinucleótidos sonda marcadas que permanecen hibridadas con la diana tras el lavado. La expresión "*alta rigurosidad*" se refiere a la temperatura y a las condiciones iónicas en las que solo se hibridarán las secuencias de nucleótidos que tengan una alta frecuencia de bases complementarias. La rigurosidad requerida depende de la secuencia de nucleótidos y depende de los diversos componentes presentes durante la hibridación. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean de aproximadamente 10 a 20 °C inferiores al punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que un 50 % de la secuencia diana se hibrida con una sonda complementaria.

El término "*transformación*" significa la alteración del genotipo de un organismo, por ejemplo, una bacteria, levadura, mamífero, ave, reptil, pez o planta, mediante la introducción de un ácido nucleico foráneo o endógeno.

Por "*vector*" se entiende una molécula de polinucleótido, preferentemente, una molécula de ADN derivada, por ejemplo, de un plásmido, bacteriófago, levadura o virus, en la que puede introducirse o clonarse un polinucleótido. Un vector preferentemente contiene uno o más sitios de restricción únicos, y puede ser capaz de replicarse de manera autónoma en una célula hospedadora definida, incluyendo una célula o un tejido diana, o una célula o un tejido progenitor de la misma, o puede integrarse con el genoma del hospedador definido de modo que la secuencia clonada sea reproducible. Por consiguiente, El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es *decir*, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido circular lineal o cerrado, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Como alternativa, el vector puede ser aquel que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma y se replica junto con el o los cromosomas en los que se ha integrado. Un sistema de vector puede comprender un solo vector o plásmido, dos o más vectores o plásmidos, que juntos contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula hospedadora, o un transposón. La elección del vector normalmente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula hospedadora en la que se va a introducir el vector. En el presente caso, el vector es preferentemente un vector vírico o derivado de virus, que es operativamente funcional en células de animales y, preferentemente, de mamíferos. Dicho vector puede derivarse de un poxvirus, un adenovirus o de levadura. El vector también puede incluir un marcador de selección tal como un gen de resistencia a antibióticos que se puede usar para la selección de transformantes adecuados. Los ejemplos de dichos genes de resistencia son conocidos por los expertos en la materia, e incluyen el *nptII*, que confiere resistencia a los antibióticos kanamicina y G418 (Geneticin®) y el gen *hph*, que confiere resistencia al antibiótico higromicina B.

Las expresiones "*de tipo silvestre*" y "*de origen natural*" se usan indistintamente para referirse a un gen o producto génico que tiene las características de ese gen o producto génico cuando se aísla de una fuente de origen natural. Un gen o producto génico de tipo silvestre (por ejemplo, un polipéptido) es aquel que se observa con mayor frecuencia en una población y, por lo tanto, se designa de forma arbitraria la forma "*normal*" o "*de tipo silvestre*" del gen.

2. Activadores de la protrombina

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los activadores de la protrombina son agentes de coagulación adecuados para preparar suero que se usa para detectar analitos, a pesar de su actividad proteolítica conocida. Los activadores de la protrombina (a veces conocidos como protrombinasas) presentan actividad de tipo tripsina y activan la protrombina (es decir, convierten la protrombina en trombina que, a su vez, convierte el fibrinógeno en fibrina y, por lo tanto, causan la formación de coágulos).

En algunas realizaciones, el activador de la protrombina es un activador de la protrombina exógeno. Como se usa en el presente documento, un "*activador de la protrombina exógeno*" significa un activador de la protrombina obtenido a partir de una fuente diferente a la muestra de sangre a partir de la que debe prepararse la muestra de suero.

2.1 Activadores de la protrombina de tipo silvestre o de origen natural

Los activadores de la protrombina usados en la presente invención pueden comprender activadores de la protrombina de tipo silvestre o de origen natural, que incluyen los obtenidos a partir de cualquier organismo adecuado, incluyendo el activador de la protrombina de serpiente, de ser humano, bovino y bacteriano. El activador de la protrombina puede comprender un polipéptido de tipo silvestre o de origen natural de longitud completa.

En determinadas realizaciones, el activador de la protrombina es un activador de la protrombina de serpiente. De manera adecuada, el activador de la protrombina es un activador de la protrombina de veneno de serpiente. Los

activadores de la protrombina de veneno de serpiente, en general, se clasifican en cuatro grupos (A, B, C y D), dependiendo de su estructura, función y requisitos para cofactores.

De manera adecuada, el activador de la protrombina de veneno de serpiente es un activador de la protrombina del grupo A. Los activadores de la protrombina del grupo A son metaloproteinasas que consisten en tres dominios: una metaloproteinasa, una desintegrina y un dominio rico en Cys. El dominio de metaloproteinasas contiene la secuencia de consenso HEXXHXXGXXH, que corresponde al sitio activo quelante de cinc. Estos activadores de la protrombina se encuentran al menos en varios venenos de víbora, e incluyen la ecarina del veneno de *Echis carinatus* y la basparina del veneno de *Bothrops asper*.

De manera adecuada, el activador de la protrombina de veneno de serpiente es un activador de la protrombina del grupo B. Los activadores de la protrombina del grupo B son metaloproteinasas que consisten en dos subunidades mantenidas de forma no covalente: una metaloproteinasa y un dímero con enlace disulfuro de tipo lectina de tipo C. Estos activadores de la protrombina se encuentran en varios venenos de víbora, e incluyen la carinactivasa-1 y la carinactivasa-2 del veneno de *Echis carinatus*, y la multactivasa del veneno de *Echis multisquamatus*.

De manera adecuada, el activador de la protrombina de veneno de serpiente es un activador de la protrombina del grupo C. Los activadores de la protrombina del grupo C son serina proteasas, y se asemejan al complejo Va del factor Xa de mamífero. La pseutarina C (o PtPA) y la oscutarina C (u OsPA) son activadores de la protrombina del grupo C de los venenos de *Pseudonaja textilis* y *Oxyuranus scutellatus*, respectivamente. La omicarina C es el activador de la protrombina del veneno de *Oxyuranus microlepidotus*.

De manera adecuada, el activador de la protrombina de veneno de serpiente es un activador de la protrombina del grupo D. Los activadores de la protrombina del grupo D son serina proteasas, y son funcionalmente similares al factor Xa de mamífero. La porfarina D (de *Pseudechis porphyriacus*), la notecarina D (de *Notechis scutatus*), la trocarina D (de *Tropidechis carinatus*), la hopsarina D (de *Hoplocephalus stephensi*), y la notenarina D (de *Notechis ater niger*) son todos activadores de la protrombina del grupo D.

En Kini, R. M. (2005), se proporciona una revisión de los activadores de la protrombina de serpiente, de aquellos específicamente del veneno de elápidos australianos (activadores de la protrombina del grupo C y D) se encuentra en St. Pierre *et al.* (2005). Estas dos revisiones usan la clasificación de los activadores de la protrombina de serpiente en los grupos A-D como se ha descrito anteriormente. Esta clasificación reemplaza al sistema de clasificación anterior usando los grupos I-III (el grupo I abarca los grupos A y B; el grupo II ahora es el grupo D y el grupo III ahora es el grupo C) y, a veces, los grupos adicionales IV (activadores de veneno de serpiente que escinden enlaces peptídicos en protrombina, pero no convierten la protrombina en un producto enzimáticamente activo, es decir, trombina o meizotrombina) y V (activadores de la protrombina bacterianos) como se describe en artículos de revisión anteriores, entre los que se incluye Rosing, J. *et al.* (1991) y Rosing, J. *et al.* (1992). Para una explicación sobre el cambio en el sistema de clasificación, véase Kini, R. M., *et al.* (2001).

En realizaciones específicas, el activador de la protrombina de serpiente se obtiene de la Familia *Elapidae*, cuyos ejemplos ilustrativos incluyen especies de los géneros *Demansia*, *Hoplocephalus*, *Notechis*, *Oxyuranus*, *Pseudechis*, *Pseudonaja*, *Rhinoplocephalus*, Y *Tropidechis* incluyendo, pero sin limitación *Demansia vestigiata*, *Hoplocephalus stephensi*, *Notechis ater humphreysi*, *Notechis ater niger*, *Notechis ater serventyi*, *Notechis flinkders*, *Notechis humphreysi*, *Notechis niger*, *Notechis occidentalis*, *Notechis scutatus*, *Notechis scutatus scutatus*, *Notechis serventyi*, *Oxyuranus microlepidotus*, *Oxyuranus scutellatus*, *Pseudechis porphyriacus*, *Pseudonaja affinis*, *Pseudonaja inframaculata*, *Pseudonaja nuchalis*, *Pseudonaja textilis*, *Rhinoplocephalus nigrescens*, y *Tropidechis carinatus*.

En realizaciones específicas, el activador de la protrombina de serpiente se obtiene de la Familia *Viperidae*, cuyos ejemplos ilustrativos incluyen especies de los géneros *Bothrops*, *Echis* y *Trimeresurus*, Incluyendo, pero sin limitación, *Bothrops alternatus*, *Bothrops asper*, *Bothrops atrox*, *Bothrops atrox asper*, *Bothrops brasili*, *Bothrops castelnaudi*, *Bothrops columbiensis*, *Bothrops erythromelas*, *Bothrops fonsecai*, *Bothrops itapetiningae*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops venezuelensis*, *Echis carinatus*, *Echis coloratus*, *Echis multisquamatus*, y *Trimeresurus okinavensis*.

En realizaciones específicas, el activador de la protrombina de serpiente se obtiene de la Familia *Colubridae*, cuyos ejemplos ilustrativos incluyen especies de los géneros *Dispholidus*, *Rhabdophis* y *Thelotornis*, Incluyendo, pero sin limitación, *Dispholidus typus*, *Rhabdophis tigrinus tigrinus*, *Thelotornis kirtlandii*, y *Thelotornis capensis*.

En algunas realizaciones, el activador de la protrombina de serpiente es de o se obtiene de veneno de serpiente. La purificación y caracterización de PtPA del veneno de serpiente de *P. textilis* se describe en Masci (1986) y Masci *et al.*, (1998), y OsPA de veneno de *O. scutellatus* se describe en Speijer *et al.*, (1986). La purificación y caracterización de la ecarina de veneno de *Echis carinatus* se describe en Morita, T *et al.* (1981) y Nishida, S *et al.* (1995), de la carinactivasa de veneno de *Echis carinatus* se describe en Yamada, D *et al.* (1996), de la multactivasa de *Echis multisquamatus* se describe en Yamada, D. *et al.*, (1997), y de notecarina de *Notechis scutatus* se describe en Tans, G *et al.*, (1985).

En determinadas realizaciones, el activador de la protrombina es un activador de la protrombina de mamífero. Los activadores de la protrombina de mamífero incluyen los derivados de sangre y/o tejido humano y los derivados de sangre y/o tejido bovino.

- 5 En determinadas realizaciones, el activador de la protrombina es un activador de la protrombina bacteriano. Los activadores de la protrombina bacterianos incluyen los de *Staphylococcus aureus*, *Peptococcus indolicus*, *Bacteroides melaninogenicus*, y *Pseudomonas aeruginosa* (Rosing, J. et al. (1991).

10 Como apreciarán los expertos en la materia, el activador de la protrombina puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en uno o más polipéptidos. En algunas realizaciones, el activador de la protrombina comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, un solo polipéptido. En otras realizaciones, el activador de la protrombina comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, más de un polipéptido, incluyendo, pero sin limitación, complejos de polipéptidos. Cuando el activador de la protrombina comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, más de un polipéptido, cada polipéptido puede ser de organismos del mismo o de diferentes géneros, y/o de la misma o de diferente especie.

15 En determinadas realizaciones, el activador de la protrombina comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las expuestas en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 51 y 52, o comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las establecidas en SEQ ID NO: 5, 6, 9, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 y 49.

2.2 Activadores de la protrombina quiméricos y polipéptidos de fusión

25 La presente invención también contempla el uso de activadores de la protrombina que comprenden un polipéptido quimérico. Como se usa en el presente documento, un "polipéptido quimérico" incluye un primer componente polipeptídico que comprende un polipéptido obtenido a partir de un primer organismo unido a un segundo componente polipeptídico obtenido a partir de un segundo organismo. En algunas realizaciones, el primer organismo y el segundo organismo son de diferentes géneros. En otras realizaciones, el primer organismo y el segundo organismo son especies diferentes del mismo género. En determinadas realizaciones, el activador de la protrombina comprende un polipéptido quimérico que se asemeja a un complejo Va del factor Xa, en el que el primer polipéptido comprende un polipéptido similar al factor Xa y el segundo polipéptido comprende un polipéptido similar al factor Va. En determinadas realizaciones específicas, el primer polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las expuestas en SEQ ID NO: 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 y 50, o comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las establecidas en SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 y 49, y el segundo polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las expuestas en SEQ ID NO: 7, 8, 11, 12, 13, 16 y 18, o comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las establecidas en SEQ ID NO: 5, 6, 9, 10, 14, 15 y 17.

40 La presente invención también contempla el uso de activadores de la protrombina que comprenden un polipéptido de fusión. Como se usa en el presente documento, un "polipéptido de fusión" incluye un primer componente polipeptídico unido a un segundo componente polipeptídico. El primer componente polipeptídico se puede obtener a partir de un primer organismo y el segundo componente polipeptídico se puede obtener a partir de un segundo organismo. En algunas realizaciones, el primer organismo y el segundo organismo son de diferentes géneros. En otras realizaciones, el primer organismo y el segundo organismo son especies diferentes del mismo género. El primer componente polipeptídico o el segundo componente polipeptídico del polipéptido de fusión pueden corresponder a la totalidad o a una parte (por ejemplo, un fragmento como se describe en el presente documento) de una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre o de origen natural. El segundo componente polipeptídico se puede fusionar al extremo N o al extremo C del primer componente polipeptídico.

2.3 Fragmentos de polipéptidos de tipo silvestre o de origen natural

55 El activador de la protrombina puede comprender un fragmento de un polipéptido de tipo silvestre o de origen natural de longitud completa, en el que el activador de la protrombina presente actividad de activación de la protrombina.

60 Por lo general, los fragmentos de un polipéptido de longitud completa pueden participar en una interacción, por ejemplo, una interacción intramolecular o intermolecular. Dichos fragmentos incluyen péptidos que comprenden las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 2, 3, 4, 51 y 52, y péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente similares a o derivadas de las secuencias de aminoácidos de un (supuesto) polipéptido de longitud completa, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 1, 7, 8, 12, 13, 16, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, y 50, o las secuencias de aminoácidos codificadas por una secuencia de nucleótidos seleccionada entre las establecidas en SEQ ID NO: 5, 6, 9, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 y 49, que incluyen menos aminoácidos que un polipéptido de longitud completa, y muestran una actividad de ese polipéptido.

2.4 Variantes de activadores de la protrombina de origen natural (polipéptido)

La presente invención también contempla activadores de la protrombina que comprenden polipéptido/s que es/son variante/s del/los polipéptido/s de tipo silvestre o de origen natural. Los activadores de la protrombina que comprenden una o más variantes polipeptídicas abarcados por la presente invención son biológicamente activos, es decir, siguen teniendo actividad de activación de la protrombina.

Dichos activadores de la protrombina de "*variantes*" incluyen polipéptidos derivados del polipéptido nativo, en los que los polipéptidos se derivan del/de los polipéptido/s nativo/s correspondiente/s mediante la eliminación (denominada truncamiento) o adición de uno o más aminoácidos al extremo N y/o extremo C del/los polipéptido/s nativo/s; la eliminación o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios del/de los polipéptido/s nativo/s; o la sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios del/de los polipéptido/s nativo/s. Estas variantes de activadores de la protrombina pueden ser el resultado de, por ejemplo, el polimorfismo genético o la manipulación humana.

Otros ejemplos no limitantes de variantes de polipéptidos incluyen un polipéptido precursor o polipéptido en formas procesadas de formas de zimógenos de un polipéptido precursor o polipéptido de longitud completa en forma de zimógeno.

Las variantes de un polipéptido de tipo silvestre o de origen natural tendrán al menos el 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, en general, al menos el 75 %, 80 %, 85 %, normalmente, al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más, y normalmente, aproximadamente el 96 %, 97 %, 98 % o más (y todos los porcentajes enteros que hay entre ellos) de similitud o identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos para el polipéptido de tipo silvestre o de origen natural, incluyendo, pero sin limitación, las secuencias de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 51 y 52, o las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, 6, 9, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 y 49, según lo determinado por los programas de alineación de secuencias descritos en otra parte del presente documento usando los parámetros por defecto. Una variante de un polipéptido de tipo silvestre o de origen natural, que pertenece al alcance de una variante de polipéptido, puede diferir de ese polipéptido, en general, en tanto como 200, 100, 50 o 20 restos de aminoácidos o, de manera adecuada, en tan solo 1-15 restos de aminoácidos, tan solo 1-10, tal como 6-10, tan solo 5, tan solo 4, 3, 2 o incluso 1 resto de aminoácido. En algunas realizaciones, una variante de polipéptido difiere de las secuencias correspondientes de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 51 o 52, o las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, 6, 9, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 o 49, en al menos 1, pero en menos de 15, 10 o 5 restos de aminoácidos. En otras realizaciones, difiere de las secuencias correspondientes de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 51 o 52, o las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, 6, 9, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 o 49, en al menos un resto, pero menos del 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de los restos.

Un polipéptido se puede modificar de diversas maneras incluyendo sustituciones, eliminaciones, truncamientos, e inserciones de aminoácidos. Los métodos para dichas manipulaciones son conocidos en general en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar variantes de secuencias de aminoácidos de un polipéptido mediante mutaciones en el ADN. Son bien conocidos en la técnica los métodos para las mutagénesis y las modificaciones en las secuencias de nucleótidos. Véase, por ejemplo, Kunkel (1985), Kunkel *et al.*, (1987), patente de EE.UU. n.º 4.873.192, Watson *et al.*, (1987) y las referencias citadas en los mismos. Se pueden encontrar directrices en cuanto a sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afecten a la actividad biológica de la proteína de interés en el modelo de Dayhoff *et al.* (1978). En la técnica, se conocen métodos para explorar productos génicos de genotecas combinatorias preparados mediante mutaciones puntuales o truncamiento, y para explorar genotecas de ADNc para productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Dichos métodos son adaptables para la exploración rápida de las genotecas generadas por mutagénesis combinatoria de polipéptidos. La mutagénesis de conjunto recursivo (REM), una técnica que mejora la frecuencia de mutantes funcionales en las genotecas, se puede usar en combinación con los ensayos de exploración para identificar variantes de polipéptidos, véase, por ejemplo, Arkin *et al.* (1992) y Delagrave *et al.* (1993). Pueden ser deseables las sustituciones conservativas, tales como el intercambio de un aminoácido por otro que tenga propiedades similares, tal como se analiza con más detalle a continuación.

Las variantes de polipéptidos pueden contener sustituciones de aminoácidos conservativas en diversas ubicaciones a lo largo de su secuencia, en comparación con una secuencia de aminoácidos precursora (por ejemplo, de origen natural o de referencia). Una "*sustitución de aminoácidos conservativa*" es aquella en la que se reemplaza el resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tenga una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares, que, en general, se pueden clasificar de la siguiente manera:

Ácido: el resto tiene una carga negativa debido a la pérdida del ion de H a pH fisiológico, y el resto es atraído por la solución acuosa para buscar las posiciones superficiales en la configuración de un péptido en el que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso a pH fisiológico. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral ácida incluyen ácido glutámico y ácido aspártico.

Básico: el resto tiene una carga positiva debido a la asociación con el ion de H a pH fisiológico o más/menos una o dos unidades de pH del mismo (por ejemplo, histidina), y el resto es atraído por la solución acuosa para buscar las posiciones superficiales en la configuración de un péptido en el que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso a pH fisiológico. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral básica incluyen arginina, lisina e histidina.

Cargado: los restos se cargan a pH fisiológico y, por lo tanto, incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas o básicas (es decir, ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, lisina e histidina).

Hidrófobo: los restos no están cargados a pH fisiológico, y el resto es atraído por la solución acuosa para buscar las posiciones internas en la configuración de un péptido en el que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba incluyen tirosina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina y triptófano.

Neutro/polar: los restos no están cargados a pH fisiológico, pero el resto no es repelido lo suficiente por soluciones acuosas para que busque posiciones internas en la configuración de un péptido en el que está contenido cuando el péptido está en medio acuoso. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra/polar incluyen asparagina, glutamina, cisteína, histidina, serina y treonina.

Esta descripción también caracteriza ciertos aminoácidos como "*pequeños*", ya que sus cadenas laterales no son lo suficientemente grandes, incluso si faltan grupos polares, para conferir hidrofobicidad. A excepción de la prolina, los aminoácidos "*pequeños*" son aquellos con cuatro átomos de carbono o menos cuando hay al menos un grupo polar en la cadena lateral, y tres átomos de carbono o menos cuando no lo hay. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral pequeña incluyen glicina, serina, alanina y treonina. El aminoácido secundario codificado genéticamente prolina es un caso especial debido a sus efectos conocidos sobre la configuración secundaria de las cadenas peptídicas. La estructura de la prolina difiere del resto de aminoácidos naturales en que su cadena lateral está unida al nitrógeno del grupo amino α , así como también al carbono α . Varias matrices de similitud de aminoácidos (por ejemplo, la matriz PAM120 y la matriz PAM250 descritas, por ejemplo, por Dayhoff *et al.* (1978) y por Gonnet *et al.* (1992)), sin embargo, incluyen prolina en el mismo grupo que la glicina, serina, alanina y treonina. Por consiguiente, para los fines de la presente invención, la prolina se clasifica como un aminoácido "*pequeño*".

El grado de atracción o repulsión requerido para la clasificación como polar o no polar es arbitrario y, por lo tanto, los aminoácidos contemplados específicamente por la invención se han clasificado como uno o como el otro. La mayoría de los aminoácidos no nombrados específicamente se pueden clasificar en función de su comportamiento conocido.

Los restos de aminoácidos se pueden subclasificar como, cíclicos o no cíclicos, y aromáticos o no aromáticos, clasificaciones autoexplicativas con respecto a los grupos sustituyentes de cadena lateral de los restos, y como pequeños o grandes. El resto se considera pequeño si contiene un total de cuatro átomos de carbono o menos, incluyendo el átomo de carbono carboxílico, con la condición de que esté presente un sustituyente polar adicional; tres o, si no, menos. Los restos pequeños son, por supuesto, siempre no aromáticos. Dependiendo de sus propiedades estructurales, los restos de aminoácidos pueden pertenecer a dos o más clases. Para los aminoácidos proteicos de origen natural, en la Tabla 1, se presenta la subclasificación de acuerdo con este esquema.

TABLA 1

SUBCLASIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS	
Ácidos	Ácido aspártico, Ácido glutámico
Básicos	No cíclicos: Arginina, Lisina; Cíclicos: Histidina
Cargados	Ácido aspártico, Ácido glutámico, Arginina, Lisina, Histidina
Pequeños	Glicina, Serina, Alanina, Treonina, Prolina
Polares/neutros	Asparagina, Histidina, Glutamina, Cisteína, Serina, Treonina
Polares/grandes	Asparagina, Glutamina
Hidrófobos	Tirosina, Valina, Isoleucina, Leucina, Metionina, Fenilalanina, Triptófano
Aromáticos	Triptófano, Tirosina, Fenilalanina
Restos que influyen en la orientación de la cadena	Glicina y Prolina

La sustitución de aminoácidos conservativa también incluye agrupamientos basados en las cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es el de glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifáticas es el de serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es el de asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es el de fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de

aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es el de lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es el de cisteína y metionina. Por ejemplo, es razonable esperar que el reemplazo de una leucina por una isoleucina o valina, de un aspartato por un glutamato, de una treonina por una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado no tenga un efecto importante sobre las propiedades de la variante de polipéptido resultante. Con el ensayo de su actividad, se puede determinar fácilmente si un cambio de aminoácido da lugar a un polipéptido funcional. En la Tabla 2, se muestran sustituciones conservativas bajo el título de sustituciones ilustrativas y preferidas. Las sustituciones de aminoácidos que se encuentran dentro del alcance de la invención, en general, se logran seleccionando sustituciones que no difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la cadena principal del péptido en la zona de la sustitución; (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana; o (c) el volumen de la cadena lateral. Tras la introducción de las sustituciones, las variantes pueden explorarse para determinar su actividad biológica.

TABLA 2
SUSTITUCIONES DE AMINOÁCIDOS ILUSTRATIVAS Y PREFERIDAS

Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser	Ser
Gln	Asn, His, Lys,	Asn
Glu	Asp, Lys	Asp
Gly	Pro	Pro
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleu	Leu
Leu	Norleu, Ile, Val, Met, Ala, Phe	He
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Ile, Phe	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, Norleu	Leu

Como alternativa, los aminoácidos similares para hacer sustituciones conservativas se pueden agrupar en tres categorías basadas en la identidad de las cadenas laterales. El primer grupo incluye ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, lisina, histidina, todos con cadenas laterales cargadas; el segundo grupo incluye glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, glutamina, asparagina; y el tercer grupo incluye leucina, isoleucina, valina, alanina, prolina, fenilalanina, triptófano, metionina, según lo descrito en Zubay, G. (1993).

Por lo tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho en un polipéptido normalmente se reemplaza por otro resto de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. Como alternativa, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante del gen polipeptídico, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden explorarse para determinar una actividad del polipéptido precursor a fin de identificar mutantes que conserven esa actividad. Tras la mutagénesis de las secuencias codificantes, el péptido codificado puede expresarse de forma recombinante y puede determinarse la actividad del péptido. Un resto de aminoácido "*no esencial*" es un resto que puede modificarse con respecto de la secuencia de tipo silvestre de un polipéptido sin abolir ni alterar sustancialmente una o más de sus actividades. De manera adecuada, la modificación no altera sustancialmente una de estas actividades, por ejemplo, la actividad es al menos un 20 %, 40 %, 60 %, 70 % u 80 % de tipo silvestre. Un resto de aminoácido "*esencial*" es un resto que, cuando se modifica con respecto a la secuencia de tipo silvestre de un polipéptido de referencia, se produce la inhibición de una actividad de la molécula precursora de manera que esté presente menos del 20 % de la actividad de tipo silvestre.

Por consiguiente, la presente invención también contempla variantes de las secuencias polipeptídicas de origen natural o sus fragmentos biológicamente activos, en la que las variantes se distinguen de la secuencia de origen natural en la adición, Eliminación o sustitución de uno o más restos de aminoácido. En general, las variantes mostrarán al menos aproximadamente el 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99

% de similitud con una secuencia polipeptídica de referencia como, por ejemplo, la expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 51 o 52, o la secuencia polipeptídica precursora o de referencia como, por ejemplo, la codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5, 6, 9, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 o 49. De forma deseable, las variantes tendrán al menos un 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 % de similitud de secuencia con una secuencia polipeptídica precursora como, por ejemplo, la expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 51 o 52, o la secuencia polipeptídica precursora como, por ejemplo, la codificada por la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID NO: 5, 6, 9, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 o 49. Además, se contemplan secuencias que difieren de las secuencias originales o precursoras en la adición, eliminación o sustitución de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos, pero que conservan las propiedades del polipéptido precursor. Los polipéptidos también incluyen polipéptidos que están codificados por polinucleótidos que se hibridan en condiciones de rigurosidad como las definidas en el presente documento, en especial, condiciones de alta rigurosidad, secuencias de polinucleótidos codificantes precursoras o la cadena no codificante de las mismas, como se describe más adelante. Las secuencias de polinucleótidos precursoras ilustrativas se exponen en SEQ ID NO: 5, 6, 9, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 y 49.

En algunas realizaciones, las variantes de polipéptidos difieren de una secuencia de referencia en al menos un, pero en menos de 50, 40, 30, 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3 o 2 restos de aminoácido. En otras realizaciones, las variantes de polipéptido difieren de las secuencias correspondientes de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 51 o 52, o las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, 6, 9, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 o 49, en al menos un 1 %, pero menos del 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de los restos. (Si esta comparación requiere alineación, las secuencias se deben alinear para una similitud máxima. Las secuencias de "bucle" de eliminaciones o inserciones, o faltas de coincidencia se consideran diferencias). Las diferencias son, de manera adecuada, diferencias o cambios en un resto no esencial o una sustitución conservativa.

Las variantes de una proteína pueden identificarse seleccionando genotecas combinatorias de mutantes, *por ejemplo*, mutantes de truncamiento, de una proteína. Las bibliotecas o los fragmentos, por ejemplo, fragmentos N-terminales, C-terminales o internos, de una secuencia codificante de proteína se pueden usar para generar una población diversa de fragmentos para su exploración y la posterior selección de variantes de una proteína.

En la técnica, se conocen métodos para explorar productos génicos de genotecas combinatorias preparados mediante mutaciones puntuales o truncamiento, y para explorar genotecas de ADNc para productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Dichos métodos son adaptables para la exploración rápida de las genotecas generadas por mutagénesis combinatoria de proteínas.

Algunas variantes del activador de la protrombina de serpiente ecarina se describen en la patente de EE.UU. n.º 6.413.737.

2.5 Variantes de activadores de la protrombina de origen natural (nucleótido)

La presente invención también contempla activadores de la protrombina que comprenden polipéptido/s que es/son codificado/s por variante/s del/los polinucleótidos/s de tipo silvestre o de origen natural que codifican el/los polinucleótidos/s de tipo silvestre o de origen natural.

Las variantes de un polinucleótido de tipo silvestre o de origen natural tendrán al menos el 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, en general, al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, normalmente, al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más, y normalmente, aproximadamente el 96 %, 97 %, 98 % o más (y todos los porcentajes enteros que hay entre ellos) de similitud o identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos para el polinucleótido de tipo silvestre o de origen natural, incluyendo, pero sin limitación, las secuencias codificadas por las secuencias de SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 18, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 51 o 52, o las secuencias de SEQ ID NO: 5, 6, 9, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 y 49, o un complemento de las mismas, según lo determinado por los programas de alineación de secuencias descritos en otra parte del presente documento usando los parámetros por defecto.

Las secuencias de nucleótidos ilustrativas que codifican los polipéptidos comprenden genes de longitud completa, así como partes de secuencias de nucleótidos de longitud completa o longitud sustancialmente completa de los genes o sus transcripciones o copias de ADN de estas transcripciones. Las partes de una secuencia de nucleótidos pueden codificar partes o segmentos de polipéptidos que conserven la actividad biológica del polipéptido nativo. Una parte de una secuencia de nucleótidos que codifica un fragmento biológicamente activo de un polipéptido puede codificar al menos aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 300 o 400 restos de aminoácidos contiguos, o casi hasta el número total de aminoácidos presentes en un polipéptido de longitud completa.

También se contemplan variantes de las secuencias de nucleótidos. Las variantes de ácido nucleico pueden ser de origen natural, tales como variantes alélicas (el mismo locus), homólogas (locus diferente) y ortólogas (organismo diferente) o pueden ser de origen no natural. Las variantes de origen natural tales como estas se pueden identificar con el uso de técnicas de biología molecular bien conocidas, tales como, por ejemplo, con técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de hibridación como las conocidas en la materia. Las variantes de origen no natural se pueden realizar mediante técnicas de mutagénesis, incluyendo las aplicadas a polinucleótidos, células u organismos. Las variantes pueden contener sustituciones, eliminaciones, inversiones e inserciones de nucleótidos. La variación puede ocurrir en una o ambas regiones codificantes y no codificantes. Las variaciones pueden producir sustituciones de aminoácidos conservativas y no conservativas (en comparación con el producto codificado). Para las secuencias nucleotídicas, las variantes conservativas incluyen aquellas secuencias que, debido a la degeneración del código genético, codifican la secuencia de aminoácidos del polipéptido de referencia. Las variantes de secuencias de nucleótidos también incluyen secuencias de nucleótidos derivadas sintéticamente, tales como aquellas generadas, por ejemplo, usando mutagénesis dirigida, pero que todavía codifican un polipéptido. En general, las variantes de una determinada secuencia de nucleótidos tendrán al menos aproximadamente un 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, en general, al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, de manera deseable, aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 % o más, y más adecuadamente, aproximadamente un 96 %, 97 %, 98 % o más de identidad de la secuencia con la secuencia de nucleótidos en particular según lo determinado por los programas y de alineación de secuencias descritos en otra parte en el presente documento, usando los parámetros por defecto.

Las secuencias de nucleótidos se pueden usar para aislar secuencias y alelos correspondientes de otros organismos, en particular, de otras serpientes. Los métodos para la hibridación de secuencias de ácidos nucleicos se pueden obtener fácilmente en la técnica. Las secuencias codificantes de otros organismos se pueden aislar de acuerdo con técnicas bien conocidas basadas en su identidad de secuencia con las secuencias codificantes expuestas en el presente documento. En estas técnicas, toda o parte de la secuencia codificante conocida se usa como sonda que se hibrida selectivamente a otras secuencias codificantes presentes en una población de fragmentos de ADN genómico clonados o fragmentos de ADNc (es decir, genotecas genómicas o de ADNc) de un organismo escogido (por ejemplo, una serpiente). Por consiguiente, la presente invención también contempla polinucleótidos que se hibridan con secuencias de nucleótidos de referencia, o con sus complementos, en condiciones rigurosas descritas a continuación. Como se usa en el presente documento, la expresión "*se hibridan en condiciones de baja rigurosidad, rigurosidad media, rigurosidad alta o rigurosidad muy alta*" describe las condiciones para la hibridación y el lavado.

La orientación para realizar reacciones de hibridación puede encontrarse en Ausubel *et al.*, *supra*, apartados 6.3.1-6.3.6. Los métodos acuosos y no acuosos se describen en esa referencia, y se pueden usar. La referencia en el presente documento a condiciones de baja rigurosidad incluye y abarca de al menos aproximadamente el 1 % v/v a al menos aproximadamente el 15 % v/v de formamida y de al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M de sal para la hibridación a 42 °C, y al menos aproximadamente 1 M a al menos aproximadamente 2 M de sal para lavar a 42 °C. Las condiciones de baja rigurosidad también pueden incluir albúmina de suero bovino al 1 % (BSA), EDTA 1 mM, NaHPO₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7 % para la hibridación a 65 °C, e (i) 2 x SSC, SDS al 0,1 %; o (ii) BSA al 0,5 %, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM (pH 7,2), SDS al 5 % para el lavado a temperatura ambiente. Una realización de las condiciones de rigurosidad baja incluye la hibridación en 6 x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de dos lavados en 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % al menos a 50 °C (la temperatura de los lavados puede aumentarse hasta 55 °C para condiciones de baja rigurosidad). Las condiciones de rigurosidad media incluyen y abarcan de al menos aproximadamente el 16 % v/v a al menos aproximadamente el 30% v/v de formamida y de al menos aproximadamente 0,5 M a al menos aproximadamente 0,9 M de sal para la hibridación a 42 °C, y al menos aproximadamente 0,1 M a al menos aproximadamente 0,2 M de sal para lavar a 55 °C. Las condiciones de rigurosidad media también pueden incluir albúmina de suero bovino al 1 % (BSA), EDTA 1 mM, NaHPO₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7 % para la hibridación a 65 °C, e (i) 2 x SSC, SDS al 0,1 %; o (ii) BSA al 0,5 %, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM (pH 7,2), SDS al 5 % para el lavado a 60-65 °C. Una realización de las condiciones de rigurosidad media incluye la hibridación en 6 x SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % a 60 °C. Las condiciones de rigurosidad alta incluyen y abarcan de al menos aproximadamente el 31 % v/v a al menos aproximadamente el 50% v/v de formamida y de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 0,15 M de sal para la hibridación a 42 °C, y al menos aproximadamente 0,01 M a al menos aproximadamente 0,02 M de sal para lavar a 55 °C. Las condiciones de rigurosidad alta también pueden incluir BSA al 1 %, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7 % para la hibridación a 65 °C, e (i) 0,2 x SSC, SDS al 0,1 %; o (ii) BSA al 0,5 %, EDTA 1 mM, NaHPO₄ 40 mM (pH 7,2), SDS al 1 % para el lavado a una temperatura en exceso de 65 °C. Una realización de las condiciones de rigurosidad alta incluye la hibridación en 6 x SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2 x SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C.

En determinadas realizaciones, un polipéptido está codificado por un polinucleótido que se hibrida con una secuencia de nucleótidos desvelada en condiciones de rigurosidad baja, media, alta o muy alta. Una realización de condiciones de rigurosidad muy alta incluye la hibridación de fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7 % a 65 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2 x SSC, SDS al 1 % a 65 °C.

Se conocen bien otras condiciones de rigurosidad en la técnica y un destinatario experto reconocerá que se pueden manipular diversos factores para optimizar la especificidad de la hibridación. La optimización de la rigurosidad de los lavados finales puede servir para garantizar un alto grado de hibridación. Para ejemplos detallados, Véase Ausubel *et al.*, *Supra* en las páginas 2.10.1 a 2.10.16 y Sambrook, J. *et al.* (2001) en los apartados 1.101 a 1.104.

Si bien los lavados de rigurosidad se llevan a cabo normalmente a temperaturas de aproximadamente 42 °C a 68 °C, un experto en la técnica apreciará que otras temperaturas pueden ser adecuados para condiciones rigurosas. La velocidad de hibridación máxima normalmente se produce a aproximadamente 20 °C a 25 °C por debajo de la T_m para la formación de un híbrido de ADN-ADN. Es bien conocido en la técnica que la T_m es la temperatura de fusión, o la temperatura a la que se disocian dos secuencias polinucleotídicas complementarias. Los métodos para la estimación de T_m son bien conocidos en la técnica (véase Ausubel *et al.*, *supra* en la página 2.10.8). En general, la T_m de un dúplex de ADN perfectamente coincidente puede predecirse como una aproximación mediante la fórmula:

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10} M) + 0,41 (\% \text{ de G+C}) - 0,63 (\% \text{ de formamida}) - (600/\text{longitud})$$

en la que: M es la concentración de Na^+ , preferentemente, en el intervalo de 0,01 molar a 0,4 molar; el % de G + C es la suma de bases de guanina y citosina como un porcentaje del número total de bases, en el intervalo de entre el 30 % y 75 % de G + C; el % de formamida es el porcentaje de concentración de formamida en volumen; la longitud es el número de pares de bases del dúplex de ADN. La T_m de un dúplex de ADN disminuye en aproximadamente 1 °C con cada aumento del 1 % en el número de pares de bases no coincidentes al azar. El lavado, en general, se lleva a cabo a la T_m de -15 °C para alta rigurosidad, o a la T_m de -30 °C para la rigurosidad moderada.

En un ejemplo de un procedimiento de hibridación, se hibrida una membrana (por ejemplo, una membrana de nitrocelulosa o una membrana de nylon) que contiene ADN inmovilizado durante una noche a 42 °C en un tampón de hibridación (formamida desionizada al 50 %, 5 x SSC, 5 x solución de Denhardt (Ficoll al 0,1 %, polivinilpirrolidona al 0,1 % y albúmina de suero bovino al 0,1 %), SDS al 0,1 % y 200 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado) que contiene sonda marcada. La membrana se somete luego a dos lavados secuenciales de rigurosidad media (es decir, 2 x SSC, SDS al 0,1% durante 15 min a 45 °C, seguido de 2 x SSC, SDS al 0,1% durante 15 min a 50 °C), seguido de dos lavados secuenciales de mayor rigurosidad (es decir, 0,2 x SSC, SDS al 0,1% durante 12 min a 55 °C, seguido de 0,2 x SSC y solución de SDS al 0,1 % durante 12 min a 65-68 °C).

3. Preparación de activadores de la protrombina

Los activadores de la protrombina se pueden preparar mediante cualquier procedimiento adecuado conocido por los expertos en la materia, como se desvela, por ejemplo, en el documento WO03/082914.

Por ejemplo, los activadores de la protrombina pueden producirse mediante cualquier método conveniente tal como purificando el polipéptido de reservorios naturales, incluyendo, pero sin limitación, el veneno de serpiente, sangre y productos derivados de la sangre (por ejemplo, suero). Los métodos de purificación incluyen cromatografía de afinidad, incluyendo la cromatografía de afinidad de lectina (por ejemplo, aglutinina de germen de trigo) u otra separación. La identidad y la pureza del activador de la protrombina derivado pueden determinarse, por ejemplo, mediante electroforesis en SDS-poliacrilamida o cromatográficamente, tal como mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Por ejemplo, la purificación y caracterización de pseutarina C (también abreviada como PtPA) de veneno de serpiente *P. textilis* se describe en Masci (1986) y Masci *et al.* (1988), y la oscutarina C (OsPA) de veneno de *O. scutellatus* se describe en Speijer *et al.* (1986). La purificación y caracterización de la ecarina de veneno de *E. carinatus* se describe en Morita, T *et al.* (1981).

Como alternativa, los activadores de la protrombina pueden producirse a partir de células de glándula de veneno en cultivo usando métodos conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, el método descrito en Yamanouye, N., *et al.* (2007), que describe el cultivo primario de células secretoras de la glándula de veneno de *Bothrops jararaca* para la producción de veneno *in vitro*.

Como alternativa, los activadores de la protrombina pueden sintetizarse mediante síntesis química, por ejemplo, usando síntesis en solución o síntesis en fase sólida como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 9 de Atherton y Shephard (1989) y en Roberge *et al.* (1995).

Como alternativa, los activadores de la protrombina pueden prepararse mediante técnicas recombinantes. Por ejemplo, los activadores de la protrombina usados en la invención se pueden preparar mediante un procedimiento que incluye las etapas de: (a) preparar una construcción que comprenda una secuencia polinucleotídica que codifique un polipéptido y que esté unida operativamente a un elemento regulador; (b) introducir la construcción en una célula hospedadora; (c) cultivar la célula hospedadora para que exprese el polipéptido; (d) aislar el polipéptido de la célula hospedadora. Si el activador de la protrombina comprende un complejo o dos polipéptidos, entonces, el activador de la protrombina se puede preparar mediante un procedimiento que incluye las etapas de: (a) preparar una construcción que comprenda una secuencia polinucleotídica que codifique un primer polipéptido y que esté unida operativamente a un elemento regulador; (b) introducir la construcción en una célula hospedadora; (c) cultivar la célula hospedadora para que exprese el primer polipéptido; (d) aislar el polipéptido de la célula hospedadora;

repetir las etapas (a) a (d) para un segundo polipéptido; y unir el primer polipéptido y el segundo polipéptido. En ejemplos ilustrativos, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido codifica al menos una parte biológicamente activa de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 5, 6, 9, 10, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, o una variante de las mismas.

Es posible preparar activadores de la protrombina recombinantes convenientemente usando protocolos convencionales como se describe, por ejemplo, en Sambrook, J. *et al.* (2001), en concreto, en los Capítulos 16 y 17; Ausubel *et al.* (1994, *supra*), en particular, en los Capítulos 10 y 16; y Coligan *et al.*, «Current Protocols in Protein Science» (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1997), en particular, en los Capítulos 1, 5 y 6. Por ejemplo, la producción recombinante de factor V de serpiente y de factor X de serpiente, que se pueden usar para producir activadores de la protrombina del grupo C y del grupo D, se describe en Filippovic, I. *et al.* (2005) y Bos, M. H. A. *et al.* (2009). Se proporciona un proceso ilustrativo para la producción recombinante de ecarina y variantes de ecarina en Yonemura, H. *et al.* (2004) y en la patente de EE.UU. n.º 6.413.737.

4. Recipientes

La presente invención contempla cualquier recipiente adecuado para preparar una muestra de suero adecuada. En la técnica, se conocen muchos recipientes adecuados, incluyendo los descritos en la patente de EE.UU. N.º 4.227.620; patente de EE.UU. n.º 4.256.120; patente de EE.UU. n.º 6.416.717; patente de EE.UU. n.º 6.592.613; patente de EE.UU. n.º 6.686.204; patente de EE.UU. n.º 7.488.287; patente de EE.UU. n.º 7.699.828; patente europea n.º 0 628 816; y recipientes disponibles en el mercado que incluyen los usados en los ejemplos de la presente memoria descriptiva.

En algunas realizaciones, los recipientes usados de acuerdo con la presente invención son tubos, incluyendo tubos de vidrio o plástico. Los plásticos adecuados incluyen cloruro de polivinilo, polipropileno, tereftalato de polietileno y poliestireno.

Los recipientes se pueden vaciar y sellar el extremo con un tabique o tapón perforable apropiado. Esto permite el uso de una aguja de doble punta, de modo que se introduce un extremo en la vena de un paciente y el otro extremo de la aguja perfora el tabique o tapón que cubre el extremo del tubo para que el vacío en el tubo tome la muestra de sangre a través de la aguja al tubo.

Los recipientes pueden ser de cualquier tamaño adecuado. En algunas realizaciones, los recipientes están diseñados para contener una muestra de sangre de entre 50 µl y 10 ml. De manera adecuada, los recipientes están diseñados para contener al menos 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 250 µl, 300 µl, 350 µl, 400 µl, 450 µl, 500 µl, 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 8 ml o 10 ml de muestra de sangre.

En algunas realizaciones, los recipientes contienen una composición de coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en de 0,01 a 100 µg de activador de la protrombina. De manera adecuada, los recipientes contienen una composición de coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en de 0,1 a 10 µg de activador de la protrombina. En realizaciones representativas, los recipientes contienen una composición de coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en de 0,1 a 10 µg de activador de la protrombina y que contiene una muestra de sangre de 4 ml que proporciona una concentración final de activador de la protrombina en la muestra de sangre de 4 ml de 25 ng/ml a 2,5 µg/ml.

En algunas realizaciones, los recipientes contienen una composición de coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en de 0,0005 a 15 µg de activador de la protrombina. De manera adecuada, los recipientes contienen una composición de coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en de 0,005 a 10 µg de activador de la protrombina.

En algunas realizaciones, los recipientes contienen una composición de coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en de 0,0005 a 15 U/ml de activador de la protrombina. De manera adecuada, los recipientes contienen una composición de coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en de 0,0015 a 10 U/ml de activador de la protrombina. En algunas realizaciones, una medición en unidades es una medición de unidades activadoras de la protrombina que se define de la siguiente manera: 1 unidad activará la protrombina para producir una unidad de actividad amidolítica a pH 8,4 a 37 °C, y 1 unidad amidolítica hidrolizará 1,0 µmol de N-p-tosil-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilida por minuto a pH 8,4 a 37 °C.

En algunas realizaciones, la composición de coagulación puede estar contenida dentro del recipiente antes de la adición de la muestra de sangre al recipiente. En algunas realizaciones, la composición de coagulación puede añadirse al recipiente tras la adición de la muestra de sangre al recipiente.

Cuando la composición de coagulación está contenida dentro del recipiente antes la adición de la muestra de sangre, se puede haber añadido al recipiente mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la composición de coagulación se disuelve en un disolvente adecuado, y luego se añade al recipiente y se seca en la superficie interna del recipiente. El disolvente puede ser un tampón neutro. La composición

de coagulación en solución se puede secar sobre la superficie interna del recipiente mediante secado por pulverización o por liofilización, o mediante cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. En algunas otras realizaciones, la composición de coagulación se disuelve en un disolvente adecuado y se añade al recipiente sin secar, de modo que el recipiente contenga una solución acuosa que comprenda la composición de coagulación. El disolvente puede ser un tampón neutro.

En algunas realizaciones, se recubren perlas con la composición de coagulación y estas perlas se añaden al recipiente. Las perlas pueden ser perlas de vidrio o perlas resinosas sintéticas, incluyendo perlas de poliestireno y propileno. Las perlas pueden tener una forma esférica. En algunas realizaciones, el diámetro medio de las perlas está entre 0,1 mm y 1 mm.

En algunas realizaciones, el recipiente proporciona la separación del suero de las células coaguladas una vez producida la coagulación. En algunas realizaciones, el recipiente comprende o contiene un gel que proporciona una barrera entre las células coaguladas y la muestra de suero. En algunas realizaciones, el recipiente es de una forma adecuada y un material adecuado para permitir la centrifugación a fin de separar o ayudar a mantener la separación de las células coaguladas y la muestra de suero. En algunas realizaciones, la muestra de suero se retira de las células coaguladas, o las células coaguladas se retiran de la muestra de suero.

En algunas realizaciones, el recipiente puede comprender uno o más componentes adicionales. Los otros componentes pueden incluir, por ejemplo, uno o más cofactores, uno o más tensioactivos y/o uno o más agentes de coagulación, además de la composición de coagulación.

5. Componentes adicionales

La composición de coagulación descrita en el presente documento consiste en, consiste esencialmente en o comprende un activador de la protrombina como se define en el presente documento.

Como se usa en la afirmación anterior y en afirmaciones similares en otra parte de la presente memoria descriptiva, el término "*comprende*" (y similares) significa que la composición de coagulación incluye el activador de la protrombina y también puede incluir uno o más componentes adicionales. Por lo tanto, el activador de la protrombina es un componente obligatorio, y cualquier otro componente es opcional, pudiendo estar o no presente. Los otros componentes pueden incluir, por ejemplo, uno o más cofactores, uno o más tensioactivos y/o uno o más agentes de coagulación adicionales.

Como se usa en la afirmación anterior y en afirmaciones similares en otra parte de la presente memoria descriptiva, la expresión "*que consiste esencialmente en*" (y similares) significa que la composición de coagulación incluye el activador de la protrombina y también puede incluir uno o más componentes adicionales, siempre que esos componentes no interfieran en ni contribuyan a la actividad o acción del activador de la protrombina. Por lo tanto, el activador de la protrombina es un componente obligatorio, y el resto de componentes son opcionales, pudiendo estar o no presentes, dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción del activador de la protrombina.

Como se usa en la afirmación anterior y en afirmaciones similares en otra parte de la presente memoria descriptiva, la expresión "*consiste en*" (y similares) significa que la composición de coagulación incluye el, y se limita al, activador de la protrombina. Por lo tanto, la expresión "*consiste en*" indica que el activador de la protrombina es un componente obligatorio, y que no pueden estar presentes otros componentes (tales como cofactores o agentes de coagulación).

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la composición de coagulación puede comprender veneno de serpiente, incluyendo, pero sin limitación, el veneno de serpiente sin elaborar. En algunas otras realizaciones, la composición de coagulación puede comprender un preparado de activador de la protrombina preparado mediante purificación parcial o completa de veneno de serpiente. Dichos preparados pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo métodos cromatográficos y de filtración en gel, incluyendo los descritos en el presente documento, y en cualquier otro lugar. En algunas otras realizaciones, la composición de coagulación puede comprender un activador de la protrombina purificado o un activador de la protrombina aislado. Los activadores de la protrombina purificados y aislados se pueden preparar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo los descritos en el presente documento, y en cualquier otro lugar.

5.1 Cofactores

La capacidad de los activadores de la protrombina como se definen en el presente documento para activar la protrombina a trombina se puede mejorar con la adición de cofactores, incluyendo, pero sin limitación, calcio, fosfolípido/s y polipéptidos que comprenden actividad de FVa.

5.2 Tensioactivos

Los tensioactivos adecuados incluyen cualquier tensioactivo adecuado, incluyendo, pero sin limitación, dodecilsulfato de sodio (SDS), laurilsulfato de amonio, laureth-sulfato de sodio y miristiléter-sulfato de sodio.

5.3 Agentes de coagulación

Los agentes coagulantes o coagulantes se clasifican como agentes coagulantes intrínsecos o agentes coagulantes extrínsecos de acuerdo con la cascada de sangre estimulada (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.686.204).

Los agentes de coagulación apropiados incluyen, pero sin limitación, tierra de diatomeas, micropartículas o partículas de silicatos inorgánicos, microsilíce, micropartículas de vidrio, ácido elágico, trombina, heparinasa, tromboplastina, batroxobina, hidrolapitita, caolín, partículas de caolín, protrombina (incluyendo la protrombina microparticulada), fibrinógeno y colágeno despolimerizado.

6. Muestras de suero

Como se ha comentado anteriormente, la presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los activadores de la protrombina definidos en el presente documento son agentes de coagulación adecuados para preparar muestras de suero adecuadas para detectar analitos. Una muestra de suero que es adecuada para detectar analitos es aquella de calidad adecuada según lo descrito en el presente documento, y/o aquella que se prepara en un tiempo adecuado según lo analizado en el presente documento.

6.1 Calidad del suero

Un factor importante en la preparación de una muestra de suero adecuada para detectar analitos es la medida en que el proceso de coagulación elimina el fibrinógeno del suero. El suero que contiene fibrinógeno residual o fibrinógeno parcialmente degradado, o fibrina como resultado de la coagulación incompleta puede generar problemas en la exactitud analítica debido a la formación de precipitados (microcoágulos o cadenas), en la coagulación latente tras la centrifugación y en el almacenamiento del suero. Por lo tanto, la coagulación completa o sustancialmente completa es fundamental para garantizar la obtención de suero de la más alta calidad y la obtención de resultados posteriores precisos.

Por consiguiente, algunas realizaciones de la presente invención proporcionan el uso de una composición de coagulación que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un activador de la protrombina en la preparación de un suero para detectar un analito, en las que el suero comprende ≤ 30 µg/ml de fibrinógeno o productos relacionados con el fibrinógeno/la fibrina. En realizaciones más específicas, el suero comprende ≤ 25 µg/ml, ≤ 20 µg/ml, ≤ 15 µg/ml, ≤ 10 µg/ml, ≤ 8 µg/ml o ≤ 6 µg/ml de fibrinógeno o productos relacionados con el fibrinógeno/la fibrina.

En algunas realizaciones, el suero comprende ≤ 30 %, ≤ 20 %, ≤ 10 %, ≤ 9 %, ≤ 8 %, ≤ 7 %, ≤ 6 %, ≤ 5 %, ≤ 4 %, ≤ 3 %, ≤ 2 %, ≤ 1 %, $\leq 0,5$ %, $\leq 0,2$ %, $\leq 0,1$ % de fibrinógeno o productos relacionados con el fibrinógeno/la fibrina presentes en la muestra original a partir de la que se produjo el suero.

Los niveles de fibrinógeno y/o productos relacionados con el fibrinógeno/la fibrina pueden detectarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo un inmunoensayo de tipo sándwich que usa anticuerpos de MP Biomedicals y preparados de fibrinógeno convencionales adquiridos en NIBSC, Potters Bar, Hertfordshire, Londres, RU.

Otro factor importante en la preparación de una muestra de suero adecuada para detectar analitos es la actividad o el número de células o residuos celulares que permanecen en el suero tras la coagulación. La presencia de células puede tener dos efectos durante el almacenamiento y el análisis del suero o plasma. En primer lugar, las células se pueden lisar, liberando el contenido celular (por ejemplo, potasio, lactato deshidrogenasa) en el suero o plasma. Esto puede conducir a importantes diferencias entre las mediciones realizadas inmediatamente después de la centrifugación y las mediciones realizadas después de un período de almacenamiento. En segundo lugar, las células siguen siendo metabólicamente activas y pueden consumir cantidades significativas de nutrientes (por ejemplo, de glucosa) y liberar productos metabólicos (por ejemplo, lactato) durante el almacenamiento. Incluso se pueden observar cambios en las muestras de muchos tubos cuando las muestras se almacenan durante el tiempo de coagulación recomendado de 30 minutos cuando las muestras son de participantes sanos. El grado de contaminación celular es, por lo tanto, un importante criterio de calidad para las muestras de suero y una ventaja importante del uso del suero frente al plasma.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la muestra de suero comprende menos del 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o 1 % de células en la muestra de sangre a partir de la que se ha preparado.

En algunas realizaciones, la muestra de suero comprende un cambio en la actividad de lactato deshidrogenasa o en la concentración de fosfato (normalmente medida en U/l y mmol/l, respectivamente) de < 25 %, < 20 %, < 15 % o < 10 % durante un período de 24 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora o 30 minutos. En algunas realizaciones, la muestra de suero comprende un cambio en la concentración de glucosa o en la concentración de potasio (ambas medidas normalmente en mmol/l) de < 5 %, < 4 %, < 3 %, < 2 %, < 1 %, < 0,5 % o < 0,1 % durante un período de 24 horas, 12 horas, 8 horas, 6 horas, 5 horas, 4 horas, 3 horas, 2 horas, 1 hora o 30 minutos (por ejemplo, desde el momento de la preparación de la muestra de suero). Los métodos para medir la actividad de lactato deshidrogenasa son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Dimeski, G., *et al.* (2004).

La concentración de hemoglobina de una muestra de suero también se puede usar para determinar si la muestra de suero es adecuada para detectar analitos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la muestra de suero comprende una concentración de hemoglobina < 150 mg/l, < 100 mg/l, < 90 mg/l, < 80 mg/l, < 70 mg/l, < 60 mg/l, < 50 mg/l, < 40 mg/l, < 30 mg/l, < 20 mg/l o < 10 mg/l.

6.2 Tiempo de coagulación

Como muestra para la prueba, en general, se prefiere el suero frente al plasma a menos que se requieran resultados urgentes y, por lo tanto, el tiempo de coagulación para un tubo de suero se considere demasiado largo. Otro inconveniente del tiempo de coagulación prolongado es que puede conducir a cambios en la concentración de analito clínicamente significativos debido a la actividad celular en la muestra de sangre, este problema es más destacado en la leucocitosis.

Así pues, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para producir una muestra de suero para detectar un analito de interés, comprendiendo el método poner en contacto una muestra de sangre con una composición de coagulación que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un activador de la protrombina como se define en el presente documento, en el que la muestra de suero se prepara a los 25, 20, 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0,5 minutos de la puesta en contacto con la composición de coagulación.

7. Muestras de sangre

Como se comenta en el presente documento, existe el deseo de proporcionar una composición de coagulación que sea adecuada para producir una muestra de suero a partir de todas las muestras de sangre, o un recipiente que comprenda una composición de coagulación que coagule todas las muestras de sangre, en un tiempo adecuado.

Los ejemplos de los diferentes tipos de muestras de sangre para las que se desean pruebas incluyen sangre de individuos sanos, sangre citrada, sangre con EDTA añadido, sangre de pacientes en terapia anticoagulante tal como heparina, warfarina, citrato o rivaroxabán, pacientes que toman agentes anti-trombóticos incluyendo aspirina, pacientes trombocitopénicos (pacientes con bajos recuentos de plaquetas) y pacientes con TTPa prolongado.

En algunas realizaciones, la muestra de sangre es una muestra de sangre entera. En algunas otras realizaciones, la muestra de sangre es una muestra de suero derivada de una muestra de sangre entera. Los ejemplos de muestras de suero en este caso incluyen muestras de suero en las que se desee una muestra de suero de mejor calidad, incluyendo aquellas en las que la cantidad de fibrinógeno o productos relacionados con el fibrinógeno/la fibrina y/o la cantidad de células o material celular de la muestra de suero y/o la cantidad de hemoglobina se consideran demasiado altas para que la muestra de suero sea una muestra adecuada para la detección de analitos. Por ejemplo, la muestra de suero puede presentar microcoágulos o coagulación latente. En algunas otras realizaciones, la muestra de sangre es una muestra de plasma derivada de una muestra de sangre entera. Por ejemplo, la muestra de plasma puede presentar microcoágulos o coagulación latente.

8. Detección de analitos

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona además métodos para detectar un analito, comprendiendo el método analizar una muestra de suero preparada mediante el método de la presente invención para detectar la presencia o la cantidad del analito de interés.

En realizaciones específicas, la muestra de suero preparada mediante el método de la presente invención es adecuada para la prueba de más de un analito, de modo que la muestra de suero se puede usar para detectar más de un analito. Como se comenta en el presente documento, a menudo un médico deseará que se realice la prueba de más de un analito en una muestra de sangre de un paciente, y no es raro el uso de una muestra de suero para al menos 20 pruebas, o incluso más, a veces entre 50 y 60 o incluso 70 y 80 pruebas. Los expertos en la materia apreciarán que, en realizaciones específicas, la presente invención proporciona la producción de una muestra de suero en la que la muestra de suero es de volumen y calidad suficientes para permitir que se realicen todas las pruebas de analitos deseadas en la muestra de suero. La ventaja de esto es que se reducen tanto el volumen de sangre que se extraerá del sujeto como el tiempo necesario para realizar las pruebas de los analitos.

A continuación, se describen las pruebas de analitos ilustrativas. Los métodos para realizar estas pruebas de analitos se pueden realizar de varias maneras y son bien conocidos en la técnica.

8.1 Sodio (Na^+)

Esta prueba mide la cantidad de sodio en una muestra de suero o plasma. El sodio desempeña un papel importante en el equilibrio de sal y agua en el organismo. Los niveles bajos de sodio pueden indicar una ingesta excesiva de agua, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal o pérdida de sodio del organismo debido a diarrea o vómitos. Los niveles altos de sodio pueden indicar una ingesta excesiva de sal o una ingesta de agua insuficiente.

8.2 Potasio (K^+)

Esta prueba mide la cantidad de potasio en una muestra de suero o plasma. Los niveles de potasio que son demasiado altos (hipercalcemia) pueden deberse a una enfermedad renal, diabetes, cetoacidosis o fármacos que disminuyen la cantidad de potasio excretado por el organismo. Los niveles de potasio que son demasiado bajos (hipocalcemia) pueden deberse a la deshidratación, por ejemplo, por diarrea o vómitos, o a la sudoración excesiva. Los niveles de potasio también pueden ser bajos como resultado de la ingesta de fármacos que hacen que los riñones pierdan potasio, por ejemplo, diuréticos.

Los niveles de potasio se suelen controlar en aquellos pacientes que toman diuréticos o medicamentos para el corazón, aquellos con presión arterial alta o enfermedad renal, condiciones de acidosis y alcalosis críticas, y aquellos que reciben diálisis renal o terapia intravenosa en un goteo.

8.3 Cloruro (Cl^-)

Esta prueba mide la cantidad de cloruro en suero o plasma. El cloruro, en general, se mide para evaluar si hay un desequilibrio electrolítico en el paciente. El cloruro bajo y el sodio normal pueden ser indicativos de vómitos o pérdida de líquido gástrico.

8.4 Bicarbonato (HCO_3^-)

Esta prueba mide la cantidad de tres formas de dióxido de carbono (bicarbonato, ácido carbónico y dióxido de carbono disuelto) en suero o plasma. Esta prueba se suele realizar si el paciente tiene problemas para respirar. Un alto nivel de dióxido de carbono puede deberse a algunas enfermedades incluyendo la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfisema, neumonía, síndrome de Cushing o alcoholismo o vómitos. Un nivel bajo puede deberse a algunas enfermedades incluyendo neumonía, cirrosis, hiperventilación, diabetes, deshidratación, insuficiencia renal o cardíaca.

8.5 Glucosa (Gluc)

Esta prueba mide la cantidad de glucosa en suero o plasma. Los niveles de glucosa a menudo se prueban en aquellos pacientes que muestran síntomas de niveles altos de glucosa en sangre (hiperglucemia) o hipoglucemia, mujeres embarazadas, los que tienen diabetes.

8.6 Urea (Urea)

Esta prueba mide la cantidad de urea en suero o plasma. Esta prueba puede ayudar a evaluar la función renal y controlar la efectividad de la diálisis.

8.7 Creatinina (Creat)

Esta prueba mide la cantidad de creatinina en suero o plasma. Esta prueba es fundamental para ayudar a evaluar la función renal y controlar el tratamiento de la enfermedad renal.

8.8 Urato (Urato)

Esta prueba mide la cantidad de urato (o ácido úrico) en suero o plasma. Los niveles altos de ácido úrico pueden ser un signo de gota. Los niveles de ácido úrico también se controlan en pacientes sometidos a quimioterapia o radioterapia para detectar síndromes de lisis tumoral.

8.9 Proteína total (PT o Prot T)

Esta prueba mide la cantidad de proteína en suero o plasma. Aunque los resultados de una prueba de proteína total no indicarán una enfermedad específica, un nivel de proteína alto o bajo suele indicar la necesidad de realizar pruebas adicionales para determinar si hay un problema. Las pruebas de proteína total se suelen usar para detectar ciertos trastornos hepáticos, trastornos renales, mieloma múltiple y estado de hidratación.

8.10 Albúmina (Alb)

Esta prueba mide la cantidad de albúmina en suero o plasma. Los niveles de albúmina se suelen medir para detectar enfermedades hepáticas o renales, o para evaluar el estado nutricional, en especial, en pacientes hospitalizados.

8.11 Bilirrubina total (Bili T)

Esta prueba mide la cantidad de bilirrubina en suero o plasma. Los niveles de bilirrubina se miden para detectar y controlar trastornos hepáticos, tales como la ictericia o enfermedades hepáticas, tales como la cirrosis. Los niveles de bilirrubina también se miden en los bebés para ayudar a detectar ciertos trastornos genéticos raros y para evitar el daño cerebral en los bebés con ictericia.

8.12 Fosfatasa alcalina (ALP)

Esta prueba mide la cantidad de fosfatasa alcalina en suero o plasma. Esta prueba, en general, se realiza para detectar o controlar el tratamiento de un trastorno hepático o trastornos óseos.

8.13 Gamma-glutamyl transferasa (GGT)

Esta prueba mide la cantidad de gamma-glutamyl transferasa en suero o plasma. Esta prueba se usa para detectar enfermedades hepáticas y alcoholemia. También se puede usar para determinar si un nivel elevado de ALP se debe a una enfermedad hepática u ósea.

8.14 Alanina aminotransferasa (ALT)

Esta prueba mide la cantidad de alanina aminotransferasa en suero o plasma. Esta prueba se usa para detectar enfermedades hepáticas.

8.15 Aspartato aminotransferasa (AST)

Esta prueba mide la cantidad de aspartato aminotransferasa en suero o plasma. Esta prueba se usa para detectar daño hepático, daño muscular, y otras afecciones cuando la enzima está presente en muchos órganos y células tisulares.

8.16 Lactato Deshidrogenasa (LD)

Esta prueba mide la cantidad de la lactato deshidrogenasa en suero o plasma. Esta prueba, en general, se usa para identificar la causa y la ubicación del daño tisular en el organismo, la isquemia tisular y para controlar su progreso.

8.17 Creatina quinasa (CK)

Esta prueba mide la cantidad de la creatina quinasa en suero o plasma. La creatina quinasa se mide en pacientes con dolor en el pecho, o dolor o debilidad muscular para determinar si han sufrido un ataque cardíaco y si se han dañado otros músculos de cuerpo.

8.18 Calcio total (Ca T)

Esta prueba mide la cantidad de calcio en suero o plasma. Los niveles de calcio se suelen medir en pacientes con enfermedad renal, enfermedad ósea o nerviosa, o cuando hay síntomas de un nivel de calcio significativamente aumentado o disminuido.

8.19 Fosfato (Pi o Phos)

Esta prueba mide la cantidad de fosfato en suero o plasma. Los niveles de fosfato se pueden medir como un seguimiento del resultado de una prueba de niveles anómalos de calcio. Los niveles de fosfato también se pueden medir en pacientes con trastornos renales, diabetes no controlada o cuando el paciente esté tomando suplementos de calcio o fosfato.

8.20 Magnesio (Mg²⁺)

Esta prueba mide la cantidad de magnesio en suero o plasma. Esta prueba se puede realizar si el paciente tiene síntomas de demasiado o muy poco magnesio, incluyendo debilidad, irritabilidad, arritmia cardíaca, náuseas o diarrea. Los niveles de magnesio también se pueden medir si se han detectado niveles anómalos de calcio o potasio.

8.21 Lipasa (Lipasa)

Esta prueba mide la cantidad de lipasa en suero o plasma. Esta prueba, en general, se usa para diagnosticar pancreatitis u otras enfermedades pancreáticas.

8.22 Colesterol (Col)

Esta prueba mide la cantidad de colesterol en suero o plasma. Los niveles de colesterol se miden para detectar el riesgo de desarrollar enfermedad cardíaca.

8.23 Triglicéridos (Trig)

Esta prueba mide la cantidad de triglicéridos en suero o plasma. En cuanto a los niveles de colesterol, esta prueba, en general, se usa para detectar el riesgo de desarrollar una enfermedad cardíaca.

8.24 Colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C o HDL)

Esta prueba mide la cantidad de colesterol HDL en suero o plasma. Esta prueba, en general, se usa para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad cardíaca.

8.25 Hierro (Fe^{2+})

Esta prueba mide la cantidad de hierro en suero o plasma. El hierro se mide para verificar si un paciente tiene niveles bajos o altos de hierro. Los niveles bajos de hierro pueden causar anemia y, en general, se deben a una hemorragia prolongada o abundante, embarazo o crecimiento rápido (en niños). Los niveles altos de hierro pueden deberse a una afección genética o a transfusiones sanguíneas extensas.

8.26 Transferrina (Trf)

Esta prueba mide la cantidad de transferrina en suero o plasma. La transferrina es una proteína plasmática que transporta hierro a través de la sangre hacia el hígado, el bazo y la médula ósea. Por lo tanto, se analiza el nivel de transferrina para determinar la causa de la anemia, para examinar el metabolismo del hierro (por ejemplo, en la anemia por deficiencia de hierro) y para determinar la capacidad de la sangre para generar hierro.

8.27 Proteína reactiva C (CRP)

Esta prueba mide la cantidad de proteína reactiva C en suero o plasma. Esta prueba se usa para identificar la presencia de inflamación, para determinar su gravedad y controlar la respuesta al tratamiento.

8.28 Cortisol (Cortisol)

Esta prueba mide la cantidad de cortisol en suero o plasma. Los niveles de cortisol se miden para ayudar a diagnosticar el síndrome de Cushing o la enfermedad de Addison.

8.29 Tiroxina libre (fT4)

Esta prueba mide la cantidad de tiroxina libre en suero o plasma. La prueba, en general, se usa para diagnosticar hipotiroidismo o hipertiroidismo.

8.30 Hormona estimulante de la tiroides (TSH)

Esta prueba mide la cantidad de hormona estimulante de la tiroides en suero o plasma. La prueba, en general, se usa para detectar, diagnosticar y controlar los trastornos de la tiroides.

8.31 Ferritina

Esta prueba mide la cantidad de ferritina en suero o plasma. Los niveles bajos de ferritina son indicativos de deficiencia de hierro. Los niveles elevados son indicativos de sobrecarga de hierro, tal como en la hemocromatosis.

8.32 Troponina (Tnl)

Esta prueba mide la cantidad de troponina en suero o plasma. Esta prueba, en general, se usa en un paciente con dolores en el pecho para determinar si el paciente ha sufrido un daño al miocardio.

8.33 Índice hemolítico

La prueba del índice hemolítico mide el grado de lisis de los glóbulos rojos. La hemólisis es la interferencia más común encontrada en un laboratorio de bioquímica. La prueba se usa predominantemente para detectar la hemólisis *in vitro* y la idoneidad de la muestra para el informe de algunos o todos los analitos, y en la detección de anemias hemolíticas (esferocitosis hereditaria, hemólisis espontánea, deficiencia de la enzima RBC). La hemólisis o el índice hemolítico (concentración de hemoglobina libre en suero o plasma) se estima actualmente con todos los analizadores de química general. El valor se usa luego como una guía para determinar qué analitos y a qué nivel de hemólisis pueden verse afectados o no informados.

8.34 Índice icterico

La prueba del índice icterico arroja un valor que indica el nivel relativo de bilirrubina en una muestra de prueba mediante un método puramente espectrofotométrico. Se usa para determinar la idoneidad de la muestra para informar sobre ciertos analitos y la precisión de la verificación cruzada de los resultados de la bilirrubina en casos raros de interferencia con los métodos de estimación fotométrica de la bilirrubina total. Se ha demostrado que el índice icterico es útil para detectar la interferencia de las paraproteínas del cáncer (precipitación y falsa bilirrubina total alta) con el método de Roche de la bilirrubina total (Sheppard *et al*, 2005), en la que el índice icterico permanece invariable. La bilirrubina puede interferir con algunos análisis de creatinina a altas concentraciones (por ejemplo, > 200 µM/l) como se describe en Dimeski *et al.*, 2008.

8.35 Índice de lipemia

El índice de lipemia se ha empleado para predecir la posible interferencia con los ensayos debido a la lipemia.

9. Métodos de diagnóstico

La presente invención también proporciona métodos para diagnosticar la presencia, ausencia o gravedad de una enfermedad o afección en un sujeto, en los que la presencia, ausencia o gravedad de la enfermedad o afección está asociada con la presencia, ausencia o cantidad anómala de un analito de interés en el sujeto. En general, estos métodos comprenden proporcionar una muestra de suero preparada de acuerdo con los métodos ampliamente descritos con anterioridad; y detectar la presencia, ausencia o cantidad anómala del analito en la muestra de suero para determinar de ese modo la presencia, ausencia o gravedad de la enfermedad o afección en el sujeto.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención implican comparar el resultado de la prueba del analito con un resultado de referencia para obtener el diagnóstico.

La enfermedad o afección puede ser cualquier enfermedad o afección adecuada que pueda diagnosticarse usando una muestra de suero, incluyendo, aunque sin limitación, las enfermedades o afecciones descritas anteriormente con referencia a diferentes pruebas de analitos.

En algunas realizaciones, los métodos pueden comprender diagnosticar la presencia o ausencia de una enfermedad o afección no presentada previamente por el sujeto. En otras realizaciones, los métodos pueden comprender diagnosticar la presencia, ausencia o gravedad de una enfermedad o afección que el sujeto haya presentado previamente. Los métodos pueden comprender la referencia a un resultado obtenido del sujeto en un momento anterior. Como alternativa, el resultado de referencia puede ser una referencia analítica patrón.

En algunas realizaciones, los métodos se realizan en una instalación de prueba tal como un laboratorio de patología. En algunas otras realizaciones, los métodos son métodos de "diagnóstico inmediato". Como se usa en el presente documento, un "método de diagnóstico inmediato" significa que el método se realiza en o cerca del sitio de atención sanitaria del paciente. Los métodos de diagnóstico inmediato son cada vez más populares en hospitales y otros entornos en los que se desean obtener resultados rápidos y, a menudo, se logra mediante el uso de instrumentos y kits de prueba transportables, portátiles y de mano.

Las ventajas de las pruebas de diagnóstico inmediato incluyen la capacidad de obtenerse resultados analíticos rápidos en las camas de los hospitales, en especial, en situaciones de emergencia, y la capacidad de obtenerse resultados analíticos en la casa del paciente o durante un procedimiento quirúrgico (por ejemplo, con el uso de gotas de sangre capilar obtenidas mediante la punción de la piel).

Los dispositivos para los dispositivos de diagnóstico inmediato actualmente disponibles en el mercado incluyen el analizador de inmunoensayo comercializado por Siemens, denominado DCA Vantage Analyzer de Siemens, el dispositivo de prueba rápida Retro-STATUS HIV/CD4 350 comercializado por Millenium Biotechnology, Inc., que se usa para determinar simultáneamente el estado de infección del VIH del paciente, así como su estado inmune actual, y la prueba de Triage PLGF comercializada por Alere International, que se usa para detectar la preeclampsia de inicio temprano.

10. Herramientas de investigación

La presente invención también contempla el uso de herramientas de investigación que emplean muestras de suero producidas de acuerdo con la presente invención. En general, estos métodos comprenden proporcionar una muestra de suero preparada de acuerdo con los métodos ampliamente descritos con anterioridad; y el empleo de la muestra de suero en un estudio de herramienta de investigación, incluyendo, pero sin limitación, un estudio de genómica, proteómica, metabolómica, biología de sistemas, imágenes moleculares o estudio de ensayo.

Las herramientas de investigación adecuadas son bien conocidas en la técnica, e incluyen las descritas en Scaros, O. *et al.*, 2005. La genómica incluye la farmacogenómica, que estudia la correlación entre la genética y los patrones de expresión génica con respuesta a agentes terapéuticos. La proteómica permite el análisis de la abundancia y distribución de las proteínas en un sistema. La metabolómica, o perfil bioquímico, es el estudio de los metabolitos en un sistema. La biología de sistemas considera todo el sistema biológico como una unidad funcional, produciendo modelos de comportamiento que pueden predecir potencialmente si el sistema responderá al estímulo. Las tecnologías de imágenes moleculares tienen la capacidad de demostrar tanto el nivel de una diana molecular específica como el estado funcional de esa diana *in vivo*, y pueden usarse para métodos de diagnóstico.

Para que la invención pueda entenderse fácilmente y ponerse en práctica, se describirán ahora realizaciones preferidas particulares por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACTIVADORES DE LA PROTROMBINA DEL VENENO DE LAS SERPIENTES

Ejemplo 1a: Purificación y caracterización de ecarina, carinactivasa-1 y carinactivasa-2 de veneno de *Echis carinatus*

Este ejemplo describe la purificación y caracterización de un activador de la protrombina del grupo A denominado ecarina y de dos activadores de la protrombina del grupo B denominados carinactivasa-1 (CA-1) y carinactivasa-2 (CA-2) a partir del veneno de *Echis carinatus*.

Se disolvió veneno de *Echis carinatus* liofilizado (157 mg, Sigma Chemical Co, EE. UU., n.º de cat. V8250) en 8 ml de tampón Tris-HCl 0,05 M a pH 8,0, y se dejó en reposo para permitir su disolución durante 30 minutos, y luego se centrifugó (1000 g y 10 minutos) para eliminar los materiales insolubles. Se cargó un volumen de 7,7 ml de la solución clarificada reconstituida en una columna de cromatografía de filtración en gel Superdex 200 (cat. n.º 17-1043-02) (2,5 x 95 cm) GE Healthcare Bio-Sciences, Suecia) usando el mismo tampón de Tris-HCl para la elución. El caudal de la columna fue de 20 ml/h, y se recogieron fracciones de 4 ml (fracción de 15 minutos). Las fracciones activas se determinaron por su actividad de coagulación con plasma citrado normal como se describe con más detalle a continuación. Las fracciones agrupadas que presentaban actividad activadora de la protrombina contenían un total de 100 ml con una A₂₈₀ total de 28,3 unidades. La Figura 1 muestra el perfil de elución en el aislamiento de la ecarina, la carinactivasa-1 y la carinactivasa-2 del veneno de *E. carinatus* usando filtración en gel en una columna Superdex 200 como se ha descrito anteriormente. Las fracciones agrupadas de los tres activadores de la protrombina (ecarina, carinactivasa-1 y carinactivasa-2) están indicadas por la barra en la Figura 1.

Estas fracciones agrupadas se aplicaron inmediatamente a una columna de azul Sepharose (2,0 x 12 cm) (Cibacron Blue 3G unida a Sepharose 6 Fast Flow; n.º de catálogo 17-0948-01) (GE Healthcare Bio-Sciences, Suecia) previamente equilibrada con el mismo tampón de Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. Tras lavar con tampón inicial de aproximadamente 2 volúmenes de columna, se eluyó el material unido con un gradiente lineal de NaCl en el mismo tampón (0-1,0 M, 200 ml de cada vaso de precipitados). La carinactivasa-1 se recuperó en las fracciones no unidas, y la carinactivasa-2 y la ecarina se eluyeron a NaCl 0,2 y 0,5 M, respectivamente. Las actividades del activador de la protrombina se identificaron mediante un ensayo de coagulación con plasma citrado normal en presencia de calcio 30 mM y en ausencia de calcio como se describe con más detalle a continuación. Las fracciones (tres ml cada una) con actividades de activador de la protrombina específicas se agruparon por su actividad de coagulación específica respectiva de los tiempos de coagulación, seguido de la concentración a 1 mg/ml usando una membrana YM 10 en un concentrador de células agitadas Amicon n.º 42. Toda la cromatografía se realizó a 4 °C usando una bomba peristáltica Gilson usando cámara negra a púrpura ajustada a los caudales necesarios, un detector UV de onda dual Altex ajustado a dos atenuaciones de 280 nm y un colector de fracciones LKB 7000 ULTRORAC usando una recogida de fracciones basada en el tiempo. La Figura 2 muestra el perfil de elución de esta cromatografía en azul Sepharose, y las barras indican las fracciones agrupadas de carinactivasa-1, carinactivasa-2 y ecarina. Las fracciones obtenidas se almacenaron a 4 °C, -20 °C en tampón o -20 °C en tampón de glicerol al 50 %. Estas fracciones (preparaciones) que contenían activadores de la protrombina se usaron en todos los experimentos posteriores, a menos que se indique lo contrario.

La actividad del activador de la protrombina se ensayó usando el método descrito por Masci *et al.*, 1988. Esencialmente, este método de ensayo implicaba ensayos de coagulación realizados usando un instrumento Hyland-Clotek según lo descrito por Austen, D. E., *et al.* 1975. Se usó plasma citrado recién agrupado de voluntarios

normales para cada grupo de experimentos. Se realizaron los ensayos de tiempo de coagulación para las preparaciones basándose en los criterios definidos para los activadores de la protrombina del grupo A y B en Kini, R. M., 2005. Los ensayos se llevaron en presencia de calcio (Ca^{2+} 30 mM) para identificar los activadores de la protrombina del grupo B (carinactivasa-1 y carinactivasa-2), y en ausencia de calcio añadido para identificar el activador de la protrombina del grupo A (ecarina). La actividad hidrolítica contra el péptido p-nitroanilida S-2238, midiendo la formación de la generación de trombina por parte de los activadores de la protrombina, se determinó mediante el equilibrio de 0,90 ml de tampón de Tris-HCl 0,02, pH 7,4, con o sin CaCl_2 10 mM, y 100 μl de S-2238 (3 mM en agua) en el compartimiento celular de un espectrofotómetro (Hitachi U2800) a 25 °C. La reacción se inició mediante la adición de una alícuota de 25 μl del preparado del activador de la protrombina a protrombina (250 nM), y se midió la liberación de p-nitroanilina a 405 nm. Una unidad de actividad es equivalente a la hidrólisis de 1 pmol de sustrato/minuto. Los ensayos que usan otros péptidos nitroanilidas como sustrato se realizaron de la misma manera, con una concentración final de 100 μM .

Ejemplo 1b: Purificación y caracterización de PtPA del veneno de *Pseudonaja textilis* y OsPA del veneno de *Oxyuranus scutellatus*

Este ejemplo describe la purificación y caracterización de activadores de la protrombina del grupo C del veneno de las serpientes *Pseudonaja textilis* y *Oxyuranus scutellatus*. Estos activadores de la protrombina se abrevian como PtPA y OsPA, respectivamente.

Se reconstituyó el veneno de *P. textilis* liofilizado secado en Tris-HCl 0,05 M con un pH de 7,4. La Figura 3 proporciona un perfil de elución del veneno de *P. textilis* reconstituido en una columna Sephracryl S-300 en tampón de Tris-HCl 0,05 M a pH 7,4. 'A' se refiere al volumen vacío y 'B' representa la posición de elución (V_e) para la PtPA, que es de 250 ml en esta columna y equivale a una masa molecular aproximada de 250 kDa. La absorbancia a 280 nm (A_{280}) bajo 'B' representa el 40 % de las unidades totales de A_{280} aplicadas a la columna. Un experimento similar de filtración en gel con veneno de *O. scutellatus* mostró que aproximadamente el 10 % de la A_{280} total cargada se eluyó en el máximo de 250 kDa (que corresponde al activador de la protrombina).

Se usó la cromatografía de afinidad usando Con A-Sepharose 4B en Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4, para purificar el activador de la protrombina del veneno sin elaborar de *P. textilis* y de *O. scutellatus*. El tampón de elución fue metil- α -D-manopiranosido 0,2 M con azida sódica al 0,01 %. El perfil de elución en Con A-Sepharose para PtPA se muestra en la Figura 4. La flecha indica la aplicación de tampón de elución y "a" indica las fracciones agrupadas para proporcionar el activador de la protrombina. La Figura 5 muestra los resultados de PAGE nativa a pH 8,6. El máximo "a" de la Figura 4 mostró una banda de proteína principal y una banda menor traza a cargas de 25 μg (A) y 50 μg (B) por carril. La banda de 250 kDa se escindió del gel en un experimento paralelo y demostró tener actividad similar al Factor Xa contra el sustrato cromogénico S-2222, confirmando su identificación como PtPA (Figura 6). Se obtuvo un patrón similar de elución para OsPA.

PtPA y OsPA se caracterizaron además mediante SDS-PAGE en presencia (designado "red") y ausencia ("no red") de β -mercaptoetanol (Figura 7). Es evidente que hay presentes varias bandas tanto para PtPA como para OsPA que representan las cadenas polipeptídicas constituyentes.

Los preparados que contienen PtPA y OsPA realizados de acuerdo con este método se usaron en todos los experimentos posteriores, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1c: Purificación y caracterización de la notecarina de veneno de *Notechis scutatus*

Se purificó el activador de la protrombina del grupo D denominado notecarina del veneno de *Notechis scutatus*, usando cromatografía de filtración en gel Sephacryl S-300 (5,0 x 9,5 cm) de una manera similar a la descrita en el Ejemplo 1b anterior para los activadores de la protrombina del grupo C. El perfil de elución se muestra en la Figura 8, en la que "PA" se refiere a la fracción que contiene notecarina.

Los preparados que contienen notecarina realizados de acuerdo con este método se usaron en todos los experimentos posteriores, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 1d: Caracterización adicional de la carinactivasa-1, carinactivasa-2, ecarina, PtPA, OsPA y notecarina

Los preparados de activador de la protrombina realizados en los Ejemplos 1a, 1b y 1c se caracterizaron además de la siguiente manera.

Se realizó PAGE nativa de la protrombina, alfa-trombina y los activadores de la protrombina a pH 8,9, y los resultados se muestran en la Figura 9, en la que los marcadores son los siguientes: (I) protrombina; (II) alfa-trombina; (III) ecarina; (IV) carinactivasa-1; (V) carinactivasa-2; (VI) PtPA; (VII) OsPA; (VIII) notecarina (se cargaron 20 μg de cada activador de la protrombina).

Los preparados de activador de la protrombina también se caracterizaron además por SDS-PAGE en presencia (Figura 10) y ausencia (Figura 11) de β -mercaptoetanol. En cada figura, los carriles son las siguientes: (1) carinactivasa-1; (2) carinactivasa-2; (3) ecarina; (4) PtPA; (5) OsPA; (6) notecarina; (7) trombina; y (M) marcador de peso molecular. La muestra que contiene PtPA en el carril (4) y la muestra que contiene OsPA en el carril (5) fueron las mismas que las usadas para los resultados que se muestran en la Figura 7.

La SDS-PAGE muestra que, en cada caso, están presentes las bandas de proteína en las regiones esperadas, pero también que los preparados no son homogéneos. Las concentraciones de proteína de los preparados de activador de la protrombina se calcularon usando la relación de que 1 mg/ml de solución tenía una A_{280} de 1, y las concentraciones molares se calcularon dividiendo las concentraciones de proteína entre los valores publicados para los pesos moleculares. Las concentraciones molares citadas en los experimentos posteriores descritos en el presente documento que usaron estos preparados son, por tanto, estimaciones superiores, porque los preparados no son homogéneos.

EJEMPLO 2: CONVERSIÓN DE PROTROMBINA EN TROMBINA MEDIANTE ACTIVADORES DE LA PROTROMBINA

Ejemplo 2a: Período de incubación de cinco minutos

El objetivo de este experimento fue determinar la cantidad de la protrombina convertida en trombina por seis activadores de la protrombina diferentes del veneno de serpiente preparados en el Ejemplo 1, en concreto, preparados que contenían ecarina, carinactivasa-1, carinactivasa-2, PtPA, OsPA y notecarina, tras la incubación durante cinco minutos a temperatura ambiente.

El experimento se realizó de la siguiente manera.

Tampón de HEPES 20 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, CaCl_2 5 mM, se preparó tensioactivo p20 al 0,05 %.

Se preparó una solución de la protrombina humana en Tris-HCl 0,05 M a pH 7,4 mediante la dilución de una solución madre de la protrombina humana purificada (17,8 mg/ml; n.º HCP-0200; HTI, EE. UU.) 1/50 con agua destilada para proporcionar una solución de trabajo de 0,36 mg/ml, dando una concentración final en el tubo de 72 $\mu\text{g/ml}$ o 0,99 μM . Para la carga de gel, se usó la solución de la protrombina a 0,36 mg/l.

Se diluyeron las soluciones madre de los preparados de activador de la protrombina realizados como se ha descrito anteriormente para proporcionar concentraciones finales de 6 nM.

Se diluyó la alfa-trombina madre (10 mg/ml, n.º HCT-0020; HTI, EE. UU.) (1/30) con agua destilada que contenía Tween 20 al 0,01 % para proporcionar una solución de trombina de trabajo de 0,33 mg/l, que se usó para cargarla en los geles de SDS-PAGE.

Las muestras se prepararon luego con los volúmenes que se muestran en la Tabla 3, y se incubaron durante cinco minutos a temperatura ambiente.

Tabla 3: Volúmenes en cada muestra para incubación

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8
Tampón de HEPES (μl)	80	60	60	60	60	60	60	80
Protrombina (μl)	20	20	20	20	20	20	20	0
Activador de la protrombina	0	50	50	50	50	50	50	0
α -trombina (μl)	0	0	0	0	0	0	0	20
Volumen total (μl)	100	100	100	100	100	100	100	100

Los activadores de la protrombina de las muestras anteriores fueron los siguientes: (1) sin activador de la protrombina (protrombina humana sola en tampón); (2) carinactivasa-1; (3) carinactivasa-2; (4) ecarina; (5) PtPA; (6) OsPA; (7) notecarina; y (8) α -trombina altamente purificada (sin activador de la protrombina).

Los geles de SDS PAGE usados fueron geles nUView Precast Mini Gels (n.º NB10-420, 4-20 %) con tampón de ejecución de Tris-Glicina (n.º BG-143). Se obtuvo tampón de muestra (n.º BG-145) (NuSEP, Australia) (es decir, tampón de muestra no reductor), y se preparó un tampón de muestra reductor del tampón de muestra con β -mercaptoetanol al 5 % (n.º 44143, BDH, RU).

Tras una incubación de cinco minutos, se transfirió una alícuota de 40 μl de cada muestra a un volumen equivalente de tampón de muestra no reductor o tampón de muestra reductor. Las muestras se incubaron luego durante 10 minutos a 100 °C en un bloque calefactor. Se cargaron una alícuota de 25 μl de cada muestra y 12 μl del marcador

de peso molecular previamente teñido (n.º SM0671 Page Legler Prestained Protein Ladder, Fermentas, Hanover, MD, EE. UU.) en los geles. Se procesaron los geles a 100 V usando un aparato Mini-Protein II Cell PAGE (Bio-Rad) hasta que el frente del colorante alcanzó el fondo del gel. Los geles se tiñeron con azul brillante de Commassie G (n.º B-0770, Sigma) (azul brillante de Commassie G al 0,25 % p/v, metanol al 45 %, ácido acético al 10 %), y se retiró el exceso de tinción mediante destinción (metanol al 45 %, agua al 45 % y ácido acético al 10 %).

Los resultados se muestran en la Figura 12, en la que la Figura 12A muestra el gel de SDS-PAGE usando el tampón de muestra sin β -mercaptoetanol (tampón de muestra no reductor) y la Figura 12B muestra el gel de SDS-PAGE usando el tampón de muestra que contenía β -mercaptoetanol al 5 % (tampón de muestra reductor). Los números de muestra usados en la Tabla 3 anterior son los mismos que los números de carril de los geles de la Figura 12, y "m" representa el marcador de peso molecular.

Este experimento mostró la conversión completa de la protrombina en trombina en cinco minutos mediante PtPA y OsPA, pero muy poca conversión por parte de los otros preparados de activador de la protrombina en estas condiciones.

Ejemplo 2b: Curso en el tiempo para la conversión mediante PtPA y notecarina

Se determinó un curso temporal para la conversión de la protrombina (14 μ M) en trombina mediante PtPA (6 nM) y mediante notecarina (6 nM), y los resultados del gel de SDS-page se muestran en la Figura 13, en la que cada carril está numerado de acuerdo con el tiempo de incubación como se muestra en la Tabla 4 que se presenta a continuación, usando una metodología similar a la del Ejemplo 2a.

Tabla 4: Tiempo de incubación para cada carril mostrado en la Figura 13.

Carril	Tiempo (min)
1	0
2	0,5
3	1
4	2
5	4
6	6
7	8
8	10
9	15
10	20
11	25
12	30
13	45
14	150

Estos resultados muestran que la PtPA es más eficaz que la notecarina en la conversión de la protrombina en trombina, pero que la notecarina aún proporciona una escisión completa de la protrombina tras tiempos de reacción más largos.

Ejemplo 2c: Secuenciación N-terminal de las bandas seleccionadas de los resultados del Ejemplo 2b

Las bandas seleccionadas de los resultados de SDS-PAGE del Ejemplo 2b, producidas por la acción de PtPA y notecarina en la protrombina (es decir, la fragmentación de la protrombina en trombina), se eluyeron y se sometieron a secuenciación N-terminal usando análisis de espectrometría de masas para asignar dominios moleculares específicos. En la Figura 14 se muestran estos resultados. La secuenciación N-terminal con SDS-PAGE confirmó la conversión de la protrombina en alfa-trombina por parte de la PtPA y notecarina, como se muestra por la banda principal con secuencia N-terminal IVEGSDA que corresponde a la cadena pesada de alfa-trombina.

Ejemplo 2d: Estimación de la trombina generada mediante análisis cinético

Este experimento se diseñó para determinar la cantidad de trombina generada a partir de la protrombina por cada uno de los activadores de la protrombina: ecarina; carinactivasa-1; carinactivasa-2; PtPA; OsPA; y notecarina, a una concentración de 0,6 nM, mediante un análisis cinético.

La absorbancia de la p-nitroanilina (pNA) generada a partir del sustrato de trombina cromogénico S-2238 se controló de manera continua a 405 nm, para las muestras que contenían diferentes concentraciones de trombina y para las muestras que contenían uno de los activadores de la protrombina enumerados anteriormente.

Para el estudio de la trombina, cada cubeta contenía 50 µl de sustrato S-2238 (134 µM), 50 µl de trombina a diferentes concentraciones (intervalo de 0,25-30 nM) y 900 µl de tampón de HEPES. La Figura 15 muestra las curvas de progreso para la hidrólisis de S-2238 mediante la trombina usadas para generar la curva patrón mostrada en la Figura 16.

Para el estudio de los activadores de la protrombina, cada cubeta contenía 50 µl de protrombina (247 nM), 10 µl (0,6 nM) del activador de la protrombina (ecarina, carinactivasa-1, carinactivasa-2, PtPA, OsPA y notecarina), 100 µl (267 µM) de sustrato S-2238 y 840 µl de tampón de HEPES. La pendiente de reacción para cada activador de la protrombina se determinó en 155 segundos y la cantidad de trombina generada en 155 segundos se leyó a partir de la curva patrón de la Figura 16, como se muestra en la Figura 17 y en la Tabla 5.

Tabla 5: Cantidad de trombina generada por 0,6 nM de los activadores de la protrombina durante 155 segundos

Activador de la protrombina (0,6 nM)	Pendiente calculada a partir de las curvas patrón de la Figura 16	Cantidad de trombina generada (nM) a los 155 segundos
Ecarina	0,00085	1,74
Carinactivasa-1	0,00007	0,07
Carinactivasa-2	0,0005	0,99
PtPA	0,0094	20,12
OsPA	0,0077	16,47
Notecarina	0,0001	0,13

Como era de esperar, todos los preparados de activadores de la protrombina produjeron trombina, pero de nuevo, la PtPA y la OsPA fueron las más eficaces.

Estos resultados indican que los activadores de la protrombina del grupo C (PtPA y OsPA) fueron las enzimas más eficaces en la hidrólisis de la protrombina en trombina. Esto se confirmó por la cantidad de trombina formada que fue capaz de hidrolizar el sustrato S-2238 para formar el producto de color pNA. El siguiente activador de la protrombina más eficaz fue la ecarina, que demostró que hidrolizaba ~4 % del S-2238, seguida de la carinactivasa-2 (2,5 %) y luego de la carinactivasa-1 y, por último, siendo la notecarina (<1 %) la menos eficaz de los activadores de la protrombina en este sistema purificado. Los activadores de la protrombina del grupo D (por ejemplo, la notecarina) requieren Factor Va, calcio y fosfolípido, que estaban ausentes en el sistema, pero todos ellos presentes en la sangre.

Ejemplo 2e: Estudios cinéticos sobre las velocidades comparativas de generación de trombina a partir de la trombina por activadores de la protrombina

Este experimento se diseñó para determinar la velocidad de formación de trombina generada a partir de la protrombina pura por cada uno de los preparados de activadores de la protrombina.

Cada cubeta contenía 50 µl de protrombina (247 nM), 10 µl de los diferentes activadores de la protrombina, 100 µl (267 µM) de sustrato S-2238 y 840 µl de tampón de HEPES.

Las curvas de progreso para la hidrólisis de S-2238 (actividad de la trombina) para cada activador de la protrombina se determinaron a 3-5 concentraciones diferentes que variaban de 0,006 a 6 nM. Los datos se analizaron usando el software de análisis de datos cinéticos enzimáticos DynaFit 4.04.64 (BioKin Ltd, Watertown, MA, EE.UU.) (Kuzmic, P., 1996).

La hidrólisis catalizada por la trombina del análisis de ajuste de curva de S-2238 se muestra en la Figura 18.

Los parámetros cinéticos se calcularon de la siguiente manera:

Modelo: $B \rightarrow B + \text{pNA} + P$ (una constante de velocidad de pseudo-primer orden para la hidrólisis de la trombina de S-2238), en la que:

B = trombina;

pNA = p-nitroanilina;

P = producto de inhibición; y

S-2238 está en exceso y, por tanto, no se incluye en la reacción.

Ecuaciones diferenciales de la siguiente manera:

$$d[B]/dt = -k_b[B] + k_b[B];$$

$$d[pNA]/dt = +k_b[B]; \text{ y}$$

$$d[P]/dt = +k_b[B].$$

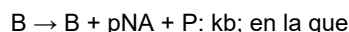
La Tabla 6 muestra los parámetros cinéticos estimados para la trombina.

Tabla 6: Parámetros cinéticos estimados para la trombina

Unidades	Parámetro	Inicial	Ajuste	% de VC
s ⁻¹	kb	61,3 (Sonder, <i>et al.</i> , 1986)	66,2	0,4

Estimación de la constante de velocidad para los activadores de la protrombina:

Modelo:



A = activador de la protrombina.

Ecuaciones diferenciales de la siguiente manera:

$$d[A]/dt = -k_a[A][Z] + k_a[A][Z];$$

$$d[Z]/dt = -k_a[A][Z];$$

$$d[B]/dt = +k_a[A][Z] - k_b[B] + k_b[B];$$

$$d[pNA]/dt = +k_b[B]; \text{ y}$$

$$d[P]/dt = +k_b[B].$$

Se estimaron los parámetros cinéticos para PtPA y se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Parámetros cinéticos estimados para la PtPA

Unidades	Parámetro	Inicial	Ajuste	% de VC
s ⁻¹	kb		66,2	
s ⁻¹ nM ⁻¹	ka	0,001	6,722 x 10 ⁻⁴	1,8
s ⁻¹ M ⁻¹	ka		6,72 x 10 ⁵	1,8

La velocidad de generación de trombina:

$$= k_a (s^{-1} M^{-1}) \times 60 (s) \times 10^{-6}$$

$$= \text{trombina } 40,3 \mu\text{M}/\text{min}/\text{M de protrombina}/\text{M de activador}$$

$$= 40,3 \text{ nmol de trombina}/\text{ml}/\text{min}/\mu\text{mol de protrombina}/\mu\text{mol de activador}$$

La Figura 19 representa gráficamente la activación de la protrombina con PtPA, demostrando las velocidades de reacción de diferentes concentraciones de PtPA (0,006 - 0,12 nM) con protrombina y luego la trombina generada con el sustrato cromogénico S-2238, y la mejor curva de ajuste para la activación de la protrombina con PtPA. Las líneas de puntos son los resultados experimentales y las líneas continuas son las calculadas como las que mejor se ajustan. Estas curvas de progreso experimentales y calculadas muestran una buena coincidencia.

Luego se estimaron los parámetros cinéticos para OsPA, y se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Parámetros cinéticos estimados para OsPA

Unidades	Parámetro	Inicial	Ajuste	% de VC
s^{-1}	kb		66,2	
$s^{-1} nM^{-1}$	ka	0,001	$7,325 \times 10^{-4}$	3,3
$s^{-1} M^{-1}$	ka		$7,33 \times 10^5$	3,3

La velocidad de generación de trombina:

5 = 44,0 nmol de trombina/ml/min/ μ mol de protrombina/ μ mol de activador

La Figura 20 representa gráficamente la activación de la protrombina con OsPA, demostrando las velocidades de reacción de diferentes concentraciones de OsPA (0,006 - 0,24 nM) con protrombina y luego la trombina generada con el sustrato cromogénico S-2238, y la mejor curva de ajuste para la activación de la protrombina con OsPA. Las líneas de puntos son los resultados experimentales y las líneas continuas son las calculadas como las que mejor se ajustan. Estas curvas de progreso experimentales y calculadas muestran una buena coincidencia.

Luego se estimaron los parámetros cinéticos para la ecarina, y se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Parámetros cinéticos estimados para la ecarina

Unidades	Parámetro	Inicial	Ajuste	% de VC
	kb		66,2	
$s^{-1} nM^{-1}$	ka	0,001	$4,607 \times 10^{-005}$	1,2
$s^{-1} M^{-1}$	ka		$4,61 \times 10^4$	1,2

La velocidad de generación de trombina:

20 = trombina 2,76 μ M/min/ μ M de protrombina/ μ M de activador

 = 2,76 nmol de trombina/ml/min/ μ mol de protrombina/ μ mol de activador

La Figura 21 representa gráficamente la activación de la protrombina con ecarina, demostrando las velocidades de reacción de diferentes concentraciones de ecarina (0,24 ~ 1,2 nM) con protrombina y luego la trombina generada con el sustrato cromogénico S-2238, y la mejor curva de ajuste para la activación de la protrombina con ecarina. Las líneas de puntos son los resultados experimentales y las líneas continuas son las calculadas como las que mejor se ajustan. Estas curvas de progreso experimentales y calculadas muestran una buena coincidencia.

Luego se estimaron los parámetros cinéticos para la carinactivasa-1, y se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Parámetros cinéticos estimados para la carinactivasa-1

Unidades	Parámetro	Inicial	Ajuste	% de VC
s^{-1}	kb		66,2	
$s^{-1} nM^{-1}$	ka	0,001	$3,944 \times 10^{-006}$	0,3
$s^{-1} M^{-1}$	ka		$3,94 \times 10^3$	0,3

La velocidad de generación de trombina:

35 = trombina 0,24 μ M/min/ μ M de protrombina/ μ M de activador

 = 0,24 nmol de trombina/ml/min/ μ mol de protrombina/ μ mol de activador

La Figura 22 representa gráficamente la activación de la protrombina con carinactivasa-1, demostrando las velocidades de reacción de diferentes concentraciones de carinactivasa-1 (0,24 - 1,2 nM) con protrombina y luego la trombina generada con el sustrato cromogénico S-2238, y la mejor curva de ajuste para la activación de la protrombina con carinactivasa-1. Las líneas de puntos son los resultados experimentales y las líneas continuas son las calculadas como las que mejor se ajustan. Estas curvas de progreso experimentales y calculadas muestran una buena coincidencia.

Luego se estimaron los parámetros cinéticos para la carinactivasa-2, y se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Parámetros cinéticos estimados para la carinactivasa-2

Unidades	Parámetro	Inicial	Ajuste	% de VC
s^{-1}	kb		66,2	
$s^{-1} nM^{-1}$	ka	0,001	$3,183 \times 10^{-005}$	1,8
$s^{-1} M^{-1}$	ka		$3,18 \times 10^4$	1,8

La velocidad de generación de trombina:

5 = trombina 1,91 $\mu M/min/\mu M$ de protrombina/ μM de activador

= 1,91 nmol de trombina/ml/min/ μmol de protrombina/ μmol de activador

La Figura 23 representa gráficamente la activación de la protrombina con carinactivasa-2, demostrando las velocidades de reacción de diferentes concentraciones de carinactivasa-2 (0,24 -1,2 nM) con protrombina y luego la trombina generada con el sustrato cromogénico S-2238, y la mejor curva de ajuste para la activación de la protrombina con carinactivasa-2. Las líneas de puntos son los resultados experimentales y las líneas continuas son las calculadas como las que mejor se ajustan. Estas curvas de progreso experimentales y calculadas muestran una buena coincidencia.

Luego se estimaron los parámetros cinéticos para la notecarina, y se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Parámetros cinéticos estimados para la notecarina

Unidades	Parámetro	Inicial	Ajuste	% de VC
s^{-1}	kb		66,2	
$s^{-1} nM^{-1}$	ka	0,001	$7,139 \times 10^{-007}$	0,3
$s^{-1} M^{-1}$	ka		$7,14 \times 10^2$	0,3

La velocidad de generación de trombina:

= trombina 0,043 $\mu M/min/\mu M$ de protrombina/ μM de activador;

= 0,043 nmol de trombina/ml/min/ μmol de protrombina/ μmol de activador.

La Figura 24 representa gráficamente la activación de la protrombina con notecarina, demostrando las velocidades de reacción de diferentes concentraciones de notecarina (0,24 - 6,0 nM) con protrombina y luego la trombina generada con el sustrato cromogénico S-2238, y la mejor curva de ajuste para la activación de la protrombina con notecarina. Las líneas de puntos son los resultados experimentales y las líneas continuas son las calculadas como las que mejor se ajustan. Estas curvas de progreso experimentales y calculadas muestran una buena coincidencia.

En la Tabla 13, se proporciona un resumen de las constantes de velocidad de activación estimadas y la velocidad de generación de la trombina para cada uno de los activadores de la protrombina.

Tabla 13: Resumen de las constantes de velocidad de activación estimadas y la velocidad de generación de trombina para los diferentes activadores de la protrombina

Activador de la protrombina	Constante de velocidad de activación ka ($s^{-1} nM^{-1}$)	Velocidad de generación de trombina (nmol de trombina/ml/min/ μmol de protrombina/ μmol de activador)
PtPA	$6,72 \times 10^5$	40,3
OsPA	$7,33 \times 10^5$	44,0
ecarina	$4,61 \times 10^4$	2,76
carinactivasa-1	$3,94 \times 10^3$	0,24
carinactivasa-2	$3,18 \times 10^4$	1,91
notecarina	$7,14 \times 10^2$	0,043

No hubo reacción entre los diferentes activadores de la protrombina y el sustrato de trombina S-2238, ni hubo reacción por parte de la protrombina con S-2238. Las constantes de datos de velocidad de activación confirmaron que los activadores de la protrombina del grupo C (PtPA y OsPA) son más potentes en la hidrólisis de la protrombina en trombina. De hecho, fueron más de 20 veces más eficaces que la ecarina y la carinactivasa-2, más de 200 veces que la carinactivasa-1 y aproximadamente 1.000 veces más eficaces que la notecarina. Las velocidades de

generación de trombina estimadas muestran igualmente la misma proporción de eficacia, los activadores del grupo C fueron capaces de generar la mayor cantidad de trombina, seguidos de la ecarina, carinactivasa-2, carinactivasa-1 y la notecarina, que fue la menos eficaz. Como se observa en el Ejemplo 2d, la notecarina requiere cofactores para la actividad.

5

MATERIALES Y MÉTODOS USADOS EN LOS SIGUIENTES EJEMPLOS

Donde se indica en los siguientes ejemplos, se usaron los siguientes materiales y métodos.

10 (A) RECIPIENTES PARA LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Un recipiente típico (por ejemplo, un tubo) para la preparación de una muestra de suero o una muestra de plasma contiene: (1) una barrera de gel para separar las células (y el coágulo en el caso del suero) del plasma o suero durante la centrifugación y garantizar la posterior repetición de la mezcla; (2) un tensioactivo que recubre la pared interna para evitar la adhesión de células y proteínas a la pared del tubo para minimizar la posterior lisis celular; y (3) un procoagulante que potencia el proceso de coagulación (por ejemplo, partículas de sílice) para la preparación de una muestra de suero o un anticoagulante (por ejemplo, heparina de litio, citrato o EDTA) para la preparación de una muestra de plasma.

15

20 En los Ejemplos, se usó una serie de tubos disponibles en el mercado para preparar muestras de suero o muestras de plasma como se describe a continuación.

Tubo de plasma Vacuette™ de Greiner Se trata de un tubo separador de plasma suministrado por Greiner con el número de referencia 456083. La pared interna del tubo está recubierta con heparina de litio secada por pulverización (89 UI) que actúa como agente anticoagulante. El tubo también contiene un gel de separación en la base del tubo. Greiner afirma que este gel actúa para formar una barrera estable entre el plasma y las células sanguíneas, lo que permite que los parámetros permanezcan estables durante hasta 48 horas. El volumen de llenado es de 5,0 ml.

25

Tubo de plasma Vacutainer™ de Becton Dickinson (BD) (BD PST II) Se trata de un tubo separador de plasma suministrado por BD con el número de referencia 367375. Cada tubo contiene 77 UI/ml de heparina de litio (0,2 - 1,0 mg) como anticoagulante. El tubo contiene un gel acrílico (0,8-1,9 g) que forma una barrera entre las células y el plasma durante la centrifugación. BD afirma que este gel proporciona una mejor pureza plasmática demostrada por una reducción de la fibrina y los glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas mensurables, así como una estabilidad analizada potenciada, ya que la mayoría de los analitos son estables en el tubo durante 24 horas a 25 °C. El volumen de llenado es de 4,0 ml.

30

35

Tubo de suero Vacuette™ de Greiner Se trata de un tubo suministrado por Greiner con el número de referencia 456078. El tubo contiene partículas de sílice como activador de los coágulos. El volumen de llenado es de 4,0 ml. El tiempo de coagulación recomendado en este tubo es de 30 minutos.

40

Tubo de suero Vacutainer™ de Becton Dickinson (BD) (BD SST II) Se trata de un tubo suministrado por BD con el número de referencia 367954. Este tubo se usa para obtener y separar una muestra de suero. Cada tubo contiene de 0,20 a 2,56 mg de sílice amorfa (o condensada) como agente de coagulación, y también un gel (0,90 - 3,50 g) que forma una barrera entre el coágulo y el suero tras la centrifugación. BD recomienda un tiempo de coagulación de 30 minutos para este tubo. El volumen de llenado es de 4,0 ml.

45

Tubo de suero rápido Vacutainer™ de Becton Dickinson (BD) (BD RST) Se trata de un tubo suministrado por BD con el número de referencia 368771. El tubo contiene un gel y un agente de coagulación médico a base de trombina. BD afirma que estos tubos proporcionarán una muestra coagulada en cinco minutos, (es decir, una coagulación más rápida que un tubo de suero convencional disponible en el mercado), y tendrán "formación mínima de fibrina". El volumen de llenado es de 4,0 ml.

50

Tubo sin aditivos Vacuette™ de Greiner Se trata de tubos de plástico sencillos suministrados por Greiner con el número de referencia 45400, a los que se añadieron activadores de la protrombina a determinadas concentraciones como se describe en los siguientes ejemplos.

55

Tubo de suero de Sarstedt Este tubo se suministra con el número de catálogo 5092503 con una tapa de color marrón claro y tiene un volumen de llenado de 4,7 ml. Estos tubos contienen partículas de sílice y una barrera de gel.

60

Tubo sencillo de Terumo Este tubo se suministra con la marca comercial VENOSAFE con el número de catálogo VF-076SP y tiene un volumen de llenado de 6,0 ml. Estos tubos contienen partículas de sílice y una barrera de gel.

Tubo Red Top (RT) de Terumo Este tubo se suministra con la marca comercial VENOSAFE con el número de catálogo VF-108SAS y tiene un volumen de llenado de 8,0 ml. Estos tubos están recubiertos internamente con sílice y tienen una barrera de gel.

- 5 Tubo de citrato Vacuette™ de Greiner Este tubo de plástico contiene citrato al 3,2 % con un volumen de llenado de 4,0 ml. El tubo se comercializa con el número de catálogo 454327.

Tubo de K2EDTA Vacuette™ de Greiner Este tubo de plástico contiene EDTA 8 mM y tiene un volumen de llenado de 4,0 ml. El tubo se comercializa con el número de catálogo 454023.

10

(B) ANÁLISIS DE MUESTRAS - ANALIZADOR CLOTEK

El analizador Clotek (Hyland, EE. UU.) usa un tubo de muestras que contiene una bola magnética que oscila verticalmente cuando el tubo se introduce en la máquina. La bola de acero magnético es mantenida en su sitio por un campo magnético mientras el tubo oscila. Se añaden la muestra, un tampón, $\pm$ calcio y procoagulante, y se activa el temporizador. La trombina convierte el fibrinógeno en fibrina coagulable, y el tiempo requerido para formar el coágulo detectable es el tiempo de coagulación. En la formación del coágulo, la bola de acero se retira del campo magnético de suspensión y de la trayectoria de la luz, haciendo que el haz de luz golpee la fotocélula y detenga el cronómetro (Austen, D. E., *et al.* 1975 y Starr, H., *et al.*, 1980).

20

(C) ANÁLISIS DE MUESTRAS - TROMBOELASTOGRAFÍA

La tromboelastografía (TEG) mide la coagulación de la sangre entera determinando la velocidad de formación y lisis del coágulo de sangre, y las propiedades elásticas del coágulo de sangre durante su formación y lisis. Cuando se indica en algunos de los siguientes ejemplos, se realizó un análisis TEG.

25

El análisis TEG se realizó usando un Thrombelastograph® 5000 (TEG, Haemoscope Corporation Pty Ltd, Niles, IL, EE. UU.) con el software analítico de TEG versión 4.

- 30 Los parámetros de coagulación usados en el presente documento para el análisis TEG fueron los siguientes:

R - tiempo de reacción (segundos/minutos): tiempo desde el inicio del análisis hasta que la amplitud de trazado del TEG alcanza los 2 mm, lo que indica la formación de coágulos detectables;

- 35 α - ángulo: medida de la velocidad de formación de fibrina y la reticulación (es decir, el fortalecimiento de los coágulos);

AM - amplitud máxima (mm): resistencia máxima del coágulo;

- 40 TAM - tiempo (segundos/minutos) desde el inicio del análisis hasta que se alcanza la AM; y

K - tiempo (s): tiempo desde el inicio de la formación del coágulo hasta el momento en que la curva alcanza una amplitud de 20 mm.

- 45 En la Figura 25, se proporciona un ejemplo de representación gráfica TEG (parte de la formación del coágulo) con los parámetros de coagulación anteriores marcados. Solo se presentan los parámetros de coagulación, ya que los parámetros de lisis de coágulos no se incluyeron.

EJEMPLO 3: COAGULACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PLASMA POR ACTIVADORES DE LA PROTROMBINA DE VENENO

50

Ejemplo 3a: Tiempos de coagulación del plasma citrado normal por pTPA frente a trombina bovina

Se midieron los tiempos de coagulación del plasma citrado agrupado (plasma combinado de 6 participantes normales) con PtPA (preparada como se describe en el Ejemplo 1d) y α -trombina bovina (3276 U/mg; Sigma Chemical Co.), con y sin calcio añadido (10 mM), en muestras duplicadas.

55

Los resultados se muestran en la tabla 14, en la que los valores son las medias de los experimentos por duplicado.

- 60 Tabla 14: Tiempos de coagulación del plasma citrado con PtPA trombina bovina, medidos en una máquina Hyland-Clotek (segundos).

Concentración de enzima (nM)	Tiempo de coagulación (segundos)			
	PtPA + calcio	PtPA - calcio	trombina + calcio	trombina - calcio
100	4,2	4,7	4,8	7,9

Concentración de enzima (nM)	Tiempo de coagulación (segundos)			
	<i>PtPA + calcio</i>	<i>PtPA - calcio</i>	<i>trombina + calcio</i>	<i>trombina - calcio</i>
50	4,2	4,8	6,4	17,9
30	4,3	5,0	13,3	27,2
10	4,5	5,4	33,2	57,2
3	5,0	6,2	78,6	>200 [#]
1	6,0	6,6	>200 [#]	>200
0,1	8,7	8,8	>200	>200
0,001 (1 pM)	13,5	29,0	>200	>200
0,0001 (0,1 pM)	74,1	98,6	>200	>200
0	>200	>200	>200	>200
# Coágulo débil observado.				

La PtPA coaguló plasma citrado eficazmente a concentraciones tan bajas como de 0,1 pM con o sin recalcificación. Una concentración de 1 nM dio un tiempo de coagulación de aproximadamente 6 segundos, cerca del tiempo de coagulación mínimo alcanzado a 100 nM de 4,2 segundos.

Estos resultados también muestran que PtPA es aproximadamente 3×10^4 veces más eficaz en la coagulación del plasma citrado (con o sin recalcificación) sobre una base molar que la trombina bovina. Por ejemplo, en presencia de calcio 10 mM añadido, PtPA 1 pM dio el mismo tiempo de coagulación que la trombina 30 nM, y PtPA 0,1 pM tuvo un tiempo de coagulación muy similar al de la trombina 3 nM (valores en negrita en la Tabla 14).

Ejemplo 3b: Tiempos de coagulación del plasma citrado normal por activadores de la protrombina

Este experimento usó el mismo plasma que se usó en el Ejemplo 3a.

Cada tubo Clotek contenía 100 µl de plasma citrado "agrupado" normal, 100 µl de tampón de Tris (Tris HCl 150 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), 50 µl de CaCl₂ 0,2 M o solución salina, y 50 µl de cada procoagulante (bien preparado de activador de protrombina o trombina).

Los resultados de coagulación de cada preparado de activador de la protrombina y de trombina con el plasma citrado "agrupado" normal (con y sin recalcificación) se muestran en las Tablas 15 y 16. En estas tablas (y en otras partes), CA-1 es carinactivasa-1 y CA-2 es carinactivasa-2.

Tabla 15: Tiempos de coagulación del plasma citrado "agrupado" normal con diferentes preparados de activadores de la protrombina y trombina, con calcio.

[Procoagulante] (mM)	Con Ca ²⁺ (segundos)						
	Ecarina	CA-1	CA-2	PtPA	OsPA	Notecarina	Trombina
100	43,0	108	65,8	3,5	5,7	42,4	4,3
50	56,0	145	85,0	4,6	6,5	52,8	6,7
30	69,0	181	167	4,9	7,9	57,5	10,5
10	105	>300	>300	12,5	12,5	68,5	32,8
3	208	>300	>300	20,1	18,3	99,8	92,3
1	>300	>300	>300	61	30,0	144	>300
0,1	>300	>300	>300	120	108	284	ND
0,01	>300	>300	>300	212	>300	>300	ND
0,001	>300	>300	>300	>300	>300	>300	ND

Tabla 16: Tiempos de coagulación del plasma citrado "agrupado" normal con diferentes preparados de activadores de la protrombina y trombina, sin calcio

[Procoagulante] (mM)	Sin Ca ²⁺ (segundos)						
	Ecarina	CA-1	CA-2	PtPA	OsPA	Notecarina	Trombina
100	94,0	>300	216	3,9	7,3	51,7	5,6
50	129	>300	>300	5,0	8,2	67,6	9,2

[Procoagulante] (mM)	Sin Ca^{2+} (segundos)						
	Ecarina	CA-1	CA-2	PtPA	OsPA	Notecarina	Trombina
30	167	>300	>300	6,1	8,9	76,7	14,6
10	>300	>300	>300	9,0	14,0	115	43,6
3	>300	>300	>300	15,5	21,5	250	145
1	>300	>300	>300	24,6	34,5	>300	>300
0,1	>300	>300	>300	93,0	152	>300	ND
0,01	>300	>300	>300	>300	>300	>300	ND
0,001	>300	>300	>300	>300	>300	>300	ND

Los resultados muestran que, en presencia de calcio añadido, todos los activadores de la protrombina (que representan los grupos A-D) coagularon eficazmente el plasma citrado normal.

- 5 El plasma citrado no está completamente empobrecido en calcio. La concentración total de calcio en plasma citrado normal es de ~1,3 mmol/l y la concentración de calcio ionizado es inconmensurable (<0,25 mmol/l). Sin embargo, el citrato es un quelante del calcio, que se une al calcio de la muestra, de modo que no se puede obtener calcio libre para la formación del coágulo. El calcio es parte del complejo protrombinasa, y desempeña un papel importante en la protrombina para la catálisis de la trombina. El citrato también se une a otros iones metálicos, incluyendo los iones de magnesio y cinc. La cantidad de citrato presente en el tubo, 0,109 mol/l, es más que suficiente para quelar todos los iones metálicos en el tubo.

Estos resultados mostraron que la ecarina, el activador de la protrombina del grupo A, fue más del doble de eficaz en la coagulación del plasma en presencia de calcio añadido y, por lo tanto, el calcio tiene una mejora significativa en la capacidad de la ecarina para acelerar la formación del coágulo. Los activadores de la protrombina del grupo B, la carinactivasa-1 y la carinactivasa-2, se vieron fuertemente afectados por la ausencia de calcio, con una disminución de la actividad de ~4 veces, lo que confirma que el calcio aumenta la actividad de coagulación con estos activadores de la protrombina. La actividad de la notecarina, el activador de la protrombina del grupo D, se estimuló por la presencia de calcio añadido, y el requerimiento de calcio fue más evidente con la disminución de la concentración de notecarina, aumentando la adición de calcio su eficacia en ~30 %.

La propia trombina se vio afectada en menor grado por la ausencia del calcio añadido. La propia trombina genera la formación de trombina en la muestra a través de la cascada de coagulación de la protrombina, que requiere calcio. Por lo tanto, la cantidad de trombina formada a partir de la muestra de la protrombina disminuyó con la ausencia de calcio.

La dependencia del calcio de los procoagulantes fue menor cuando se encontraban a altas concentraciones debido a su potencia. Los resultados mostraron que los activadores de la protrombina del grupo C, PtPA y OsPA, fueron los más eficaces en la coagulación del plasma de citrato normal "agrupado", tanto en presencia como en ausencia de calcio añadido. De hecho, la ausencia de calcio produjo una diferencia mínima en la capacidad de coagulación de estos dos procoagulantes. Con y sin la presencia de calcio añadido, los activadores de la protrombina del grupo C requerían ~ 0,1 nM para lograr la coagulación en < 5 minutos.

Ejemplo 3c: Tiempos de coagulación de muestras de plasma citrado y fibrinógeno con PtPA

Se determinó la capacidad de PtPA para coagular las siguientes muestras de plasma citrado recalcificado y una muestra de fibrinógeno purificado en las siguientes muestras por duplicado:

(i) plasma citrado;

(ii) plasma citrado adsorbido por $\text{Al}(\text{OH})_3$ (la adsorción por $\text{Al}(\text{OH})_3$ elimina la protrombina y otras proteínas que contienen γ -carboxiglutamato (GLA));

(iii) plasma citrado de pacientes en tratamiento con warfarina a largo plazo (con un índice internacional normalizado (INR) superior a 4,0);

(iv) plasma citrado de pacientes tratados con warfarina a largo plazo (con un INR superior a 4,0) adsorbido por $\text{Al}(\text{OH})_3$;

(v) plasma citrato deficiente en factor X obtenido de pacientes con deficiencia congénita;

(vi) plasma citrato deficiente en Factor V obtenido de pacientes con deficiencia congénita; y

(vii) fibrinógeno humano purificado (2 mg/ml en solución salina isotónica), adsorbido con $\text{Al}(\text{OH})_3$ (para eliminar las trazas de protrombina).

Con respecto a (iii) e (iv), la warfarina inhibe la γ -carboxilasa hepática, una enzima que introduce grupos γ -carboxilo en 10 restos de ácido glutámico N-terminal de la protrombina. Por lo tanto, el plasma de warfarina contiene un precursor no carboxilado de la protrombina, la protrombina descarboxilada, que se elimina en caliente mediante adsorción con $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Con respecto a (v) e (vi), el Factor Xa y el Factor Va son componentes esenciales del complejo de la protrombinasa humana. Los plasmas deficientes en factor X y deficientes en factor V fueron suministrados por Ortho-Diagnostics, EE.UU.

Los resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17: Tiempos de coagulación de las muestras de plasma citrado (i)-(vi) y de la muestra de fibrinógeno (vii).

PtPA* (nM)	Tiempo de coagulación (segundos $\pm$ 0,5 segundos) para muestras						
	(i)	(ii)	(iii)	(iv)	(v)	(vi)	(vii)
54	12,8	> 180	15,6	18,4	16,5	12,8	>180
26	16,4	> 180	18,4	26,8	n.d.	n.d.	n.d.
16	22,5	> 180	24,6	28,6	n.d.	n.d.	n.d.
7,3	34,6	> 180	38,8	42,3	n.d.	n.d.	n.d.
3,8	48,2	> 180	55,0	59,8	n.d.	n.d.	n.d.
0 [#]	10,0	10,6	7,7	8,6	14,6	10,6	5,4

* En este experimento, se usó un preparado diferente de PtPA, que representa una menor actividad de coagulación que la de la Tabla 14 anterior.
n.d. significa que las mediciones no fueron determinadas.
[#] Cuando no se añadió PtPA, se añadieron 0,1 unidades de trombina bovina (Parke-Davis, ahora Pfizer, EE.UU.) a todas las muestras como control positivo. La rápida coagulación observada al añadir trombina confirmó la presencia de fibrinógeno en todas las muestras.

Los resultados de la Tabla 17 muestran que:

(1) la protrombina es necesaria para la coagulación por parte de PtPA, ya que el plasma citrado adsorbido con $\text{Al}(\text{OH})_3$ (muestra (ii)) no fue coagulado por PtPA;

(2) la PtPA coagula el plasma de warfarina (muestras (iii) e (iv)) lo que indica que la protrombina descarboxilada puede ser convertida en α -trombina por PtPA;

(3) el resultado para el plasma de warfarina adsorbido por $\text{Al}(\text{OH})_3$ (muestra (iv)) confirma que la protrombina descarboxilada se convierte en α -trombina, ya que las trazas de la protrombina normal en el plasma de warfarina serían eliminadas por el $\text{Al}(\text{OH})_3$;

(4) el factor Xa no es necesario para la coagulación con PtPA (resultados para la muestra (v));

(5) no se requiere Factor Va para la coagulación con PtPA (resultados para la muestra (vi)); y

(6) la PtPA no puede coagular una solución de fibrinógeno y, por lo tanto, no funciona como enzima de tipo trombina.

En resumen, estos resultados muestran que la coagulación inducida por la PtPA se debe a la activación de la protrombina; esa protrombina descarboxilada es convertida eficazmente en trombina por la PtPA; que los Factores Xa y Va no son necesarios para la activación de la protrombina por parte de PtPA; y que la PtPA no convierte el fibrinógeno en fibrina en estas condiciones.

Ejemplo 3d: Coagulación de plasma tratado con EDTA

Un pequeño, pero significativo, porcentaje de muestras (muestras de suero o de plasma de heparina de litio) recibidas para el análisis bioquímico está contaminado con EDTA. Por lo tanto, es importante determinar si los activadores de la protrombina fueron eficaces en la coagulación del plasma con EDTA y de la sangre entera con EDTA. Por lo tanto, este ejemplo se proporciona como el Ejemplo 5b a continuación, de modo que podría hacerse una comparación de los estudios de plasma con EDTA y de sangre entera con EDTA.

Ejemplo 3e: Coagulación de plasma citrado de participantes medicados con warfarina mediante activadores de la protrombina

La warfarina es un anticoagulante comúnmente usado, y por tanto, el fin de este experimento era determinar si la terapia con warfarina afecta a la capacidad de los activadores de la protrombina: ecarina; carinactivasa-1; carinactivasa-2; PtPA; OsPA; y notecarina, de coagular muestras de pacientes medicados con warfarina.

Se seleccionaron muestras de plasma de participantes con diferentes tiempos de coagulación (relacionados con la dosis de warfarina) basados en el INR (1,1-7,6), y se analizaron con los diferentes procoagulantes (activadores de la protrombina y trombina).

Los tubos Clotek contenían 100 µl de plasma con heparina de litio, 100 µl de tampón de Tris (Tris HCl 150 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), 50 µl de CaCl₂ 0,2 M, y 50 µl de cada procoagulante.

Los resultados se muestran en las Tablas 18 y 19. Como se usan en estas tablas y en otras partes, CA-1 es carinactivasa-1 y CA-2 es carinactivasa-2.

Tabla 18: Tiempos de coagulación (segundos) con plasma citrado recalcificado de pacientes medicados con warfarina, mediante activadores de la protrombina

[Activador de la protrombina] 30 nM	INR de la muestra						
	1,1	1,2	1,5	2,0	2,9	6,4	7,6
PtPA	5,0	5,7	6,7	6,1	7,0	9,8	10,5
OsPA	9,0	9,1	12,6	16,8	17,2	17,2	19,3
Notecarina	69,4	67,1	68,6	66,6	71,0	91,0	121
Ecarina	72,2	63,4	63,4	69,4	85,6	114	111
CA-1	231	198	232	229	>300	>300	>300
CA-2	115	103	115	109	149,2	242	240

Tabla 19: Tiempos de coagulación (segundos) con plasma citrado recalcificado de pacientes medicados con warfarina mediante PtPA y trombina

[Procoagulante] 30 nM	INR de la muestra					
	1,1	1,7	2,3	2,8	5,8	6,4
PtPA	7,4	8,1	8,1	8,3	11,1	13,3
Trombina	13,4	13,7	14,7	14,0	14,7	16,3

La warfarina conduce a una disminución de la síntesis normal de factor-X (FX) y protrombina a partir de sus precursores activos (factor-X descarboxilado y protrombina descarboxilada). La protrombina y la protrombina descarboxilada son los sustratos a los que se dirigen los activadores de la protrombina. La disminución de protrombina significa menos trombina generada por los activadores de la protrombina, de ahí los tiempos de coagulación prolongados observados. La propia trombina no fue inhibida por la warfarina, por tanto, los tiempos de coagulación con trombina no se ven afectados como se ha observado en este experimento. Los resultados en este experimento demostraron que la carinactivasa-1 fue el único activador de la protrombina incapaz de coagular muestras de plasma con INR $\geq 2,9$. Los resultados mostraron que PtPA y OsPA fueron los procoagulantes más eficaces para el plasma de pacientes que tomaban warfarina.

Ejemplo 3f: Coagulación de plasma deficiente en FV y deficiente en FX por activadores de la protrombina

Los preparados de activador de la protrombina se probaron para determinar su capacidad de coagulación del plasma deficiente en FV (n.º 0008466150) y plasma deficiente en FX (n.º 0008466350) disponibles en el mercado (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, EE. UU.) usando el analizador Clotek (Hyland, EE.UU.).

El tubo Clotek contenía 100 µl de plasma deficiente en FV o FX, 100 µl de tampón de Tris (Tris HCl 150 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), 50 µl de CaCl₂ 0,2 M y 50 µl de cada procoagulante. Todos los procoagulantes estaban a una concentración de 30 nM, y también se probó una muestra adicional que contenía carinactivasa-1 a una concentración de 100 nM.

Los resultados se muestran en la tabla 20.

Tabla 20: Tiempos de coagulación (segundos) de plasma deficiente en FV y en FX mediante preparados de activadores de la protrombina y trombina

[Procoagulante] 30 nM	Tiempo de coagulación (segundos)		
	Plasma citrado "agrupado" normal	Plasma deficiente en FV	Plasma deficiente en FX
Ecarina	66,8	74,8	77,5
CA-1	184	>300	>300
CA-1 (100nM)	ND	216	218
CA-2	133	159	159
OsPA	13,3	12,7	12,7
PtPA	9,0	7,4	7,6
Notecarina	47,5	>300	71,9
Trombina	13,8	44,6	50,2
"ND" significa que no se determinó.			

La notecarina no fue capaz de coagular el plasma deficiente en FV en 5 minutos, y su eficacia de coagulación también se redujo en ausencia de FX. Además, la actividad de coagulación de los activadores de la protrombina del grupo A y del grupo B también se redujo en ausencia de FV o FX. Los activadores de la protrombina del grupo C, PtPA y OsPA, fueron claramente los más eficaces en la coagulación del plasma y no necesitaron FV ni FX del plasma.

El tiempo de coagulación de la trombina aumentó significativamente, siendo más del triple de largo en los plasmas deficientes en FV y FX en comparación con el tiempo de coagulación para el plasma citrado "agrupado" normal.

Ejemplo 3g: Estimación de la cantidad de trombina generada por PtPA y OsPA en plasma citrado normal y heparinizado

Este experimento se diseñó para proporcionar una estimación de la cantidad de trombina que es generada por PtPA y OsPA usando diferentes concentraciones y en presencia de heparina.

Se obtuvo plasma citrado normal de un participante sano en una serie de tubos (con citrato de Greiner) que se centrifugaron de inmediato, y se agrupó el plasma citrado.

La trombina usada fue Trombina-JMI, Topical (Bovina) 5000USP (GenTrac Inc, King Pharmacia, Middleton, Wisconsin, EE. UU.). Las unidades USP son equivalentes a las UI, y una UI es igual a 9 nM. El sustrato de trombina usado fue S-2238 (se disolvieron 25 mg de solución madre de PM 626 Da en 15 ml, dando 2,67 mM (n.º 820324 Chromogexin IL Lexington MA, EE.UU.). La heparina usada fue de 5.000 UI/5 ml (1.000 UI/ml), heparina sódica, Pfizer, NZ. Para la heparina, se usaron 190,9 UI = 1 mg (Camenzind, *et al.* 1997); un PM de ~12000 Da para calcular las concentraciones molares. El tampón usado fue: tampón de Hepes 20 mM; NaCl 150 mM; pH 7,4; tensioactivo p20 al 0,05 %.

Para la incubación del plasma, los tubos contenían 0,5 ml plasma citrado, 50 µl de CaCl₂ 0,5 M, y 5-40 µl de trombina o un activador de la protrombina más 20 µl de heparina para proporcionar concentraciones de 860, 4.300 y 8.600 nM (2, 10) y 20 UI) o solución salina. Los tubos se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después de este período de 5 minutos, se anilló el coágulo usando dos palos aplicadores de madera, se retiró y se desechó.

Para los ensayos de la actividad de la trombina, cada cubeta espectrofotométrica contenía 930 µl de tampón, 50 µl de S-2238 y 20 µl del suero transparente que quedó tras retirar el coágulo de cada tubo en la incubación anterior. El cambio de absorbancia se controló a 405 nm durante 5 minutos.

La Figura 26 muestra las actividades de la trombina remanente en aquellos tubos a los que se habían añadido diferentes concentraciones de trombina. Para cada curva, se determinó la pendiente a los 275 segundos usando el intervalo de tiempo de 250-300 segundos, y estas pendientes junto con las concentraciones de trombina se usaron para desarrollar la curva patrón en formato logarítmico para proporcionar una relación lineal a una mayor concentración de trombina, como se muestra en las Figuras 26 y 27.

El plasma recalcificado (sin procoagulante) tardó ~37 minutos en coagularse a temperatura ambiente. Todas las muestras que contenían trombina presentaron coagulación latente. La concentración más baja de trombina fue la más lenta en presentar coagulación latente (~3 minutos). El tiempo hasta el coágulo latente fue disminuyendo a medida que aumentaba la concentración de trombina. Las muestras con concentraciones > 200 nM de trombina mostraron coagulación latente inmediatamente después de que se retirara el coágulo a medida que se iban

formando alícuotas de suero. En ocasiones, fue necesaria una segunda eliminación de los coágulos para garantizar que se obtuviera suficiente muestra del tubo para el análisis fotométrico.

Para las muestras que contienen diferentes concentraciones de los activadores de la protrombina PtPA y OsPA, pero sin heparina, los resultados fueron los siguientes. Los resultados espectrofotométricos para las muestras que contenían diferentes concentraciones de PtPA se muestran en la Figura 28, y para las muestras que contenían diferentes concentraciones de OsPA se muestran en la Figura 29.

A continuación, se representaron gráficamente las concentraciones de trombina generadas por PtPA frente a la pendiente a los 5 minutos, y los resultados se muestran en la Figura 30, y se representaron gráficamente las concentraciones de trombina generadas por OsPA frente a la pendiente a los 5 minutos, mostrándose los resultados en la Figura 31.

Se estimó la concentración de trombina generada por las diferentes concentraciones de PtPA y OsPA que permanecieron activas en el suero, y se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21: Estimación de la trombina activa presente en el suero generado por diferentes concentraciones de PtPA y OsPA determinadas a partir de la ecuación de regresión de la curva patrón, Figura 27.

[Activador de la protrombina] (nM)	Pendiente a los 5 minutos por segundo	Concentración estimada de trombina activa (nM)
PtPA		
1,2	0,00098	574
6,1	0,00171	869
12,3	0,00196	965
OsPA		
1,2	0,00094	554
6,1	0,00149	784
12,3	0,00195	961

Los resultados indicaron que se generaron cantidades muy significativas de trombina incluso con PtPA y OsPA 1,2 nM. Cantidades muy pequeñas de PtPA y OsPA fueron capaces de coagular por completo el plasma citrado normal recalificado en < 5 minutos. No se observó coagulación latente, lo que indica que la cantidad de trombina generada fue suficiente para catalizar por completo el fibrinógeno y prevenir la coagulación latente que equivaldría a suero de muy alta calidad.

Para las muestras que contienen diferentes concentraciones de heparina, los resultados fueron los siguientes.

En primer lugar, se determinó la concentración de trombina que queda en el componente del suero de la actividad de la trombina, PtPA y OsPA en presencia de heparina 4.300 nM (10 UI), y se muestra en la Figura 32 (el cambio en la A_{405} para la hidrólisis de S-2238/minuto en el eje y es proporcional a la concentración de trombina). La trombina 135 nM no coaguló por completo la muestra de plasma, observándose solo un coágulo inferior a 2-3 mm como "una pelusa". Las concentraciones de 6,1 nM de ambos activadores de la protrombina coagularon la muestra que contenía 4.300 nM (10 UI) de heparina en aproximadamente un minuto, y sin que se observara coagulación latente incluso después de 24 horas de almacenamiento a temperatura ambiente.

Entonces, se investigó si la reacción era de naturaleza similar con diferentes concentraciones de heparina. Se obtuvo plasma citrado agrupado normal del Laboratorio de Coagulación, Pathology Queensland, Hospital Princess Alexandra, porque no había suficiente plasma del participante normal. Los resultados se muestran en la Figura 33 (PtPA) y la Figura 34 (OsPA).

Se estimó la cantidad de trombina generada por las concentraciones de PtPA y OsPA de 1,5 nM que permanecieron activas en el suero, y se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22: Estimación de la trombina activa presente en el suero generado por 1,5 nM de PtPA y OsPA determinadas a partir de la ecuación de regresión de la curva patrón, Figura 27.

[Activador de protrombina] (nM)	Heparina nM (UI)/ml	Pendiente a los 5 minutos por segundo	Concentración estimada de trombina activa (nM)
PtPA			
1,5	0	0,0007	443
1,5	860 (2)	0,00018	159
1,5	4.300 (10)	0,00024	197

[Activador de la protrombina] (nM)	Heparina nM (UI)/ml	Pendiente a los 5 minutos por segundo	Concentración estimada de trombina activa (nM)
1,5	8.600 (20)	0,00024	197
OsPA			
1,5	0	0,0006	394
1,5	860 (2)	0,0002	172
1,5	4.300 (10)	0,00022	185
1,5	8.600 (20)	0,00020	172

Las muestras que contenían 860 y 4.300 nm (2 y 10 UI) de heparina se coagularon en dos minutos y no mostraron ninguna coagulación latente. El coágulo era sólido, pero no tan sólido como los observados en las muestras que no contenían heparina. La muestra que contenía heparina 860 nM (2 UI) dieron una actividad de trombina que fue aproximadamente el 25 % de la de las muestras de plasma sin heparina. Por el contrario, la muestra que contenía heparina 8.600 nM (20 UI) produjo un coágulo "gelatinoso" (más similar a los coágulos formados en las muestras que contenían trombina) en 3 minutos, la muestra presentó luego coagulación latente a los 5 minutos. En las figuras 33 y 34, se desconoce la razón de la forma de las curvas de progreso a concentraciones de heparina más altas.

Ejemplo 3h: Estimación de la cantidad de trombina generada por el tubo BD RST usando plasma citrado agrupado normal, y el efecto de la heparina

El fin de este experimento fue proporcionar una estimación de la cantidad de trombina generada y presente en la forma activa en el tubo BD RST lleno de diferentes volúmenes de plasma. Además, también se estudió el efecto de la heparina en la capacidad de coagulación de los tubos BD RST.

Se obtuvo plasma citrado agrupado normal (de < 24 horas) del Laboratorio de Coagulación, Pathology Queensland, Hospital Princess Alexandra.

Para la curva patrón, los tubos BD RST contenían 1, 2, 3 y 4 ml de plasma citrado y 50 µl de CaCl₂ 0,5 M. Se invirtieron los tubos 8-10 veces para mezclarlos, y se incubaron durante 5 minutos. Se anilló el coágulo usando dos palos aplicadores de madera, se retiró y se desechó.

La cubeta espectrofotométrica contenía 930 µl de tampón, 50 µl de S-2238 y 20 µl del suero transparente que quedó tras retirar el coágulo de cada tubo BD RST anterior. Se controló el cambio de absorbancia a 405 nM durante 5 minutos, y los resultados se muestran en la Figura 35. Se estimaron las concentraciones de trombina a partir de las pendientes usando la curva patrón de la Figura 16 y se representaron gráficamente frente a las pendientes de la Figura 35. Las concentraciones de trombina de los tubos BD RST originales las y las concentraciones de trombina remanentes en los sueros libres de coágulos de las cuatro muestras fueron las siguientes; 135 frente a 4,3; 67,5 frente a 1,4; 45 frente a 0,5; y 33,8 frente a 0,3 nM, respectivamente. Es probable que la mayor parte de la trombina se eliminara durante la retirada del coágulo, ya que se uniría a la fibrina del coágulo.

A diferencia de las muestras con trombina pura descritas en el Ejemplo 3g, cada muestra de cada uno de los tubos BD RST se coaguló en un minuto, y no se observó coagulación latente. Sin embargo, la resistencia del coágulo fue mucho más débil que la observada con PtPA u OsPA descritas en el Ejemplo 3g.

Para las muestras que contenían diferentes volúmenes de plasma citrado y diferentes concentraciones de heparina, se controló el cambio de absorbancia de cada muestra a 405 nM durante 5 minutos, y los resultados se muestran en la Figura 37. Se desconoce la razón de la forma de las curvas de progreso a concentraciones de heparina altas.

No hubo muestras que produjeran coagulación completa en presencia de ninguna de las tres concentraciones de heparina. El coágulo más resistente se observó con las muestras que contenían 830 nM (2 UI) de heparina y un ml de plasma, aunque el coágulo era suelto en comparación con los coágulos sólidos en ausencia de heparina. Los coágulos más débiles que se formaron fueron los del tubo relleno con 4 ml de plasma y que contenía 8.600 nM (20 UI) de heparina. El coágulo era de tipo "algodón de azúcar" y solo en parte de la muestra. Todos los tubos que contenían heparina mostraron cierta coagulación latente tras 5 minutos. La forma real de la curva con 4.300 y 8.600 nM (10 y 20 UI) de heparina fue muy similar a las curvas observadas con PtPA y OsPA.

Las pendientes y la estimación de la trombina activa en presencia de las diferentes concentraciones de heparina y las diferentes concentraciones de trombina se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23: Estimación de la trombina activa en presencia de diferentes concentraciones de heparina y diferentes concentraciones de trombina de tubos BD RST, usando la ecuación de regresión de la curva patrón de la Figura 36.

[Heparina] (UI) [nM]	[Trombina del BD RST] por ml (nM)	Pendiente	Estimación de [trombina del BDRST activa] (nM)	Proporción de reducción en presencia de heparina (columna 2/columna 4)
2 [830 nM]	135	0,00050	30	4,5
2 [830 nM]	33,8	0,00016	6	5,6
10 [2150 nM]	135	0,00050	30	4,5
10 [2150 nM]	33,8	0,00024	12	3,0
20 [8300 nM]	135	0,00042	25	5,4
20 [8300 nM]	33,8	0,00020	9	3,8

Los resultados mostraron que las mismas concentraciones nominales de trombina (en la columna 2) produjeron concentraciones de trombina activa similares en presencia de diferentes concentraciones de heparina. Las concentraciones de trombina que se midieron tras la coagulación fueron varias veces inferiores a las concentraciones nominales.

EJEMPLO 4: COAGULACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE ENTERA DE PARTICIPANTES SANOS MEDIANTE ACTIVADORES DE LA PROTROMBINA

Ejemplo 4a: Coagulación mediante ecarina

Para este experimento, la ecarina, purificada del veneno de *Echis carinatus*, se adquirió en Sigma (número de catálogo EO 504-1 VL; número de lote 128K 1536). La sangre citrada (grupo de tres muestras con perfiles de coagulación normales) se obtuvieron del Pathology Queensland, Hospital Princess Alexandra, Queensland, Australia.

Se reconstituyó un vial de ecarina (50 unidades) en 100 de H₂O, dando lugar a una concentración madre de 500 unidades/ml. En los ensayos TEG, se usaron diluciones de esta solución madre en agua destilada (1:100, es decir, 5 unidades/ml; 1:1.000, es decir, 0,5 unidades/ml; 1:10.000, es decir, 0,05 unidades/ml). Cada mezcla de ensayo consistió en 310 µl de sangre citrada, 20 µl de CaCl₂ 0,2 M, y 10 µl de solución salina (control) o dilución de ecarina. Por lo tanto, el intervalo de concentración de ecarina en la mezcla de ensayo fue de 0 a 0,15 unidades/ml. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Los resultados se muestran en la tabla 24.

Tabla 24: Resultados de TEG para la coagulación de muestras de sangre citrada recalcificada con ecarina

Ecarina (unidades/ml)	R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
control	6,95	26,45	52,65	65,60
0,0015	7,3	27,60	59,80	65,65
0,015	4,5	17,90	74,15	67,25
0,15	2,1	15,75	69,25	73,80

La adición de ecarina a sangre citrada recalcificada produjo una reducción dependiente de la concentración tanto en el tiempo R como en TAM, y un pequeño aumento en la AM. A la mayor concentración analizada, 0,15 unidades/ml, la ecarina redujo el tiempo R de 6,95 a 2,1 minutos, y TAM, de 26,45 a 15,75 minutos. La concentración más baja de ecarina analizada, 0,0015 unidades/ml, no tuvo ningún efecto significativo sobre el tiempo de coagulación y la resistencia del coágulo, mientras que la ecarina a una concentración de 0,015 unidades/ml tuvo un efecto intermedio.

Estos resultados sugieren que la ecarina también sería un activador de la protrombina eficaz para producir rápidamente suero para mediciones de analitos en un laboratorio clínico.

Ejemplo 4b: Coagulación de sangre citrada recalcificada normal "agrupada" por seis activadores de la protrombina

Se usaron preparados purificados de ecarina, carinactivasa-1, carinactivasa-2, PtPA, OsPA y notecarina realizados como se describe en el Ejemplo 1. Se estudió la coagulación de sangre citrada agrupada normal (como en el Ejemplo 4a) producida por los seis activadores de la protrombina, por la trombina, y en los tubos BD RST mediante TEG, como se describe en el Ejemplo 4a.

Los resultados se proporcionan en la tabla 25.

Tabla 25: Estudio de coagulación TEG con sangre citrada recalcificada normal "agrupada" con los diferentes procoagulantes.

Procoagulante (nM)	R (min)	AM (mm)	TAM (min)
Ecarina			
32	1,2	60,5	18,2
9	2,2	61,6	20,1
3,2	3,4	59,0	21,6
0,9	6,5	59,5	29,7
Carinactivasa-1			
50	3,3	69,1	21,7
32	4,6	68,5	27,1
9	6,2	63,9	31,4
3,2	7,4	64,9	30,3
Carinactivasa-2			
50	1,8	64,9	19,9
32	2,1	68,2	20,0
9	3,3	67,8	19,7
3,2	4,6	68,0	23,6
OsPA			
0,9	0,7	63,7	18,4
0,09	2,9	61,8	20,5
0,009	4,2	63,5	22,5
0,0009	6,2	59,3	24,8
PtPA			
0,9	1,5	62,4	22,1
0,09	2,6	63,1	23,6
0,009	3,9	63,9	24,8
0,0009	5,8	53,4	28,1
Notecarina			
3,2	1,2	62,1	20,2
0,9	1,8	63,7	18,3
0,09	3,7	63,2	20,3
0,009	7,3	59,0	26,3
Trombina			
32	2,3	65,2	22,8
9	3,5	64,0	23,8
3,2	5,5	62,4	27,6
BD RST			
24	0,8	54,8	24,8
6	1,5	59,3	23,7

Estos resultados proporcionaron un apoyo adicional a los hallazgos de coagulación del plasma (Ejemplo 3) de que todos los activadores de la protrombina coagular la sangre muy eficazmente; y de que los activadores de la protrombina del grupo C (PtPA y OsPA) fueron los más eficaces en la coagulación de la sangre entera citrada recalcificada normal "agrupada". Por ejemplo, PtPA y OsPA 9 pM lograron tiempos R de aproximadamente 5 minutos, y la resistencia máxima del coágulo según lo confirmado por los resultados de AM. El siguiente activador de la protrombina más eficaz fue la notecarina, el activador de la protrombina del grupo D, que fue capaz de producir un tiempo R de 5 minutos y la máxima resistencia de los coágulos con una concentración mínima de entre 0,09 y 0,009 nM. Aunque la propia notecarina no contenía FVa, el FV presente en el plasma es convertido en forma activa por la pequeña cantidad de trombina formada por el FXa de la notecarina. El siguiente activador de la protrombina más eficaz fue la ecarina, el activador de la protrombina del grupo A, que fue capaz de alcanzar el tiempo R deseado y la máxima resistencia de los coágulos con una concentración mínima de entre 0,9 y 3,2 nM. Los activadores de la protrombina menos eficaces fueron los activadores de la protrombina del grupo B, la carinactivasa-1 y la

carinactivasa-2, que necesitaron concentraciones entre ≥ 9 y ≥ 3 nM, respectivamente, para lograr tiempos R < 5 minutos y la máxima resistencia de los coágulos. La concentración mínima requerida de trombina para lograr el tiempo R deseado y la máxima concentración de los coágulos resultó ser ≥ 3 nM.

5 Ejemplo 4c: Comparación de tubos de suero disponibles en el mercado y tubos que contenían PtPA

Se extrajo sangre de un participante sano secuencialmente en los siguientes tubos usando una aguja de mariposa en línea:

- 10 (1) un tubo Vacuette™ de Greiner sin aditivos de 4,0 ml;
- (3) tubo de suero Vacuette™ de Greiner;
- (4) tubo de suero Vacutainer™ de BD;
- 15 (5) tubo de suero de Sarstedt;
- (6) tubo RT de Terumo; y
- 20 (7) tubo sencillo de Terumo.

Se llenaron los tubos de sangre recién extraída hasta la marca de llenado requerida y se mezclaron inmediatamente durante 30 segundos por inversión suave de 8 a 10 veces. Luego, se transfirió una muestra de 340 μ l a una cubeta de TEG para su análisis inmediato. Este método de extracción de sangre permitió la transferencia rápida de una muestra de sangre para el análisis TEG inmediatamente después de la mezcla en el tubo disponible en el mercado para que no fuera necesario ningún anticoagulante ni la recalcificación en el análisis TEG. Se transfirió una alícuota, 330 μ l de la sangre del tubo sencillo (1) inmediatamente a una cubeta de TEG y se añadieron 10 μ l (1,41 μ g) de PtPA (2), y se inició de inmediato el análisis.

30 Todos los ensayos TEG se realizaron por duplicado. En la siguiente Tabla 26, se muestran los parámetros de TEG (la media de las muestras duplicadas).

Tabla 26: Resultados TEG para la sangre de un participante sano en diferentes tubos

Muestra	R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
(1) Tubo sencillo	14,3	46,5	26,9	49,8
(2) PtPA	0,8	12,2	70,8	54,9
(3) Greiner	3,0	23,5	71,2	68,2
(4) suero de BD	4,9	25,3	71,0	68,1
(5) Sarstedt	5,1	23,8	70,8	69,1
(6) RT de Terumo	9,6	22,5	63,2	58,1
(7) Terumo	13,4	31,2	38,2	54,6

35 Los parámetros TEG de la Tabla 26 se muestran en el gráfico TEG de la Figura 38, en la que: el rastro A representa el tubo de plástico sencillo (1); el rastro B representa el tubo sencillo con PtPA (2) añadido; el rastro C representa el tubo de suero de Greiner (3); el rastro D representa el tubo de suero de BD (4); el rastro E representa el tubo de suero de Sarstedt (5); el rastro F representa el tubo RT de Terumo (6); y el rastro G representa el tubo de suero de Terumo (7).

40 La muestra de sangre del tubo de PtPA (2) se coaguló más rápidamente (tiempo R = 0,8 minutos) en la cubeta de TEG. Los tiempos R para los tubos comerciales (3)-(7) variaron de 3,0 minutos para el tubo de Greiner (3) a 13,4 minutos para el tubo de Terumo (7). Estos tiempos R se pueden comparar con el tiempo R de 14,3 minutos para el tubo sencillo (1). Se cree que las diferencias en los tiempos R entre los tubos comerciales reflejan la presencia de diferentes procoagulantes y aditivos, y/o diferentes cantidades de procoagulantes o aditivos en estos tubos.

50 También se observó a simple vista la formación de coágulos en todos los tubos. Los tubos disponibles en el mercado se dejaron coagular durante el tiempo convencional de 30 minutos. La muestra de PtPA se dejó reposar durante 5 minutos. Se examinaron los tubos visualmente para determinar la formación de coágulos antes de cargarlos en la centrifugadora. Todos los tubos se centrifugaron a 3.000 g durante 10 minutos a 20 °C. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente, ~21 °C durante un máximo de 6 horas y se examinaron en intervalos de una

hora para determinar la formación latente de coágulos. Todos los tubos, incluyendo el tubo que contenía PtPA formaron coágulos sólidos, formando el tubo que contenía PtPA un coágulo inmóvil sólido en 2 minutos. No se observó coagulación latente en ninguno de los tubos hasta 6 horas después de la extracción.

- 5 Este ejemplo muestra que la inclusión de una pequeña cantidad de PtPA condujo a una coagulación más rápida que en cualquiera de los tubos comerciales probados, lo que demuestra el potencial de producción rápida de suero para proporcionar un tiempo de respuesta más rápido para las mediciones de analitos en un laboratorio clínico.

Ejemplo 4d: Coagulación de sangre citrada normal por PtPA, OsPA, ecarina y algunos tubos comerciales

- 10 El fin de este experimento era investigar tres activadores de la protrombina: PtPA, OsPA y ecarina en comparación con tres tubos de coagulación comerciales usados rutinariamente: suero Greiner, BD SST II y BD RST.

Se extrajo sangre de un participante sano en un tubo que contenía citrato.

- 15 Para los activadores de la protrombina, se añadieron 30 µl de activador (concentración de PtPA y OsPA de 0,56 nM; ecarina 5,3 nM en la cubeta de TEG), 20 µl de CaCl₂ 0,2 M y 290 µl de sangre citrada a la cubeta de TEG.

- 20 Para los tubos de suero comerciales, se añadió 1 ml de agua destilada y se dejó mezclar en un rodillo durante ~2 horas para disolver el contenido del tubo. El BD RST contenía trombina bovina 135 nM (33,8 nM/ml de sangre), mientras que la concentración usada en este experimento en la cubeta de TEG fue de 53 nM/ml. Para los tubos de suero comerciales, se añadieron 45 µl del contenido disuelto, 20 µl de CaCl₂ 0,2 M y 275 µl de sangre citrada a la cubeta de TEG.

- 25 Los resultados se muestran en la tabla 27.

Tabla 27: Datos TEG con PtPA, OsPA, ecarina, y tubos de suero comerciales usados rutinariamente con sangre nativa de un participante sano.

Tubo	N.º de catálogo del tubo	Tiempo R (min)	AM	TAM
Suero Vacuette de Greiner	455078	2,8	62,5	20,6
BD SST II	367958	4,3	62,8	23,5
BD RST (18 nM)	368771	0,5	58,8	20,2
PtPA (0,53 nM)		1,4	65,6	19,8
OsPA (0,53 nM)		1,5	64,0	19,7
Ecarina (5,3 nM)		2,6	64,3	19,3
Sangre nativa (tubo sencillo)		6,4	67,6	27,8

- 30 Los resultados demostraron que los tubos de suero comerciales usados de forma rutinaria varían en el tiempo en el que se detectó la formación de coágulo por el TEG (tiempo R), variando el tiempo de 0,5 a 6,4 minutos para la sangre citrada recalcificada de un participante sano. Los fabricantes de estos tubos recomiendan un tiempo de coagulación mínimo de 30 minutos antes de la centrifugación de los tubos de suero. Los resultados también demostraron que PtPA y OsPA a 0,5 nM dieron un tiempo R de < 2 minutos con una resistencia de los coágulos equivalente, que los hace muy adecuados para la evaluación como procoagulante para su uso en la producción de suero rápidamente.

EJEMPLO 5: COAGULACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE ENTERA QUE CONTIENE ANTICOAGULANTES POR ACTIVADORES DE LA PROTROMBINA

- 40 Se toman muchas muestras de sangre de pacientes tratados con anticoagulantes tales como la heparina, la warfarina y el citrato. Además, se recogen algunas muestras de sangre en tubos que contienen anticoagulantes tales como EDTA y citrato; o se contaminan con anticoagulantes durante el proceso de extracción. Los siguientes experimentos se realizaron para estudiar la coagulación de muestras de sangre que contenían anticoagulantes mediante activadores de la protrombina.

Ejemplo 5a: Coagulación dependiente de la concentración de sangre tratada con citrato o EDTA de un participante sano

- 50 Se realizó el análisis TEG, en el que cada mezcla de ensayo TEG consistía en 310 µl de sangra tratada con citrato o EDTA, 20 µl de CaCl₂ (0,2 M) y 10 µl de solución salina o solución de activador de la protrombina en un intervalo de concentraciones (soluciones madre - PtPA, 4,8 mg/ml, o OsPA, 2,0 mg/ml). Los resultados se muestran en la Figura 39 y en las Tablas 28 y 29 para la PtPA, y en las Tablas 30 y 31 para OsPA.

Tabla 28: Resultados de TEG para la coagulación de sangre citrada normal con PtPA

PtPA (µg/ml)	R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
0	10,9	40,4	23,8	55,2
0,00141	10,3	39,6	26,2	44,0
0,0141	4,6	22,8	54,0	67,2
0,141	3,8	23,5	67,7	67,0
1,41	1,0	21,2	72,4	64,8
14,1	0,3	20,2	74,7	59,7

Tabla 29: Resultados de TEG para la coagulación de sangre tratada con EDTA recalcificada con PtPA

PtPA (µg/ml)	R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
0	9,8	39,2	25,8	54,6
0,00141	9,1	31,5	34,9	60,9
0,0141	6,8	27,0	62,4	64,4
0,141	5,5	25,3	62,0	64,4
1,41	1,3	19,8	72,1	66,3
14,1	0,3	21,2	70,1	60,9

5

Tabla 30: Resultados de TEG para la coagulación de sangre citrada normal con OsPA

OsPA (µg/ml)	R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
0	9,0	31,3	29,5	55,0
0,000588	9,0	24,0	34,2	49,0
0,00588	5,9	21,3	54,3	62,0
0,0588	2,8	15,3	65,9	54,8
0,588	0,8	17,9	73,6	64,2
5,88	0,3	19,8	72,3	58,2

Tabla 31: Resultados de TEG para la coagulación de sangre tratada con EDTA recalcificada con OsPA

OsPA (µg/ml)	R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
0	13,9	40,8	31,2	50,7
0,000588	16,3	45,4	29,8	53,7
0,00588	9,8	30,0	36,2	62,4
0,0588	3,3	18,3	64,3	70,7
0,588	0,8	17,0	73,1	64,0
5,88	0,3	20,8	77,0	61,1

El tiempo R de la sangre recalcificada sin adición de un activador de la protrombina fue de aproximadamente 10 minutos, disminuyendo hasta 1 minuto o 1,3 minutos en presencia de 1,41 µg/ml de PtPA (Tablas 28 y 29). La velocidad de coagulación fue alta (ángulo = 54-72 °) (entre 0,0141 y 1,41), y se obtuvieron coágulos totalmente resistentes con valores de AM de 60-70 mm. El tiempo R de la sangre recalcificada sin adición de un activador de la protrombina de aproximadamente 10 minutos disminuyó hasta 0,8 minutos en presencia de 0,59 µg/ml de OsPA (Tablas 30 y 31).

Se cree que los tiempos R muy cortos y el gran α observados en la adición de PtPA u OsPA pueden explicarse por la generación de un estallido masivo de trombina, mientras que las reacciones cadena abajo (conversión de fibrinógeno en fibrina, activación del factor XIII, reticulación de monómeros de fibrina) son limitantes de la velocidad y dan lugar a una mejora comparativamente menor del TAM.

Los resultados de TEG de las Tablas 28, 28, 30 y 31 se muestran en la Figura 39, en la que el gráfico TEG A muestra los resultados de la Tabla 28 (sangre citrada y PtPA); el gráfico TEG B muestra los resultados de la Tabla 29 (sangre tratada con EDTA y PtPA); el gráfico TEG C muestra los resultados de la Tabla 30 (sangre citrada y OsPA) y el gráfico TEG D muestra los resultados de la Tabla 31 (sangre tratada con EDTA y OsPA).

En la Figura 39, los rastros marcados con A de cada gráfico TEG representan 14,1 µg/ml para PtPA y 5,88 µg/ml para OsPA; los rastros marcados con B representan 1,41 µg/ml para PtPA y 0,588 µg/ml para OsPA; los rastros marcados con C representan 0,141 µg/ml para PtPA y 0,0588 µg/ml para OsPA; los rastros marcados con D

representan 0,0141 µg/ml para PtPA y 0,00588 µg/ml para OsPA; los rastros marcados con E representan 0,00141 µg/ml para PtPA y 0,000588 µg/ml para OsPA; y los rastros marcados con F representan 0 µg/ml para PtPA y 0 µg/ml para OsPA.

- 5 En resumen, tanto PtPA como OsPA coagulan sangre tratada con EDTA y citrada recalcificada de forma dependiente de la concentración altamente eficaz. Por lo tanto, en la práctica, la sangre recogida en un tubo de EDTA podría coagularse rápidamente para producir suero mediante la adición de PtPA u OsPA para análisis bioquímicos y otros análisis de laboratorio.

10 Ejemplo 5b: Coagulación de plasma y sangre con EDTA obtenida de un participante sano

Como se ha mencionado en el Ejemplo 3d anterior, un pequeño, pero significativo, porcentaje de muestras (muestras de suero o de plasma de heparina de litio) recibidas para el análisis bioquímico está contaminado con EDTA. Por lo tanto, es importante determinar si los activadores de la protrombina son eficaces en la coagulación del plasma con EDTA y de la sangre entera con EDTA. El fin de este experimento era hacerlo, y hacer una comparación de plasma tratado con EDTA y sangre entera tratada con EDTA.

- 15 Se extrajo sangre de un paciente sano en un tubo de EDTA Greiner que contenía 1,8 mg/ml (6,2 mmol) de EDTA cuando se llenó hasta la marca de llenado. A esta concentración, el EDTA puede unirse a todos los iones metálicos (incluyendo Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , y Cu^{2+}) presente en el tubo. Para obtener plasma con EDTA, se centrifugó una parte de cada muestra bajo protocolos convencionales.

El tubo Clotek contenía 100 µl de plasma con EDTA, 100 µl de tampón de Tris (Tris HCl 150 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), 50 µl de CaCl_2 0,2 M o tampón Tris y 50 µl de cada procoagulante.

- 25 La cubeta de TEG contenía 20 µl de CaCl_2 0,2 M o solución salina, 60 µl de procoagulante y 260 µl de sangre con EDTA.

- 30 Para el experimento en BD RST, se disolvió el contenido de dos tubos con 1 y 4 ml de agua destilada respectivamente, se mezcló durante 5 minutos, y 60 µl del contenido usado en la cubeta de TEG como procoagulante.

Los resultados del estudio de coagulación plasmática se muestran en la Tabla 32 y en la Tabla 33.

- 35 Tabla 32: Tiempos de coagulación para el plasma con EDTA obtenido de un participante sano con diferentes procoagulantes (activadores de la protrombina y trombina) a diferentes concentraciones, con calcio.

[Procoagulante] (nM)	Con Ca^{2+} (segundos)						
	Ecarina	CA-1	CA-2	PtPA	OsPA	Notecarina	Trombina
50	68,9	165,4	82,5	6,5	10,0	85,5	12,7
10	127	232	101	13,5	15,8	117	43,0
1	224	>300	151	35,7	42,7	206	>300
0,1	ND	ND	ND	98,6	123	ND	>300
"ND" significa que no se determinó.							

Tabla 33: Tiempos de coagulación para el plasma con EDTA obtenido de un participante sano con diferentes procoagulantes (activadores de la protrombina y trombina) a diferentes concentraciones, sin calcio.

[Procoagulante] (nM)	Sin Ca^{2+} (segundos)						
	Ecarina	CA-1	CA-2	PtPA	OsPA	Notecarina	Trombina
50	>300	>300	>300	31,7	56,4	132	17,9
10	>300			48,7	68,2	242	53,2
1	>300			86,4	107	>300	>300
0,1				190	251		>300

40

Los resultados del estudio de coagulación del plasma BD RST se muestran en la Tabla 34.

Tabla 34: Tiempos de coagulación para los tubos BD RST, con y sin calcio.

Tubo BDRST (nM)	Con Ca^{2+} (segundos)	Sin Ca^{2+} (segundos)
1 ml (23)	12,3	44,9
2 ml (6)	34,3	101

El EDTA es un quelante de metales que quela el calcio y, a su vez, impide que ocurra el proceso de coagulación normal.

Estos resultados muestran que los activadores de la protrombina dependientes del calcio carinactivasa-1 (CA-1) y carinactivasa- 2 (CA-2) no coagularon plasma con EDTA, ni siquiera a una concentración de 50 nM en el tiempo previamente necesario de < 5 minutos, aunque pudieron alterar la recalcificación. El efecto sobre la ecarina fue significativo: sin recalcificación, el tiempo de coagulación fue superior a 5 minutos. La adición de calcio en exceso causó solo una disminución moderada en el tiempo de coagulación con PtPA y OsPA (por ejemplo, PtPA a 0,1 nM, 190 segundos a 98,6 segundos). Aunque otros ejemplos descritos en el presente documento han sugerido que la notecarina es menos eficaz como procoagulante que PtPA y OsPA, los resultados mostraron que fue el activador de la protrombina menos afectado por la ausencia de calcio. La adición de calcio en exceso causó un aumento del triple en la coagulación del plasma con trombina.

Los resultados del estudio de coagulación de sangre entera se muestran en la Tabla 35.

Tabla 35: Resultados de TEG que muestran el efecto de diferentes procoagulantes en sangre tratada con EDTA con y sin la presencia de calcio.

Procoagulante (nM)	R (min)	AM (mm)	TAM (min)
Ecarina			
53 (recalcificada)	2,5	56,8	22,1
53 (no recalcificada)	16,9*	ND	ND
Carinactivasa-1			
53 (recalcificada)	4,8	57,6	29,5
53 (no recalcificada)	16,9*	ND	ND
Carinactivasa-2			
53 (recalcificada)	2,6	55,7	25,6
53 (no recalcificada)	34,8*	ND	ND
OsPA			
53 (recalcificada)	1,6	41,5	21,6
53 (no recalcificada)	17,7*	ND	ND
PtPA			
53 (recalcificada)	0,5	58,2	22,9
53 (no recalcificada)	17,8*	ND	ND
1 (recalcificada)	1,6	64,0	22,9
PtPA			
690 nM (Ciclo 1) (no recalcificada)	50,1*	ND	ND
690 nM (Ciclo 2) (no recalcificada)	50,3*	ND	ND
Notecarina			
53 (recalcificada)	1,9	54,2	25,8
53 (no recalcificada)	17,2*	ND	ND
Trombina			
53 (recalcificada)	2,6	49,9	31,5
53 (no recalcificada)	45,4*	ND	ND
BD RST			
23 (recalcificada)	1,6	45,4	24,0
23 (recalcificada)	1,8	57,7	28,3
6 (recalcificada)	30,1*	ND	ND
6 (recalcificada)	32,5*	ND	ND
Solo sangre con EDTA recalcificada			
Ciclo 1	11,2	58,5	40,8
Ciclo 2	10,6	56,7	38,5
* significa que la medición se detuvo; y ND significa que no se determinó.			

Este experimento mostró que la sangre entera con EDTA presenta un desafío difícil para los procoagulantes. A diferencia del plasma con EDTA, ninguno de los procoagulantes fue capaz de coagular sangre con EDTA en ausencia de recalcificación. La coagulación no se logró ni siquiera con una concentración muy alta de PtPA (690 nM). Sin embargo, todos los procoagulantes fueron capaces de coagular la sangre con EDTA cuando se volvió a calcificar. Se logró una coagulación rápida y completa incluso con una concentración muy baja de PtPA (1 nM). El EDTA es el anticoagulante escogido para preservar la morfología celular y, al quelar el calcio, el EDTA también previene la activación plaquetaria y la aglomeración de las plaquetas.

Se realizaron dos experimentos de coagulación de plasma adicionales usando PtPA 30 nM. En el primero, se añadió agua al tubo Clotek en lugar de tampón Tris, y la muestra se siguió coagulando en 6,4 segundos. En el segundo, no se usó tampón, solo 200 µl de EDTA más 50 µl de PtPA, y el tiempo de coagulación fue de 5,4 segundos. Para el estudio TEG, se añadieron las siguientes soluciones a una cubeta de TEG: 50 µl de tampón Tris, 60 µl de PtPA, 230 µl de sangre con EDTA, y se siguió sin observar coagulación. Además, se llenó un tubo BD RST hasta la marca de llenado con sangre con EDTA y, tras 60 minutos, mostró una coagulación muy parcial. Es evidente, a partir de estos experimentos, que siempre que pueda haber EDTA, se debe considerar la adición de calcio con el procoagulante para lograr la coagulación.

Ejemplo 5c: Coagulación de sangre de participantes tratados con warfarina

Se determinó el efecto de PtPA y OspA sobre la coagulación de muestras de sangre de dos participantes ("W1" y "W2") tratados con warfarina.

Los parámetros de coagulación de cada participante, determinados mediante protocolos de coagulación convencionales, se muestran en la Tabla 36, en la que:

TTPa = tiempo de la tromboplastina parcial activada;

TP = tiempo de la protrombina;

INR = índice normalizado internacional; y

Fib-D = fibrinógeno derivado del tiempo de la protrombina.

Tabla 36: Parámetros de coagulación para los participantes en tratamiento con anticoagulante

Participante	TTPa (s)	TP (s)	INR	Fib-D (g/l)
W1	30,27	21,3	2,08	1,55
W2	36,15	27,4	2,61	5,20
Plasma normal	30-32	10-11	1,0	2,5-4,0

Los resultados de la Tabla 36 confirman que la sangre de los participantes W1 y W2 se anticoaguló como se esperaba.

Entonces, se realizó un análisis TEG. Cada mezcla de ensayo TEG consistió en 310 µl de sangre citrada, 20 µl de CaCl₂ (0,2 M) y 10 µl de solución salina o solución de activador de la protrombina (PtPA u OsPA), dando lugar a concentraciones de ensayo finales de activador de la protrombina de entre 0 y 14,1 µg/ml.

Los resultados de ensayo TEG se muestran en las siguientes Tablas 37, 38 y 39. Los valores de las mismas se derivan de los datos del ensayo TEG mostrados en las Figuras 40 y 41.

Tabla 37: Resultados del ensayo TEG para la coagulación de sangre citrada de W1 con OsPA

OsPA (µg/ml)	R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
0	12,2	35,5	23,6	50,4
0,0588	4,4	22,9	68,1	59,5
0,588	1,6	16,7	73,8	60,8
5,88	0,6	17,8	67,5	53,0

Tabla 38: Resultados del ensayo TEG para la coagulación de sangre citrada de W1 con PtPA

PtPA (µg/ml)	R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
0	12,2	35,5	23,6	50,4
0,0141	9,4	31,5	48,4	54,3

PtPA (µg/ml)	R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
1,41	0,8	18,8	69,7	59,6
14,1	0,4	20,6	65,1	53,1

Tabla 39: Resultados del ensayo TEG para la coagulación de sangre citrada de W2 con PtPA

PtPA (µg/ml)	R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
0	12,3	37,6	49,1	60,8
0,0141	7,7	26,1	62,9	66,4
1,41	1,3	17,9	77,7	73,3
14,1	0,4	18,4	79,6	69,4

En la Figura 40, se proporcionan gráficos de TEG de los resultados de las Tablas 37 y 38, en la que el gráfico TEG A muestra los resultados de la Tabla 37 (OsPA) y el gráfico TEG B muestra los resultados de la Tabla 38 (PtPA). En la Figura 40, para el gráfico A, el rastro marcado con (i) muestra los resultados para 5,88 µg/ml de OsPA, el rastro marcado con (ii), para 0,588 µg/ml de OsPA, el rastro marcado con (iii), para 0,0588 µg/ml de OsPA, y el rastro marcado con (iv), para 0 µg/ml. En la Figura 40, para el gráfico B, el rastro marcado con (i) muestra los resultados para 14,1 µg/ml de PtPA, el rastro marcado con (ii), para 1,41 µg/ml de PtPA, el rastro marcado con (iii), para 0,0141 µg/ml de PtPA, y el rastro marcado con (iv), para 0 µg/ml.

En la Figura 41, el rastro marcado con (i) muestra los resultados para 14,1 µg/ml de PtPA, el rastro marcado con (ii), para 1,41 µg/ml de PtPA, el rastro marcado con (iii), para 0,0141 µg/ml de PtPA, y el rastro marcado con (iv), para 0 µg/ml.

En resumen, tanto PtPA como OsPA a bajas concentraciones coagularon rápidamente muestras de sangre de participantes en tratamiento con warfarina, con tiempos R, valores α y valores de AM similares a los de experimentos comparables con sangre de un participante sano (véanse las Tablas 28-31 anteriores). Estos resultados confirman la observación sobre el plasma con warfarina en el Ejemplo 3c.

Ejemplo 5d: Coagulación de sangre de un participante heparinizado a dosis altas con PtPA y OsPA

Se extrajo sangre de un participante ("H1") que había recibido 35.000 UI de heparina 30 minutos antes de la extracción de la muestra de sangre. La concentración de heparina se calculó en aproximadamente 7 UI/ml de sangre. La sangre se recogió en una jeringa sencilla y luego se transfirió a un tubo de citrato Vacuette™ de Greiner.

Se midieron los parámetros de coagulación del participante, y se muestran en la Tabla 40.

Tabla 40: Parámetros de coagulación para el participante heparinizado.

Participante	TTPa (s)	TP (s)	INR	TT (s)	PTNH (s)	REPT (s)	Fib-D (g/l)
H1	fallido	41,2	3,75	fallido	17,75	15,28	2,40

Todos los parámetros de coagulación de la Tabla 40 son conocidos en la técnica, siendo: TTPa = tiempos de la tromboplastina parcial activada; TP = tiempo de la protrombina; INR = índice normalizado internacional; TT = tiempo de la trombina; PTHN = tiempo del sulfato de protamina; REPT = tiempo de repitelización; Fib-D = fibrinógeno derivado del tiempo de la protrombina.

Los resultados de la Tabla 40 están en el intervalo de los resultados esperados para una muestra fuertemente heparinizada.

Entonces, se realizó un análisis TEG. Cada mezcla de ensayo TEG consistió en 310 µl de sangre citrada, 20 µl de CaCl₂ (0,2 M) y 10 µl de solución salina o solución de activador de la protrombina (PA).

Los resultados del ensayo TEG se muestran en la siguiente Tabla 41 y en la Figura 42.

Tabla 41: Resultados del ensayo TEG para la coagulación de sangre de un participante que recibe dosis muy altas de heparina.

PA	Concentración de PA (µg/ml)	Con citrato			
		R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
	0	n. c.	n. c.	n. c.	n. c.
PtPA	14,1	0,4	20,9	72,6	64,3

PA	Concentración de PA (µg/ml)	Con citrato			
		R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
OsPA	5,9	1,3	12,8	70,6	61,3

En la Tabla 41 anterior, "n. c." indica que no hay coagulación.

Los rastros TEG de los resultados de las Tablas 41 se proporcionan en la Figura 42, en la que el rastro marcado con A muestra los resultados para cuando no hay activador de la protrombina; el rastro marcado con B muestra los resultados para 14,1 µg/ml de PtPA; el rastro marcado con C muestra los resultados para 5,9 µg/ml de OsPA.

A la concentración probada, tanto PtPA como OsPA pudieron coagular sangre citrada del participante heparinizado rápidamente. Los valores para los parámetros TEG controlados (tiempo R, TAM, ángulo, AM) fueron comparables a los resultados obtenidos de sangre de un participante sano, lo que indica que la actividad de los activadores de la protrombina no fue inhibida por la concentración de heparina presente en la muestra de sangre.

Ejemplo 5e: Coagulación de sangre de un participante completamente heparinizado con un tubo que contenía PtPA y un tubo BD RST

Se extrajo una muestra de sangre de 10 ml de un participante sometido a cirugía cardíaca que había recibido 38.000 UI de heparina 30 minutos antes de la extracción de muestras. La sangre se extrajo en una jeringa sencilla y en 10 minutos se entregó al laboratorio para su análisis.

El tubo BD RST se llenó hasta la marca de llenado, se invirtió/mezcló durante 30 segundos, y se transfirieron 340 µl de esta sangre a una cubeta de TEG en el canal 1.

Se añadieron 330 µl de la muestra de sangre del participante heparinizado original a 10 µl de PtPA (concentración final de 1,41 µg/ml) en una cubeta de TEG en el canal 2.

Los resultados del ensayo TEG se muestran en la Tabla 42 y en la Figura 43.

Tabla 42: Resultados del análisis TEG para la sangre heparinizada en tubo BD RST y con PtPA

Muestra	R (min)	K (min)	Ángulo (grados)	AM (mm)	TAM (min)
PtPA (rastro exterior)	0,7	1,3	74,4	43,8	9,8
Tubo BD RST (rastro interior)	6,2	N/A	7,8	11,5	24,0

Para el tubo BD RST, el tiempo R fue de 6,2 minutos con un valor de amplitud máxima (AM) de 11,5 mm, lo que indica que solo se logró la coagulación parcial. Esta resistencia del coágulo no aumentó más durante el período de 2 horas del análisis.

Con PtPA, el tiempo R fue de 0,7 minutos, la amplitud máxima (AM) fue de 43,8 mm y el tiempo hasta la amplitud máxima fue de 9,8 minutos, lo que indica que se logró rápidamente un coágulo fuerte y estable.

Los resultados de la Tabla 42 se muestran también en la Figura 43 como una gráfico TEG, en el que el rastro "A" es el rastro de la cubeta de TEG en el canal 2 (PtPA) y el rastro "B" es el rastro de la cubeta de TEG en el canal 1 (tubo BD RST).

La sangre extraída en la jeringa sencilla, y la sangre del tubo BD RST también se controlaron visualmente para determinar la coagulación. No se observó coagulación en la jeringa sencilla durante hasta 2 días. La sangre del tubo BD RST mostró coagulación parcial a los 30 minutos y completó la coagulación en 24 horas.

En resumen, la muestra fuertemente heparinizada se coaguló rápida y completamente en un tubo que contenía pTPA, pero solo muy lentamente y de forma incompleta en un tubo BD RST.

Ejemplo 5f: Coagulación de muestras de sangre que contenían heparina mediante activadores de la protrombina

Se determinó la capacidad de los activadores de la protrombina del veneno para coagular la sangre de un participante sano recogida en un tubo de heparina lito Greiner (18 UI de heparina por ml de sangre) usando el análisis TEG, y los resultados se muestran en la Tabla 43. La muestra de citrato se extrajo para la comparación de los valores de AM.

Tabla 43: Resultados del ensayo TEG con sangre recogida en tubo de heparina de litio Greiner de un participante sano.

Procoagulante (nM)	R (min)	AM (mm)	TAM (min)
Ecarina			
56 (negra)	9,9	18,8	37,8
32 (verde)	13,8	18,6	39,8
Carinactivasa-1			
100 (negra)	35,6*	ND	ND
50 (verde)	34,8*	ND	ND
Carinactivasa-2			
56 (negra)	10,4	23,0	37,8
34 (verde)	18,0	18,5	47,5
OsPA (nM)			
56 (magenta)	1,9	37,6	24,7
OsPA (nM)			
34 (rosa)	2,3	36,5	26,1
9 (verde)	2,9	29,8	25,2
3 (negra)	10,3	6,2	20,0
PtPA			
56 (magenta)	2,3	33,5	26,6
34 (marrón)	2,3	39,8	27,2
9 (verde)	2,8	31,3	25,7
3 (negra)	6,8	14,7	25,8
Notecarina			
56 (negra)	2,5	34,1	30,7
32 (verde)	7,9	18,0	28,4
BD RST			
25 (negra)	35,6*	ND	ND
6 (verde)	35,8*	ND	ND
Sangre citrada recalcificada			
Ciclo 1	6,3	61,2	30,1
Ciclo 2	6,5	61,5	27,1

* significa que la medición se detuvo; y ND significa que no se determinó.

Los resultados de este experimento con sangre entera con heparina de litio mostraron que algunos de los procoagulantes fueron capaces de coagular la sangre heparinizada a concentraciones de procoagulantes más bajas, mientras que otros procoagulantes fueron incapaces de coagular la sangre, incluso en el intervalo de concentración más alta ensayada en este experimento. Los resultados muestran que los procoagulantes del grupo C (pTPA y OspA) fueron los más eficaces en la coagulación de la sangre recogida en tubos de heparina de litio Greiner, requiriendo ≥ 9 nM para OspA y pTPA para lograr un tiempo R en 5 minutos. Fue significativamente inferior a las AM (~61) alcanzadas en la sangre citrada recalcificada. Aunque sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree que es probable que el complejo de ATIII-heparina inhiba la trombina formada, y posteriormente impida una formación de coágulos adecuados o más resistentes. Las concentraciones mínimas necesarias para los otros activadores de la protrombina son > 56 nM para la ecarina y la carinactivasa-2, > 100 nM para la carinactivasa-1 y > 32 nM para la notecarina. Las concentraciones de trombina de 6 y 25 nM de los tubos BDRST no pudieron coagular la sangre en absoluto.

De nuevo, aunque sin el deseo de limitarse a teoría alguna, se cree probable que los activadores de la protrombina del grupo C (OspA y pTPA) produzcan un estallido mucho mayor y más sostenido de trombina que sobrecargue el complejo de ATIII-heparina que inhibe tanto la trombina como el FXa y, posteriormente, el proceso de coagulación.

Ejemplo 5g: Coagulación de plasma citrado "agrupado" normal con adiciones de diferentes concentraciones de heparina

Este experimento se realizó para determinar las concentraciones necesarias de los diferentes activadores de la protrombina para coagular el plasma con heparina añadida a diferentes concentraciones con el fin de imitar los niveles que probablemente se encuentran en el plasma de pacientes heparinizados.

El plasma citrado "agrupado" normal tenía el calcio total ajustado a 2,71 mmol/l, y luego se añadieron alícuotas de heparina para dar concentraciones finales de heparina en el tubo Clotek de 0,8, 2,0, 10 y 20 UI/ml, que es el intervalo que se puede encontrar en las muestras de sangre de los pacientes. Además, se dispensaron alícuotas de 1 ml de plasma citrado en tubos de heparina de litio Greiner, y luego se mezclaron en un rodillo durante 15 minutos para dar una concentración de heparina de litio de 90 UI/ml. El tubo Clotek contenía 100 µl de plasma con heparina de sodio o de litio, 100 µl de tampón de Tris (Tris HCl 150 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) y 50 µl de cada procoagulante.

Los resultados de coagulación para cada activador de la protrombina con las muestras de plasma con adiciones de heparina se muestran en las Tablas 44-49, y para la trombina se muestran en la Tabla 50.

Tabla 44: Coagulación por PtPA de plasma citrado "agrupado" normal con adiciones de heparina o dispensado en tubos de heparina de litio Greiner

Heparina (UI/ml)	PtPA (nM)/Tiempo de coagulación (segundos)					
	120 nM	60 nM	36 nM	30 nM	20 nM	12 nM
0	3,3	4,3	5,2	5,5	6,4	10,1
0,8	3,5	5,3	7,4	7,6	10,4	14,0
2,0	6,2	9,8	12,7	15,7	16,6	26,5
10	25,3	39,1	46,1	60,2	72,3	142
20	38,0	47,2	68,2	80,6	232	>300
90 (Tubo de Hep de Li Greiner)	17,4	27,7	53,7	69,5	228	>300

Tabla 45: Coagulación por OsPA de plasma citrado "agrupado" normal con adiciones de heparina o dispensado en tubos de heparina de litio Greiner

Heparina (UI/ml)	OsPA (nM) //Tiempo de coagulación (segundos)					
	120 nM	60 nM	36 nM	30 nM	20 nM	12 nM
0	6,9	7,2	8,3	8,6	8,9	9,4
0,8	9,1	10,8	12,9	13,7	16,4	21,7
2,0	13,8	15,2	17,6	19,1	22,6	27,9
10	27,3	35,2	49,2	56,5	86,1	270
20	93,9	120	>300	>300	>300	>300
90 (Tubo de Hep de Li Greiner)	>300	>300	>300	>300	>300	>300

Tabla 46: Coagulación por notecarina de plasma citrado "agrupado" normal con adiciones de heparina o dispensado en tubos de heparina de litio Greiner

Heparina (UI/ml)	Notecarina (nM)/Tiempo de coagulación (segundos)			
	120 nM	60 nM	36 nM	12 nM
0	44,3	55,1	61,6	87,0
0,8	49,8	65,0	78,3	126
2,0	57,0	92,2	129	262
10	>300	>300	>300	>300
20	>300	>300	>300	>300
90 (Tubo de Hep de Li Greiner)	>300	>300	>300	>300

Tabla 47: Coagulación por ecarina de plasma citrado "agrupado" normal con adiciones de heparina o dispensado en tubos de heparina de litio Greiner

Heparina (UI/ml)	Ecarina (nM)/Tiempo de coagulación (segundos)			
	120 nM	60 nM	36 nM	12 nM
0	28,5	40,0	49,3	92,3
0,8	30,1	41,3	51,8	109
2,0	33,1	50,9	70,7	156,6
10	75,7	142	269	>300
20	140	>300	>300	>300
90 (Tubo de Hep de Li Greiner)	>300	>300	>300	>300

5

Tabla 48: Coagulación por carinactivasa-1 de plasma citrado "agrupado" normal con adiciones de heparina o dispensado en tubos de heparina de litio Greiner

Heparina (UI/ml)	CA-1 (nM) //Tiempo de coagulación (segundos)			
	120 nM	60 nM	36 nM	12 nM
0	170	258	>300	>300
0,8	215	297	>300	>300
2,0	>300	>300	>300	>300
10	>300	>300	>300	>300
20	>300	>300	>300	>300
90 (Tubo de Hep de Li Greiner)	>300	>300	>300	>300

Tabla 49: Coagulación por carinactivasa-2 de plasma citrado "agrupado" normal con adiciones de heparina o dispensado en tubos de heparina de litio Greiner

Heparina (UI/ml)	CA-2 (nM) //Tiempo de coagulación (segundos)			
	120 nM	60 nM	36 nM	12 nM
0	80,6	120	168	267
0,8	87,8	126	181	>300
2,0	130	230	>300	>300
10	>300	>300	>300	>300
20	>300	>300	>300	>300
90 (Tubo de Hep de Li Greiner)	>300	>300	>300	>300

10

Tabla 50: Coagulación por trombina de plasma citrado "agrupado" normal con adiciones de heparina o dispensado en tubos de heparina de litio Greiner

Heparina (UI/ml)	Trombina (nM)/Tiempo de coagulación (segundos)			
	100	60	30	10
0	5,1	7,0	13,5	24,7
0,8	23,2	>300	>300	>300
2,0	>300	>300	>300	>300
10	>300	>300	>300	>300
20	>300	>300	>300	>300
90 (Tubo de Hep de Li Greiner)	>300	>300	>300	>300

15

Como se muestra en el experimento anterior (Ejemplo 5f), la presencia de heparina (y la inhibición de la trombina debido al complejo de ATIII-heparina) presenta un desafío importante para los procoagulantes en la prevención de la coagulación parcial o completa de la sangre. Los resultados de este experimento mostraron la efectividad relativa de los procoagulantes en la coagulación del plasma heparinizado.

Los resultados muestran que PtPA y OsPA fueron los activadores de la protrombina más eficaces para superar el efecto anticoagulante del complejo de ATIII-heparina. La PtPA requirió la concentración más baja (12-20 nM) para

coagular el plasma que contenía las concentraciones más altas de heparina que pueden encontrarse en las muestras de pacientes. Un hallazgo interesante fue que la PtPA fue el único activador de la protrombina capaz de coagular eficazmente el plasma heparinizado del tubo de heparina de litio Greiner en < 5 minutos con todas menos la menor concentración de PtPA, de 12 nM, a pesar de que la concentración de heparina era de 90 UI/ml en comparación con la muestra con adiciones que contiene 20 UI/ml de heparina. Era muy posible que la PtPA solo se viera ayudada por el tensioactivo contenido en el tubo de heparina de litio Greiner. La OsPA requirió > 36 nM y la ecarina > 60 nM para poder coagular el plasma que contenía 20 UI de heparina, y ninguna pudo coagular el plasma heparinizado del tubo de heparina de litio Greiner en < 5 minutos, respectivamente. La carinactivasa-2 ni la notecarina pudieron coagular el plasma que contenía ≥ 10 UI de heparina, mientras que la carinactivasa-1 no pudo coagular el plasma que contenía > 0,8 UI de heparina en el tiempo previamente requerido de < 5 minutos, ni siquiera cuando la concentración fue de 120 nM. El estudio de LA trombina demostró que la concentración de trombina de 100 nM solo pudo coagular la muestra con adiciones con la concentración más baja de heparina, 0,8 UI/ml. Por lo tanto, cuando se considera el tubo BD RST que contiene 135 nM de trombina, es poco probable que se coagulen muestras que contengan > 2 UI/ml de heparina en el tiempo previo requerido de 5 minutos.

Ejemplo 5h: Coagulación de plasma con heparina de litio de un participante sano

Las muestras recogidas en tubos de heparina de litio Greiner son probablemente las muestras con mayor heparina que reciba un laboratorio, en particular, si los tubos no están llenos hasta el volumen de llenado recomendado. El fin de este experimento era proporcionar una guía sobre la concentración mínima requerida de los procoagulantes para coagular el resto de otras muestras que pueden recibirse de pacientes anticoagulados con heparina y producir suero de alta calidad.

Los tubos de heparina de litio Greiner se llenaron hasta la marca de llenado recomendada, dando una concentración de heparina de 18 UI/ml. Los tubos Clotek contenían 100 μ l de plasma con heparina de litio, 100 μ l de tampón de Tris (Tris HCl 150 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) y 50 μ l de cada procoagulante. Las cubetas de TEG contenían 60 μ l de procoagulante y 260 μ l de sangre del participante recogida en un tubo de heparina de litio Greiner.

Para el tubo BD RST, se añadió agua desionizada a dos tubos (BDRST1-1 ml; BDRST2 -4 ml), se dejó que se mezclara en un rodillo durante 30 minutos para disolver la trombina, y el contenido se usó como con el resto de procoagulantes.

Los resultados de coagulación para cada procoagulante con plasma de heparina de litio se muestran en la Tabla 51.

Tabla 51: Estudio de coagulación con plasma de heparina de litio recogido en tubo de heparina de litio Greiner.

[Activador de la protrombina] (nM)	Tiempo de coagulación (s)						
	Ecarina	CA-1	CA-2	PtPA	OsPA	Notecarina	Trombina
120	69,0	>300	100,1	7,5	15,6	47,8	>300
60	122,6	>300	180,3	10,7	18,1	62,7	>300
36	175,2		270,6	13,1	21,0	82,4	>300
12	>300		>300	32,7	37,1	269,3	
4	>300		>300	78,5	102,1	>300	
1	>300		>300	207,8	>300	>300	
0,1	>300		>300	>300	>300		
0,01	>300		>300	>300	>300		

El diseño experimental era para demostrar la eficacia de los procoagulantes en la coagulación del plasma heparinizado de tubos de recogida de sangre. Se encontró que el intervalo de concentraciones mínimo necesario para lograr la coagulación de < 5 minutos para la ecarina y la carinactivasa-2 fue de 12 a 36 nM, > 120 nM para la carinactivasa-1 y de 4 a 12 nM para la notecarina. Para la trombina, fue necesaria una concentración de > 120 nM. El tubo BD RST se probó también con 7,7 y 27 nM de trombina, y ambas concentraciones produjeron un tiempo de coagulación > 5 minutos, lo que sugirió que el BDRST puede ser ineficaz en muestras de coagulación de pacientes que reciben dosis altas de heparina. Los resultados muestran que los activadores de la protrombina del grupo C (PtPA y OsPA) fueron los más eficaces para coagular el plasma de heparina de litio obtenido de sangre de un participante sano recogido en tubos de heparina de litio Greiner, que requieren entre 0,1 y 1 nM de PtPA y entre 1 y 4 nM de OsPA, respectivamente, para lograr la coagulación en < 5 minutos.

Ejemplo 5i: Coagulación de sangre y plasma obtenida del participante de una cirugía cardíaca "completamente heparinizado"

La concentración más alta de heparina administrada por vía intravenosa se da en procedimientos quirúrgicos complejos tales como la cirugía cardíaca. Si se recogen muestras para analizar la bioquímica durante el período de

heparinización máxima, en general, es necesario proporcionar los resultados en el menor tiempo posible. Si se usa suero, esto requerirá que la coagulación sea completada por el procoagulante para cuando estas muestras de suero lleguen al laboratorio, es decir, en < 10 minutos.

5 La heparina que se administra a los pacientes es heparina sódica, mientras que en los tubos o jeringas de extracción de sangre es heparina de litio. La cantidad máxima de heparina infundida en dichos pacientes es de ~45000 UI. Estos pacientes también están hemodiluidos (es decir, hay un aumento en el volumen de plasma sanguíneo a ~4 l), dando una concentración de heparina de ~10 UI por ml de plasma.

10 Este experimento se diseñó para determinar si las concentraciones de procoagulante seleccionadas podían coagular sangre de paciente sometido a cirugía cardíaca heparinizado "completamente" y producir suero de alta calidad. El participante había recibido 37.000 UI de heparina, y la muestra se recogió ~30 minutos después de la infusión de heparina, lo que equivale a ~9,3 UI de heparina por ml de plasma. Se centrifugó una parte de la muestra de sangre para obtenerse plasma.

15 Para la coagulación del plasma, el tubo Clotek contenía 100 µl de plasma de participante cardíaco, 100 µl de tampón de Tris (Tris HCl 150 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) y 50 µl de cada procoagulante.

20 Para la coagulación de la sangre entera, Las cubetas de TEG contenían 60 µl de procoagulante y 260 µl de sangre del participante. Al estar completamente heparinizada, la sangre no se coaguló por sí misma.

Para el experimento de BD RST-1, se disolvió el contenido de dos tubos BDRST con 1 y 4 ml de agua destilada, respectivamente, y 60 µl de la solución usada en la cubeta de TEG como procoagulante.

25 Para el experimento de BDRST-2, los tubos se llenaron con 1 y 4 ml de sangre, respectivamente, los tubos se invirtieron 10 veces (~30 segundos), y se transfirieron 340 µl de la sangre a la cubeta de TEG.

Los resultados de coagulación para cada procoagulante con el plasma del paciente se muestran en la Tabla 52, y los resultados de la sangre entera se muestran en la Tabla 53.

30

Tabla 52: Tiempos de coagulación en segundos del plasma de un participante sometido a cirugía cardíaca "completamente heparinizado" con los diferentes activadores de la protrombina, trombina y contenido de los tubos BDRST a diferentes concentraciones.

Conc. de procoagulante (nM)	PtPA	OsPA	Ecarina	CA-1	CA-2	Notecarina	Trombina	BDRST
120	10,0	ND	64,8	175	66,5	ND	>300	>300 (27 nM)
60	14,8	18,7	89,7	>300	95,1	68,6	>300	>300 (6 nM)
36	15,9	27,3	>300	>300	124	84	>300	ND
12	36,3	35,5	>300	>300	>300	163	ND	ND
6	65,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	301,6	100	>300	>300	>300	179	ND	ND
3	ND	123	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	ND	>300	ND	ND	ND	>300	ND	ND
ND significa que no se determinó.								

35 Los resultados de este experimento mostraron las concentraciones de cada procoagulante requeridas para coagular el plasma en el tiempo necesario previo de < 5 minutos. La concentración máxima de activador que da un tiempo de coagulación de aproximadamente 5 minutos fue: PtPA 4 nM, OsPA 1-3 nM, notecarina 3 nM, carinactivasa-2 >12 nM, ecarina >36 nM, carinactivasa-1 >60 nM y trombina >120 nM. Fue sorprendente observar que la eficacia de la notecarina era comparable a la de los activadores del grupo C.

40

Tabla 53: Resultados del estudio de coagulación TEG con sangre de un participante sometido a cirugía cardíaca "totalmente heparinizado" con los diferentes procoagulantes.

Procoagulante (nM)	R (min)	AM (mm)	TAM (min)
Ecarina			
56	2,3	47,6	19,4
34	3,7	49,0	25,1
11	16,6	35,2*	53,3*

Procoagulante (nM)	R (min)	AM (mm)	TAM (min)
3	28,8*	ND	ND
Carinactivasa-1			
112	5,3	36,9	23,7
56	9,8	33,1*	37,7*
Carinactivasa-2			
56	2,8	38,1	25,8
34	3,3	36,9	24,3
11	8,9	30,7*	38,5*
OsPA (nM)			
56	0,2	64,2	18,6
3	2,9	61,4	25,8
2,3	4,2	54,8	28,4
2	11,0	29,4*	37,9*
PtPA			
56	0,4	62,9	20,1
6	4,4	60,9	27,9
3	9,7	42,8*	48,6*
2	28,7*	ND	ND
Notecarina			
56	0,8	51,9	23,3
34	1,1	51,0	19,6
11	2,2	46,6	22,2
3	7,2	39,5	33,6
BD RST-1			
25	18,9*	ND	ND
6	19,3*	ND	ND
BD RST-2			
135 (1 ml)	0,4	9,9	13,3
34 (4 ml)	0,3	12,7	8,1
* significa que la medición se detuvo; y ND significa que no se determinó.			

Las concentraciones determinadas para lograr un tiempo R < 5 minutos y la máxima resistencia del coágulo a partir de estos resultados para los diferentes activadores de la protrombina fueron: PtPA 6 nM, OsPA 2,3 nM, notecarina 3-11 nM, ecarina 11-34 nM, carinactivasa-2 11-34 nM y carinactivasa-1 57-112 nM.

5 Sorprendentemente, la notecarina produce coágulos con AM superiores a las de los activadores de la protrombina del grupo A y B, y sin el deseo de quedar ligados a teoría alguna, se postula que los aditivos de la sangre de dichos pacientes pueden haber contribuido en la eficacia de coagulación.

10 Los coágulos más resistentes formados según lo indicado por la AM fueron con PtPA y OsPA, y los más débiles, con los activadores de la protrombina carinactivasa-1 y carinactivasa-2.

15 La trombina de los tubos BD RST (experimento de BDRST-2 con 135 nM de trombina) produjo la coagulación incompleta y coágulos débiles como se indica por la AM. Es muy probable que dichas muestras formen coagulación latente en el suero tras la centrifugación.

Ejemplo 5j: Coagulación de plasma citrado "agrupado" normal con adiciones de rivaroxabán

20 Este experimento se diseñó para examinar el efecto de uno de los nuevos anticoagulantes inhibidores del Factor Xa, el rivaroxabán, sobre la capacidad de coagulación de los procoagulantes.

Se trituró un comprimido de rivaroxabán (10 mg, peso molecular de 435, Xarelto, Bayer Schering Pharm, Alemania) en 5 ml de agua desionizada (2 mg/ml), se dejó mezclar durante 30 minutos, y después se centrifugó para eliminar las partículas sin disolver. La dosis terapéutica típica administrada es de 10 a 40 mg una vez al día. Para una

persona de 70 kg (~3.000 ml de plasma), la cantidad es de 0,14-0,57 mg/kg, 0,0033-0,013 mg/ml de plasma. Las concentraciones preparadas y probadas en el tubo Clotek fueron: 0,0033; 0,0083; 0,017; 0,033 y 0,17 mg/ml.

- 5 Los tubos Clotek contenían 50 µl de tampón de Tris (Tris HCl 150 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4), 50 µl de CaCl₂ 0,2 mM, 100 µl de plasma citrado "agrupado" normal, 50 µl de tampón de Tris o anticoagulante de diferente concentración, y 50 µl de activador de la protrombina (30 nM).

Los tiempos de coagulación se muestran en la Tabla 54.

10 Tabla 54: Tiempos de coagulación (segundos) con plasma citrado "agrupado" normal y Rivaroxabán.

Procoagulante (30 nM)	Concentración de anticoagulante	Concentración de rivaroxabán (mg/ml)				
	0	0,003	0,008	0,017	0,033	0,17
PtPA	4,8	5,8	6,2	7,7	8,8	12,0
OsPA	8,6	8,6	8,8	8,8	9,3	16,9
Ecarina	42,6	50,7	51,6	53,9	58,9	83,9
Notecarina	41,7	42,7	44,9	46,2	47,6	67,3
CA-1	128	133	152	176	194	258
CA-2	60,9	61,1	62,8	66,1	70,6	98,0
Trombina	7,1	7,0	7,3	7,4	8,0	9,8
BDRST 23 nM	5,1	5,3	5,2	5,8	5,7	7,7

- 15 Los resultados muestran que el rivaroxabán tiene un efecto mínimo sobre los procoagulantes en el intervalo de concentraciones terapéuticas de 0,0033 a 0,013 mg/ml de plasma que se pueden encontrar en los pacientes. Sin embargo, a concentraciones más altas, el rivaroxabán tuvo un efecto inhibitorio significativo sobre la coagulación en presencia de cada uno de los procoagulantes. Este efecto puede deberse a la inhibición del factor Xa producido a partir del FX humano en el plasma por la trombina generada por los procoagulantes.

Ejemplo 5k: Coagulación de sangre de un paciente sometido a anticoagulación con citrato

- 20 En experimentos previos, se ha demostrado que los activadores de la protrombina son capaces de coagular la sangre citrada recogida en tubos de citrato Greiner. El fin de este experimento era confirmar que la citración *in vivo* no presentaba problemas de coagulación con los activadores de la protrombina.

- 25 En este ejemplo, el paciente estaba recibía 3,0 mmol de citrato por litro de flujo sanguíneo. La sangre se recogió en una jeringa sencilla de 50 ml (BD Plastipak n.º 300866) para las pruebas de patología rutinarias, de la que se dejaron < 3 ml para realizar el estudio muy limitado solo con PtPA.

- 30 Los parámetros de coagulación fueron: TP 13 s (RR 9-13), INR 1,3, TTPa de 45 s (RR 24-39), 7,2 g/l de fibrinógeno (derivado) (RR 1,7-4,5), confirmando la anticoagulación.

La cubeta de TEG contenía 20 µl de CaCl₂ 0,2 M o solución salina, 5 µl de PtPA y 320 µl de sangre citrada.

Los resultados se muestran en la tabla 55.

35 Tabla 55: Resultados del ensayo TEG para participante anticoagulado con citrato.

Participante anticoagulado citrado	R (min)	AM (mm)	TAM (min)
Solo sangre con citrato recalcificada	4,8	77,1	18,0
2,8 PtPA recalcificada	0,6	74,7	15,8
PtPA 2,8 nM no recalcificada	0,8	76,2	18,9

- 40 Los resultados indicaron que la concentración de citrato usada para la anticoagulación de los pacientes no presentó problemas de coagulación cuando se usó PtPA como procoagulante en sangre recalcificada y no recalcificada. La concentración de citrato en la sangre recogida en los tubos de Citrato Greiner es del 3,2 % o 109 mM, que es aproximadamente 36 veces la concentración que el paciente estaba recibiendo. Además, no se esperaba que hubiera problemas de coagulación, ya que los pacientes citrados se controlan de manera continua para detectar el calcio ionizado, y se va reponiendo el calcio ionizado según sea necesario. El tiempo R en la sangre citrada "agrupada" normal fue de 6,4 minutos (como se muestra en la Tabla 43) en comparación con los 4,8 minutos en este paciente. La recalcificación añade calcio en exceso con respecto a lo necesario, por lo tanto, teóricamente no debería contribuir a la diferencia. Se postula que la diferencia se debe a concentraciones más altas de factores de coagulación, incluyendo el fibrinógeno, que fue de 7,2 g/l.

EJEMPLO 6: COAGULACIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE ENTERA DE PARTICIPANTES CON PERFIL DE COAGULACIÓN PROLONGADO O RECuento PLAQUETARIO BAJO

Algunos pacientes presentan parámetros de coagulación prolongados y/o recuento de plaquetas reducido como resultado del tratamiento farmacológico o factores genéticos (por ejemplo, hemofilia). Los siguientes experimentos se realizaron para determinar si PtPA u OsPA podían coagular rápidamente muestras de sangre de dichos pacientes.

Ejemplo 6a: Participantes con tiempo de coagulación prolongado

Se obtuvieron muestras de sangre de 4 participantes ("A", "B", "C" y "D") con TTPa prolongado que indica un defecto en la ruta intrínseca de Pathology Queensland, Hospital Princess Alexandra, Queensland, Australia. Se determinaron los parámetros de coagulación de cada participante, y se muestran en la Tabla 56.

Tabla 56: Parámetros de coagulación* de cada paciente

Participante	TTPa (s)	TP (s)	INR	TT (s)	Fib-D (g/l)	Plat ($\times 10^9/l$)
A	48	16	1,6	19	7,1	453
B	44	34	3,0	16	4,1	97
C	>200	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D	45	16	1,5	15	1,5	96
Intervalo de referencia	25-38	8-14	0,9-1,3	10-15	1,5-4,0	140-400

*TTPa = tiempos de la tromboplastina parcial activada; TP = tiempo de la protrombina; INR = índice normalizado internacional; TT = tiempo de la trombina; Fib-D = fibrinógeno derivado del tiempo de la protrombina; Plat = plaquetas, n.d. = no determinado. Los intervalos de referencia se obtuvieron de Pathology Queensland.

Se realizó un análisis TEG. Cada mezcla de ensayo TEG consistió en 310 μ l de sangre citrada de muestras de los participantes A-D, 20 μ l de CaCl_2 (0,2 M) y 10 μ l de solución salina o PtPA (concentración final de 1,41 μ g/ml). Se añadió CaCl_2 en el punto temporal cero para iniciar la coagulación.

En la Figura 44, se muestran los rastros de TEG para las cuatro muestras, y los parámetros TEG para estos rastros se muestran en la Tabla 57.

Tabla 57: Resultados del estudio TEG para la coagulación de muestras de sangre de participantes con parámetros de coagulación anómalos

	R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
A	>35	n.d.	n.d.	n.d.
A + PtPA	1,3	16,6	70,9	67,4
B	23,0	>39	17,0	n.d.
B + PtPA	0,9	21,3	70,0	59,0
C	>52	n.d.	n.d.	n.d.
C + PtPA	2,1	24,5	67,6	60,4
D	16,1	43,3	26,4	31,7
D + PtPA	1,4	19,2	52,0	40,8

"n.d." indica es ese valor no se midió

Los gráficos TEG para las cuatro muestras se muestran en la Figura 44, en la que el gráfico TEG A representa al participante A y, en ese gráfico, los dos rastros marcados con (i) representan el control de solución salina con calcio añadido; los dos rastros marcados con (ii) son las muestras con PtPA. El gráfico TEG B representa al participante B y, en ese gráfico, los dos rastros marcados con (i) son control de solución salina con calcio añadido; los dos rastros marcados con (ii) son las muestras con PtPA. El gráfico TEG C representa al participante C y, en ese gráfico, el rastro marcado con (i) es control de solución salina; y los cuatro rastros marcados con (ii) son muestras con PtPA añadido. El gráfico TEG D representa al participante D y, en ese gráfico, los rastros marcados con (i) son controles de solución salina; y los dos rastros marcados con (ii) son las muestras con PtPA. Se llevaron a cabo determinaciones por triplicado para el paciente C debido a parámetros de coagulación anormalmente anómalos. Los datos de la Tabla 57 representan las medias de los datos de TEG.

En resumen, las muestras de sangre de los participantes A-D muestran un tiempo de TTPa que varía de 44 a > 200 segundos, lo que indica un defecto en la vía de coagulación intrínseca. Sin PtPA, las muestras no se coagularon o produjeron coágulos muy débiles. En todos los casos, PtPA (1,41 μ g/ml) causó coagulación rápida, reduciendo el

tiempo de coagulación a 1-2 minutos. Por lo tanto, PtPA es eficaz en la coagulación rápida de sangre de pacientes con una deficiencia en esta vía de coagulación.

Ejemplo 6b: Participantes con bajo recuento de plaquetas

En los participantes con bajo recuento de plaquetas, los tiempos de coagulación aumentaron significativamente en comparación con la sangre de la población sana. Esto se debe a que las plaquetas proporcionan una superficie de fosfolípidos para la formación del complejo de protrombinasa y aceleran la coagulación sanguínea.

Se obtuvieron muestras de sangre de cuatro participantes con bajos recuentos de plaquetas ("E", "F", "G" y "H") del Hospital Princess Alexandra, Queensland, Australia. Se determinaron los parámetros de coagulación de cada participante, y se muestran en la Tabla 58, lo que confirma el bajo recuento de plaquetas.

Tabla 58: Parámetros de coagulación de cada paciente

Participante	TTPa (s)	TP (s)	INR	TT (s)	Fib (g/l)	Plat ($\times 10^9/l$)
E	31	10	1,1	n.d.	4,5	10
F	29	14	1,4	n.d.	1,2	29
G	34	12	1,2	n.d.	2,7	18
H	54	11	1,2	21	6,4	46
Intervalo de referencia	25-38	8-14	0,9-1,3	10-15	1,5-4,0	140-400
n.d. significa que las mediciones no fueron determinadas.						

Se realizó un análisis TEG. Cada mezcla de ensayo TEG consistió en 310 μ l de sangre citrada de muestras de los participantes E-H, 20 μ l de CaCl_2 (0,2 M) y 10 μ l de solución salina o solución de activador de la protrombina (bien PtPA a una concentración final de 1,41 μ g/ml o 14,1 μ g/ml, u OsPA a una concentración final de 0,59 μ g/ml o 5,9 μ g/ml).

Los rastros TEG se muestran en la Figura 45 y los parámetros TEG se enumeran en las Tablas 59 y 60.

Tabla 59: Resultados del estudio TEG para las muestras de sangre de participantes con bajos recuentos de plaquetas con PtPA

Participante	μ g/ml	R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
E	0	10	30,3	42,3	34,6
	1,41	1,5	22,5	61,6	35,3
	14,1	0,4	20,3	73,2	31,1
F	0	9,3	29,8	15,6	28,2
	1,41	1,5	24,2	29,0	31,2
	14,1	0,6	24,3	38,4	28,0
G	0	12,8	32,8	29,5	30,2
	1,41	1,4	23,4	57,1	33,7
	14,1	0,4	25,0	66,9	31,3
H	0	9,1	32,0	39,3	48,2
	1,41	1,7	24,2	66,3	58,8
	14,1	0,3	22,2	73,7	54,7

Tabla 60: Resultados del estudio TEG para las muestras de sangre de participantes con bajos recuentos de plaquetas con OsPA

Participante	μ g/ml	R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
E	0	10	30,3	42,3	34,6
	10	3,8	23,8	41,0	32,7
	100	0,9	21,8	63,7	32,9
F	0	9,3	29,8	15,6	28,2
	10	3,2	25,3	27,4	28,7
	100	1,6	25,6	27,5	29,3
G	0	12,8	32,8	29,5	30,2
	10	3,3	24,6	38,8	31,7

Participante	µg/ml	R (min)	TAM (min)	α (grados)	AM (mm)
	100	0,9	24,5	56,5	29,9
H	0	9,1	32,0	39,3	48,2
	10	3,4	24,1	59,8	59,7
	100	0,8	22,6	66,7	54,9

Los diagramas TEG se muestran en la Figura 45, en la que el gráfico A muestra los resultados para el participante E; el diagrama B muestra los resultados para el participante F; el diagrama C muestra los resultados para el participante G; y el diagrama D muestra los resultados para el participante H. En cada representación gráfica, el rastro marcado con (i) representa sin PtPA u OsPA; el rastro marcado con (ii), representa 14,1 µg/ml de PtPA; el rastro marcado con (iii), representa 1,41 µg/ml de PtPA; el rastro marcado con (iv), representa 5,88 µg/ml de OsPA; y el rastro azul representa 0,588 µg/ml de OsPA.

En resumen, tanto PtPA como OsPA coagulan sangre de participantes con bajo recuento plaquetario rápidamente, dando coágulos muy resistentes.

EJEMPLO 7: COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE COAGULACIÓN DE LOS VENENOS QUE CONTIENEN ACTIVADORES DE LA PROTROMBINA

Cinco venenos recién reconstituidos de las serpientes *Pseudonaja textilis* (Pt), *Oxyuranus scutellatus* (Os), *Oxyuranus microlepidotus* (Om), *Notchis scutatus* (Ns) y *Echis carinatus* (Ec) se reconstituyeron en agua destilada con una concentración de reserva de 50 mg/ml. Se preparó de nuevas una dilución madre de trabajo de 6 mg/ml y se midió su actividad de coagulación en la coagulación de plasma citrado recalcificado. Se diluyeron los venenos en serie por duplicado de cada concentración en el ensayo de 2 mg/ml a 500 pg/ml. Los resultados que se muestran son la media de las mediciones por duplicado. El ensayo consistió en: 100 µl de tampón Hepes 0,02 M, pH 7,4, con calcio 10 mM añadido, más 100 µl de plasma citrado, y se midió el tiempo de coagulación (en segundos) desde el momento de la adición de la dilución del veneno.

Los resultados se muestran en la Tabla 61 y en la Figura 46.

Tabla 61: Tiempos de coagulación de venenos de serpiente que contienen activadores de la protrombina a diferentes concentraciones

Veneno (mg/ml).	Tiempo de coagulación (segundos)				
	Os	Pt	Om	Ns	Ec
2	59,5	20,6	14,6	27,4	10,3
1	28,4	9,8	9,8	26,5	9,7
0,5	15	5,2	7,8	29,2	10,9
0,25	9,3	5	6,6	36	14,7
0,125	7,6	4,2	6,1	42,7	17,1
0,063	7,4	3,6	6,8	46,4	19,8
0,031	6,5	3,5	6,9	52,00	24,3
0,015	8,2	3,6	8,0	59,9	28,1
0,0075	8,6	3,7	8,6	67,2	33,4
0,0037	9,2	3,8	9,3	75,7	42,1
0,002	10,6	4,0	10,7	78,8	48,6
0,001	11,2	4,2	11,1	86,00	54,6
0,0005	12,4	4,5	12,6	92,5	61,4
0,00025	12,8	6,2	13,0	105,6	72,3
0,00013	14,5	11,2	14,8	132,4	76,4
0,00006	20,4	12,6	21,1	165,5	82,5
0,00003	21,8	14,3	22,4	192,6	91,3
0,00001	24,6	16,5	25,6	209	106,4
0,000005	30,7	18,6	31,2	235,4	123,2

Como se puede ver tanto en la Tabla 61 como en la Figura 46, los cinco venenos coagularon el plasma citrado recalcificado de manera muy eficaz hasta una concentración de 500 pg/ml. Los venenos que contenían activadores

de la protrombina del grupo C (Pt, Os y Om) fueron los más activos, logrando tiempos de coagulación inferiores a 50 segundos a una concentración de 500 pg/ml.

EJEMPLO 8: PRECIPITACIÓN Y COAGULACIÓN LATENTE EN MUESTRAS DE PLASMA Y SUERO PREPARADAS USANDO TUBOS DISPONIBLES EN EL MERCADO O USANDO PTPA Y EFECTOS SOBRE LA ESTIMACIÓN DE LA TROPONINA I

Como se ha comentado en partes anteriores de la presente memoria descriptiva, se han asociado una serie de problemas con el uso de tubos comerciales de suero y plasma tales como la coagulación latente o la ausencia de coagulación (tubos de suero), los microcoágulos y las hebras de fibrinógeno (tubos de suero o plasma), y la precipitación de proteínas y la filtración de material celular (tubos de suero o plasma). Para investigar si un tubo que contenía un activador de la protrombina presentaría algunos de estos problemas, se examinaron visualmente muestras de sangre de tubos disponibles en el mercado y se compararon con muestras de sangre de tubos que contenían PtPA. Los resultados se muestran en las Figuras 47-49.

Ejemplo 8a: Precipitación y coagulación latente

La Figura 47 muestra los resultados de la preparación de plasma a partir de una muestra de sangre recogida en un tubo de plasma Greiner disponible en el mercado (que contiene heparina de litio). Se marcan cuatro secciones del tubo (de arriba a abajo de la Figura): plasma; precipitado gelatinoso; gel separador; células empaquetadas por centrifugación. El precipitado gelatinoso se compone de fibrinógeno y otras proteínas plasmáticas, y se forma cuando el tubo se almacena a 2-8 °C. Este precipitado tiene el potencial de interferir en la función del instrumento y la determinación del analito. Dichos precipitados ocurren en ~5 % del plasma de heparina de litio.

La Figura 48 muestra los resultados de la preparación del suero en tres tubos de suero disponibles en el mercado: el tubo de la izquierda (GS) es un tubo de suero Greiner; el tubo de en medio (BDS) es un tubo de suero BD y el tubo de la derecha (BDT) es un tubo BD RST. Se marcan cuatro secciones de los tubos (de arriba a abajo de la Figura): células empaquetadas; gel separador; coagulación latente; suero. Se hace evidente la coagulación tras la centrifugación (latente) en los sobrenadantes o el componente sérico de los tres tubos. Los tubos están invertidos para ilustrar la presencia de los coágulos. Estos coágulos latentes tienen el potencial de interferir en la instrumentación y en los ensayos funcionales.

La Figura 49 está en dos mitades. La mitad izquierda muestra los resultados de la preparación del suero de una sola muestra de sangre del mismo paciente completamente heparinizado en tres tubos disponibles en el mercado (de izquierda a derecha): un tubo de suero Vacuette™ de Greiner (GS), un tubo de suero Vacutainer™ de BD/SST II (BDS) y un tubo BD RST (BDT), y también en un tubo sin aditivos Vacuette™ con PtPA añadido de Greiner. Se marcan tres secciones de los tubos (de arriba a abajo de la Figura): suero; gel separador; células empaquetadas. Los cuatro tubos de la Figura 49 se centrifugaron y se dejaron en reposo durante la noche, tras lo que se transfirió el suero de cada tubo a un tubo de vidrio transparente y se fotografió como se muestra en la mitad derecha de la Figura 49 (de izquierda a derecha: tubos GS, BDS, BDT y con PtPA). Los sueros de los tres tubos disponibles en el mercado mostraron evidencia de coagulación, por la formación de coágulos en el lado del tubo y la observación de hebras de fibrina, pero no hubo evidencia de precipitación en el suero preparado en el tubo que contenía PtPA, que tenía una claridad que superaba considerablemente la observada con las otras muestras.

Ejemplo 8b: Niveles de troponina I

Se ha observado que al menos algunos resultados falsos positivos que muestran elevación de la troponina I (uno de los marcadores más específicos de los ataques cardíacos) se deben a la precipitación/coagulación latente producida en muestras de suero y plasma.

Se midieron los niveles de troponina I en muestras de sangre de 64 participantes usando muestras de suero y plasma preparadas en tubos disponibles en el mercado y tubos que contenían PtPA.

Se prepararon muestras de suero y plasma para cada participante en cinco tubos disponibles en el mercado: plasma Vacuette™ de Greiner; BD PST II; suero Vacuette™ de Greiner; BD SST II; y tubos BD RST, y en tubos sin aditivos Vacuette™ de Greiner que contenían PtPA (1,2 µg/4 ml) y se analizaron para determinar la troponina I (TnI) usando el ensayo AccuTnI de Beckman Coulter.

Se obtuvieron cuatro resultados discrepantes como se indica en la Tabla 62 para los participantes 18, 20, 38 y 63. Los participantes 18 y 38 estaban sanos, y los participantes 20 y 63 eran pacientes sometidos a cirugía cardíaca y a heparina. Se obtuvieron tres resultados falsos positivos (participantes 18, 20 y 38). La recentrifugación de una alícuota del primer tubo, seguida de un nuevo ensayo dio resultados negativos, como se esperaba en comparación con los resultados de los otros tubos de la misma muestra de sangre. Un resultado adicional fue excepcionalmente alto (participante 63). La recentrifugación de una alícuota y el nuevo ensayo dio un resultado comparable con los otros tubos.

El hecho de que la centrifugación de las muestras resolviera la discrepancia sugiere con fuerza que los resultados discrepantes se debieron a la formación de coagulación latente/precipitados causantes de un muestreo inexacto. No se obtuvieron resultados discrepantes con el suero con PtPA.

5 Tabla 62: Resultados del ensayo de troponina I que muestran discrepancias.

Participante	Resultado de TnI original (Resultado de TnI repetido) µg/l					
	PtPA	Plasma Greiner	BD PST II	(suero Greiner	BD SST II	BD RST
18	0,003	0,000	0,000	0,000	<u>0,053</u> (0,004)	0,000
20	0,007	0,015	<u>0,093</u> (0,015)	0,013	0,013	0,004
38	0,009	0,000	0,006	0,006	<u>1,334</u> (0,002)	0,004
63	0,675 (0,690)	0,665 (0,704)	0,643 (0,665)	0,652 (0,650)	0,542 (0,579)	<u>1,251</u> (0,734)

En resumen, la precipitación y la coagulación latente observadas durante la preparación de muestras de plasma y suero en los tubos disponibles en el mercado representan problemas significativos para la determinación de los analitos. No se observaron precipitaciones ni evidencias de la formación de microcoágulos cuando se usó PtPA para preparar una muestra de suero.

10 EJEMPLO 9: NIVELES DE FIBRINÓGENO, FIBRINÓGENO DEGRADADO Y FIBRINAS EN MUESTRAS DE PLASMA Y SUERO

15 El fibrinógeno soluble, el fibrinógeno soluble degradado parcialmente (fdp) y la fibrina no polimerizada (FDP) no son componentes deseables en las muestras de suero y plasma para la determinación de analitos como se ha comentado en partes anteriores de la presente memoria descriptiva. En resumen, el fibrinógeno/fdp/FDP debe ser mínimo en una muestra de suero de alta calidad para evitar una mayor conversión en fibrina insoluble (microcoágulos) tras las condiciones convencionales de preparación del suero, en especial, en reposo. Los
20 microcoágulos o las hebras de fibrina pueden interferir en la instrumentación y afectar a la determinación de los analitos. Para las muestras de suero preparadas mediante métodos convencionales, se cree que la concentración de fibrinógeno/fdp/FDP de la muestra depende de la medida en que el paciente/individuo esté anticoagulado, del estado de salud del paciente (por ejemplo, de la presencia de enfermedad hepática), del tipo de recipiente de recogida de muestras y, en casos excepcionales, de la mezcla inadecuada de la muestra en el tubo. En este ejemplo, se
25 examinó la concentración de fibrinógeno/fdp/FDP en muestras de suero y plasma preparadas usando diferentes tubos para ayudar a establecer condiciones para la preparación de una muestra de suero de "alta calidad".

Se midieron las concentraciones de fibrinógeno/fdp/FDP en suero y plasma mediante un inmunoensayo de enzima de tipo sándwich (ELISA) como se describe a continuación. Este ensayo usa un antisuero policlonal contra el
30 fibrinógeno que reconoce el fibrinógeno soluble, fdp y FDP.

El método de ELISA requiere antisuero anti-fibrinógeno (como fracción de IgG purificada: AHFAS) y conjugado de antisuero anti-fibrinógeno-peroxidasa de rábano picante (AHFAS-HRP). Cada uno de los preparados se adquirieron en MP Biochemical, EE.UU. El fibrinógeno internacional convencional se adquirió en NIBSC, Londres, y se diluyó a
35 partir de una concentración de reserva de trabajo de 1 mg/ml en glicerol/solución salina al 50 %.

El tampón de lavado consistía en tampón de fosfato 0,05 M, pH 7,4, NaCl 0,5 mM, Tween 20 al 0,05 % y BSA al 1 %, mientras que el tampón de unión usado fue tampón de bicarbonato 0,1 M, pH 9,6.

40 Las diluciones de trabajo de los anticuerpos se prepararon diluyendo las soluciones madre de AHFAS y AHFAS-HRP a 1:500 en tampón de unión. La solución de sustrato de HRP consistió en tetrametilbenzidina 20 mM, 0,4 ml de H₂O₂ al 30 % y 50 µl de tampón de citrato 0,05 M, pH 4,0, en una solución de reacción de 50 ml.

Se recubrieron placas ELISA IMMUNOSORB de Nunc de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) con 100 µl de dilución de trabajo de AHFAS por pocillo incubando las placas con AHFAS a 4 °C durante la noche. Entonces, se bloquearon las placas con 100 µl de albúmina de suero bovino al 2 % (Sigma Chemical, Co) en tampón de lavado a 4 °C durante la noche y, seguidamente, se lavaron tres veces con tampón de lavado.

Se recogieron muestras de sangre de voluntarios sanos (sanos) y pacientes (enfermedad cardíaca y renal) en los
50 siguientes tubos:

tubos de suero Greiner (GS o GRS);

tubos de suero BD (BDS);

tubos BD RST (BDT o BD RST);

tubos sin aditivos Greiner con 1,2 µg de PtPA añadidos de una solución madre de PtPA a 4,8 mg/ml (PtPA);
 tubos sin aditivos Greiner con 0,5 µg de OsPA añadidos de una solución madre de OsPA a 2,0 mg/ml (OsPA);
 5 tubos sin aditivos Greiner con 0,6 U de ecarina añadida;
 tubos sin aditivos Greiner con 1,2 U de ecarina añadida;
 tubos sin aditivos Greiner con 0,63 U/4 ml de ecarina añadida (Ejemplo 9b);
 10 tubos sin aditivos Greiner con 1,25 U/4 ml de ecarina añadida (Ejemplo 9c);
 tubos sin aditivos Greiner con 2,5 U/4 ml de ecarina añadida (Ejemplo 9c);
 15 tubos de plasma Vacuette™ de Greiner (GRLH);
 tubos de plasma Vacutainer™ de BD (PST II) (BDLH);
 tubo de citrato Vacuette™ de Greiner (citrato al 3,2 %) para plasma (CIT); y
 20 tubo de K2EDTA Vacuette™ de Greiner (1,5-2,2 mg/ml de EDTA) para plasma (EDTA).

Las muestras de plasma y suero preparadas en cada tubo anterior se prepararon conforme al procedimiento de
 25 preparación de muestras de analitos convencional de Pathology Queensland (Australia), en el que se recogió sangre
 en cada tubo, y el tubo se dejó reposar antes de la centrifugación a 3.000 g. Los tubos que contenían PtPA, OsPA y
 ecarina, BD RST, se dejaron en reposo durante 5 minutos, mientras que el resto de los tubos se dejaron reposar
 durante 30 minutos para la sangre normal y durante 60 minutos para la sangre anticoagulada.

De cada tubo, se sembraron en placas alícuotas de 100 µl de las muestras de plasma o de suero (dilución 1/1.000 y
 30 dilución 1/10, respectivamente) por triplicado. Se sembraron en placas diluciones en serie de fibrinógeno
 convencional (11 diluciones que cubrían un intervalo de concentraciones de 1.000 ng/ml a 10 ng/ml) por duplicado.
 Las placas se incubaron durante la noche a 4 °C.

Las placas se lavaron seis veces con tampón de lavado para retirar los componentes no unidos, y se incubaron
 35 durante la noche a 4 °C con 100 µl de solución de trabajo de AHFAS-HRP por pocillo. Se lavaron de nuevo las
 placas 6 veces con tampón de lavado antes de añadir 100 µl de solución de sustrato de HRP por pocillo.

Se controló el desarrollo de un color azul en un ambiente oscuro hasta que $A_{450 \text{ nm}}$ alcanzó una absorbancia de 1,0 a
 40 una concentración de fibrinógeno de 1 µg/ml. Entonces, se detuvo la reacción añadiendo 100 µl por pocillo de
 solución de ácido sulfúrico 1,0 M, produciendo un color amarillo. Se leyeron entonces las placas a $A_{450 \text{ nm}}$ en un
 lector de placas Thermo Scientific Multiskan Ascent con el software Ascent.

Ejemplo 9a: Niveles de fibrinógeno/fdp/FDP en 48 muestras de suero recogidas en tubos de suero Greiner (GS) de pacientes

La concentración de fibrinógeno/fdp/FDP se midió usando el método ELISA descrito anteriormente en muestras de
 45 suero de los tubos de suero Greiner (GS) de 48 pacientes seleccionados al azar que requerían la determinación de
 analitos para sus condiciones clínicas.

La Figura 50 muestra los resultados. La concentración de fibrinógeno/fdp/FDP en estas muestras varió de 4,4 a 32
 50 µg/ml, en comparación con la concentración de fibrinógeno en estas muestras de plasma de 2,0-5,0 mg/ml. Estos
 datos muestran que se elimina un porcentaje superior o igual al 99 % de fibrinógeno mediante el proceso de
 coagulación en tubos de suero convencionales disponibles en el mercado. Estos datos también proporcionan un
 rango del intervalo de referencia de fibrinógeno en la preparación de suero en tubos de suero Greiner a partir de
 55 muestras de sangre de una población hospitalaria.

Ejemplo 9b: Niveles de fibrinógeno/fdp/FDP en muestras normales de suero y plasma

Se seleccionaron 36 muestras de suero normal (según lo determinado por los ensayos del tiempo de la protrombina,
 60 TTPa y fibrinógeno) para estudiar el efecto de la adición de PtPA (tubo de 300 ng/ml o 1,2 µg/4 ml) en los niveles de
 fibrinógeno/fdp/FDP. Se prepararon sueros en tubos de suero Greiner (tubos primarios) según el procedimiento
 convencional de Pathology Queensland antes de tomar alícuotas de dos muestras de suero iguales de 1 ml de cada
 tubo de suero Greiner en tubos de plástico sencillos (tubos secundarios). Se añadió PtPA (300 ng/ml o 1,2 µg/4 ml
 65 de tubo) a un tubo y un volumen igual (50 µl) de solución salina al segundo para proporcionar pares coincidentes de
 tubos secundarios.

Se midió la concentración de fibrinógeno/fdp/FDP en cada tubo secundario usando el método ELISA descrito anteriormente, y los resultados se muestran en la Figura 51. En ambos tubos secundarios, el fibrinógeno residual se redujo a menos del 1 % del presente en la sangre. Sin embargo, la adición de PtPA redujo aún más los niveles de fibrinógeno/fdp/FDP de una media de 12,8 µg/ml a 11,8 µg/ml. Esta reducción fue significativa ($p < 0,04$) en un análisis de ensayo t para muestras relacionadas. Por lo tanto, PtPA fue capaz de reducir aún más el fibrinógeno/fdp/FDP en suero, incluso en sueros individuales normales en los que los niveles residuales de fibrinógeno/fdp/FDP eran muy bajos. Las cantidades restantes muy bajas ($< 1,0$ %) probablemente sean moléculas que reaccionan con anticuerpos, pero que no pueden polimerizarse para formar un coágulo insoluble.

Luego se recogieron 9 muestras de sangre normales en cuatro tubos de suero diferentes: suero Greiner, suero BD, tubos BD RST y tubos sin aditivos Vacuette™ de Greiner que contenían PtPA. Se midió la concentración de fibrinógeno/fdp/FDP de cada tubo secundario usando el método de ELISA descrito anteriormente, y los resultados se muestran en la Figura 52. La concentración de fibrinógeno fue considerablemente menor en los sueros preparados en el tubo sin aditivos Vacuette™ de Greiner que contenía PtPA.

Se examinó luego la concentración de fibrinógeno/fdp/FDP en suero producida usando OsPA y ecarina. Las muestras de suero se prepararon a partir de sangre de 5 participantes normales en tubos de suero Greiner (GRS) y en tubos sin aditivos de Greiner que contenían OsPA (tubo de 0,50 µg/4 ml), ecarina (tubo de 0,63 unidades/4 ml) y PtPA (tubo de 1,2 µg/4 ml). La concentración de fibrinógeno/fdp/FDP en los sueros de cada tubo se midió usando el método de ELISA descrito anteriormente. En la Figura 53 se muestran los resultados. En todos los casos, los niveles residuales de fibrinógeno/fdp/FDP fueron menos de un 1 % de los de la sangre o plasma normal.

Experimento 9c: Niveles de fibrinógeno/fdp/FDP en muestras de suero preparadas a partir de pacientes heparinizados

Los pacientes sometidos a diálisis renal requieren niveles moderados de heparinización (1.000-10.000 U de heparina durante el período de tratamiento) para evitar accidentes protrombóticos durante la diálisis. Se escogieron 3 pacientes de esta categoría para probar la capacidad de los tubos con PtPA (tubo de 1,2 µg/4 ml) y los tubos BD RST para coagular de manera eficaz la sangre de los pacientes en diálisis en un tiempo de incubación de 5 minutos, en comparación con la coagulación de la sangre tomada en tubos de recogida de sangre de suero Greiner (GRS) y suero BD (BD SST II) en un período de coagulación de 30 minutos. La eficacia de la coagulación se determinó midiendo la concentración de fibrinógeno/fdp/FDP en los respectivos sueros usando el método de ELISA descrito anteriormente.

Los resultados se muestran en la Figura 54, y revelan que los niveles residuales de fibrinógeno/fdp/FDP en los sueros producidos con PtPA de la sangre heparinizada fueron comparables a los valores de los sueros producidos con PtPA de sangre normal (Figuras 51 y 53). Por el contrario, los niveles residuales de fibrinógeno/fdp/FDP en los sueros producidos en los tubos GRS, BDS y BD RST fueron mucho mayores. A estos niveles, la formación de coágulos latentes y microcoágulos son especialmente probables en presencia de heparina. Los valores de la Figura 54 para GRS, BDS y BDRST son estimaciones mínimas basadas en una sola dilución de la muestra.

Se recogieron muestras de sangre de 2 pacientes de cirugía cardíaca (tratados con 25.000-41.000 Unidades de heparina) en los siguientes tubos: tubos de plasma Greiner, tubos de suero Greiner, tubos de suero BD, tubos BD RST, tubos sin aditivos Vacuette™ de Greiner con PtPA añadido (tubo de 1,2 µg/4 ml), tubos sin aditivos Vacuette™ de Greiner con OsPA añadido (tubo de 0,50 µg/4 ml), tubos sin aditivos Vacuette™ de Greiner con 1,25 unidades/l de ecarina por tubo de 4 ml añadida (EC1) o tubos sin aditivos Vacuette™ de Greiner con 2,5 unidades/l de ecarina por tubo de 4 ml añadida (EC2).

La concentración de fibrinógeno/fdp/FDP en los sueros y el plasma de cada tubo se determinó usando el método de ELISA descrito anteriormente, y los resultados se muestran en la Figura 55. La concentración de fibrinógeno/fdp/FDP se redujo en gran medida en el suero obtenido usando los tubos que contenían activadores de la protrombina en comparación con el plasma y otros tubos de suero. Además, el tiempo permitido para la coagulación fue de solo cinco minutos con los tubos que contenían activadores de la protrombina en comparación con 30 minutos en los otros tubos o 60 minutos en los tubos para la sangre anticoagulada.

En resumen, los tubos que contenían activadores de la protrombina pudieron producir muestras de suero con una menor concentración de fibrinógeno/fdp/FDP residual que en las muestras de suero producidas usando tubos de suero o de plasma disponibles en el mercado. Para las muestras normales, el efecto fue relativamente bajo. Sin embargo, con las muestras heparinizadas, los activadores de la protrombina fueron capaces de producir suero con bajo contenido de fibrinógeno en comparación con el suero preparado en tubos de suero comerciales. Los resultados sugieren que debería poderse alcanzar una concentración suficientemente baja de fibrinógeno/fdp/FDP residual mediante el uso de un activador de la protrombina para evitar la coagulación latente o la precipitación en todas las muestras de suero. Esta capacidad de producir suero de "alta calidad" de pacientes con altas dosis de anticoagulantes (por ejemplo, atención cardíaca, diálisis) y en muestras "totalmente heparinizadas" de pacientes sometidos a cirugía cardíaca es útil.

EJEMPLO 10: CONCENTRACIÓN DE HEMOGLOBINA EN MUESTRAS DE PLASMA Y SUERO

El índice hemolítico se usa de forma rutinaria en patología química como una medida de la hemoglobina presente en las muestras de suero y plasma, y, por tanto, de la extensión de la lisis celular. La lisis de todos los tipos de células sanguíneas, incluyendo los eritrocitos, los glóbulos blancos y las plaquetas, se puede producir *in vivo*, durante la extracción de sangre y la preparación de suero/plasma y en reposo. La lisis celular *in vitro* ocurre comúnmente durante la recogida de muestras o la transferencia de muestras usando agujas de pequeño calibre o dispositivos de transferencia que normalmente están bajo presión. La lisis de los glóbulos rojos *in vivo* independiente puede ocurrir en las anemias hemolíticas. Durante la lisis de células *in vitro*, se libera contenido celular en el suero o plasma, alterando falsamente los resultados de algunos analitos; la liberación del contenido celular puede incluso causar la dilución de otros analitos si la hemólisis es extensa. La hemoglobina del plasma o suero puede causar problemas espectrales durante el análisis, y otros analitos celulares pueden tener una reacción cruzada. El suero normalmente contiene un poco más de hemoglobina que el plasma de heparina de litio, y se considera que se debe al proceso de coagulación, que lisa un pequeño número de células a medida que el coágulo se expande y se contrae. Por lo tanto, una baja concentración de hemoglobina es un criterio importante para una muestra de suero de "alta calidad".

El siguiente experimento se realizó para comparar el contenido de hemoglobina del suero producido en presencia y en ausencia de PtPA, y del plasma producido usando heparina de litio. Se tomaron muestras de sangre de 2 pacientes sometidos a terapia de anticoagulación con citrato y 9 participantes sanos. Las muestras se recogieron en tubos de plasma Greiner, tubos de suero Greiner y tubos sin aditivos Vacuette™ de Greiner que contenían PtPA (1,2 µg/4 ml de sangre). Se centrifugaron los tubos 5 minutos después de la extracción para los tubos de plasma Greiner y los tubos sin aditivos Vacuette™ de Greiner con PtPA, y 30 minutos para los tubos sin aditivos Vacuette™ de Greiner (sin PtPA). Las muestras se analizaron para determinar la hemoglobina en los 30 minutos posteriores a la centrifugación. Los resultados se muestran en la tabla 63.

Tabla 63: Concentraciones de hemoglobina en muestras de plasma y de suero.

Muestra	Concentración de hemoglobina (mg/l)		
	Plasma Greiner	Suero Greiner	Tubo sin aditivos Vacuette™ de Greiner con PtPA
Número de muestras (2 participantes citrados y 9 participantes sanos)	11	11	11
Media	55	67	46
Desviación típica	26	28	25

La concentración media de hemoglobina en las muestras de plasma fue de 55 mg/l, algo inferior a los 67 mg/l encontrados para el suero Greiner, como era de esperar según la información publicada. El valor medio para el suero con PtPA fue de 46 mg/l, considerablemente inferior al encontrado para el suero Greiner e incluso más bajo que el encontrado para el plasma. Las desviaciones típicas de la media son altas, debido a la variación individual de una persona a otra. No dan una estimación de la importancia de las diferencias entre los tres tipos de tubos para una persona cualquiera. Para verificar la importancia de estas diferencias, se realizaron dos ensayos t para muestras relacionadas usando los datos de las 11 muestras de sangre. Los resultados fueron los siguientes:

plasma Greiner frente a suero Greiner: $p = 0,1243$

Tubos de suero Greiner frente a tubos sin aditivos Vacuette™ de Greiner con PtPA: $p = 0,0188$ ($p < 0,05$ estadísticamente significativa)

Tubos de plasma Greiner frente a tubos sin aditivos Vacuette™ de Greiner con PtPA: $p = 0,1038$

Las conclusiones que pueden extraerse de este ejemplo son las siguientes:

(1) La concentración de hemoglobina en las muestras de plasma preparadas en los tubos de plasma Greiner fue inferior a la del suero preparado en tubos de suero Greiner, como era de esperar según la información publicada;

(2) la concentración de hemoglobina en los sueros preparados en los tubos sin aditivos Vacuette™ de Greiner con PtPA fue significativamente inferior a la del suero Greiner. El nivel más bajo de hemoglobina en estas muestras de suero puede reflejar la velocidad de coagulación mucho más rápida, lo que limita la cantidad de lisis celular que se produce durante el proceso de coagulación; y

(3) La concentración media de hemoglobina en las muestras de suero con PtPA fue inferior a la de las muestras de plasma, y la diferencia fue de significación límite ($p = 0,1038$).

Por lo tanto, el uso del tubo con PtPA dio sueros de mayor calidad en términos de contenido de hemoglobina que el uso del tubo de suero comercial Greiner.

EJEMPLO 11: PRESENCIA DE CÉLULAS Y CONTENIDO CELULAR EN MUESTRAS DE PLASMA Y SUERO

El plasma de heparina de litio preparado en tubos disponibles en el mercado contiene células residuales en suspensión o en la capa leucocítica de encima de la barrera de gel en contacto con el plasma tras la centrifugación. El suero preparado de las muestras de participantes sanos en tubos disponibles en el mercado contienen menos células en contacto con el suero (en comparación con el plasma). El almacenamiento del plasma y del suero durante al menos 7 días a 2-8 °C es un requisito reglamentario en Australia en virtud del Consejo Asesor Nacional de Acreditación de Laboratorios de Patología (NPACC) en caso de nuevo análisis o solicitud de análisis adicional. La presencia de células puede tener dos efectos durante el almacenamiento y el análisis del suero o plasma. En primer lugar, las células se pueden lisar, liberando contenidos celulares (por ejemplo, K⁺, lactato deshidrogenasa) en el suero o plasma. Esto puede conducir a importantes diferencias entre las mediciones realizadas inmediatamente después de la centrifugación y las mediciones realizadas después de un período de almacenamiento. En segundo lugar, las células siguen siendo metabólicamente activas, y pueden consumir cantidades significativas de nutrientes (por ejemplo, de glucosa) y liberar productos metabólicos (por ejemplo, lactato) durante el almacenamiento. Incluso se pueden observar cambios en las muestras de sangre de muchos tubos cuando las muestras se almacenan durante el tiempo de coagulación recomendado de 30 minutos cuando las muestras son de participantes sanos.

El grado de contaminación celular es, por lo tanto, un importante criterio de calidad para las muestras de suero y una ventaja importante del uso del suero frente al plasma.

Se realizaron los siguientes experimentos para comparar el suero preparado usando PtPA con el suero preparado usando tubos de suero Greiner y el plasma de heparina de litio preparado usando tubos de plasma Greiner. El grado de contaminación de las muestras de suero y plasma por las células y por el contenido celular se puede evaluar usando varios marcadores de la contaminación. Tres marcadores de contaminación celular que se usaron en este caso son: el aumento de la actividad lactato deshidrogenasa (LD) en el almacenamiento; la disminución de la concentración de glucosa en el almacenamiento; y la observación directa de células.

Ejemplo 11a: Comparación del suero de PtPA con el plasma de heparina de litio de participantes sanos preparados tubos disponibles en el mercado

Se recogió sangre de 10 participantes sanos en tubos de plasma Greiner y tubos de suero Greiner que contenían PtPA, preparados de la siguiente manera. Se limpió el interior de los tubos de suero Greiner para eliminar los procoagulantes/aditivos de Greiner, llenando los tubos con agua desionizada estéril, se invirtieron ~20 veces, se dejaron reposar 10 minutos, y a continuación, se frotaron la pared interior y la parte interna de la tapa del tubo con un bastoncillo de algodón estéril sin alterar la barrera del gel. Se desechó el contenido, y los tubos se llenaron/invirtieron/enjuagaron 3 veces con agua desionizada. Finalmente, se colocaron los tubos limpios en un horno de secado a 40 °C para secar por completo las gotas de agua antes de dispensar el PtPA (1,2 µg/4 ml de sangre). A continuación, se recogió sangre en los tubos. Se centrifugaron los dos tubos (plasma y PtPA Greiner) de cada participante, e inmediatamente, se analizaron los niveles de lactato deshidrogenasa (LD) y glucosa (tiempo cero). Las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente (21 °C) y se volvieron a analizar aproximadamente 8 horas más tarde en el mismo analizador. Los resultados se muestran en las tablas 64 y 65.

Tabla 64: Actividad LD (U/l) de las muestras de 10 participantes medida a las 0 y 8 horas de la centrifugación almacenadas a 21 °C.

A	Plasma Greiner				PtPA			
	0 h	8 h	8-0 h*	% 8-0 h*	0 h	8 h	8-0 h*	% 8-0 h*
Media	177	199	22	+ 12,5	175	173	1,3	-0,6
DT	14	23	16	9,2	19	16	3,4	2,0

* = Diferencia entre 8 horas y 0 horas, y porcentaje de la diferencia entre 8 horas y 0 horas.

Tabla 65: Concentración de glucosa (mmol/l) de las muestras de 10 participantes medida a las 0 y a las 8 horas de la centrifugación almacenadas a 21 °C.

B	Plasma Greiner				PtPA			
	0 h	8 h	8-0 h*	% 8-0 h*	0 h	8 h	8-0 h*	% 8-0 h*
Media	5,1	4,7	0,5	-9,1	5,2	5,1	0,08	-1,5
DT	0,8	0,9	0,2	5,1	0,8	0,8	0,04	0,9

* = Diferencia entre 8 horas y 0 horas, y porcentaje de la diferencia entre 8 horas y 0 horas.

En las muestras de suero de los tubos con PtPA, los resultados de LD y glucosa mostraron un cambio del 0,6 % y 1,5 % durante el período de 8 horas en comparación con el cambio del 12,5 % y 9,1 % para las muestras de tubos de plasma Greiner, respectivamente. En las muestras de plasma, la presencia de células dio lugar al consumo de glucosa, y aumentó la LD debido a la filtración de la células lisadas.

Los resultados confirman que la coagulación de la sangre con PtPA elimina las células de manera eficaz, y esto evita cualquier cambio significativo en los analitos más afectados, glucosa y LD, durante hasta 8 horas. Por lo tanto, la inclusión de PtPA en un tubo de suero proporcionó suero estable de alta calidad de las muestras de sangre de los participantes sanos.

Ejemplo 11b: Contaminación celular de suero y plasma preparados de pacientes anticoagulados

Se tomaron muestras de sangre de dos participantes (P1 y P2) sometidos a cirugía cardíaca que habían recibido en total: P1-30.000 y P2-35.000 unidades de heparina justo antes de la extracción de sangre (en los 15 minutos posteriores a la infusión de heparina). Las muestras se extrajeron en jeringas simples de 50 ml (BD Plastipak n.º REF 300866) llenadas con ~30 ml de sangre. Las jeringas fueron entregadas al laboratorio a los 15 minutos de la extracción. Los siguientes tubos se llenaron de sangre: tubo de plasma Greiner, tubo de suero Greiner y tubo de suero Greiner (limpiado según el procedimiento anterior) que contenía PtPA (1,2 µg/4 ml) de sangre). Los tubos que contenían plasma y PtPA se centrifugaron nada más llegar al laboratorio. El tubo de suero Greiner se dejó reposar durante 60 minutos antes de la centrifugación. Las muestras se analizaron, luego se dejaron reposar a temperatura ambiente (21 °C) y se volvieron a analizar aproximadamente 24 horas más tarde en el mismo analizador. Los resultados se muestran en las tablas 66 y 67.

Tabla 66: Actividad LD (U/L) de muestras de 2 participantes sometidos a cirugía cardíaca medida a las 0 y 24 horas de la centrifugación almacenadas a 21 °C.

A	Plasma Greiner				Suero Greiner				Suero con PtPA			
	0 h	24 h	Diferencia (24-0 h)	% de Diferencia (24-0 h)	0 h	24 h	Diferencia (24-0 h)	% de Diferencia (24-0 h)	0 h	24 h	Diferencia (24-0 h)	% de Diferencia (24-0 h)
Media	87	94	8	+9	87	98	11	+ 13	84	81	-3	-3
DT	11	1	9	12	8	9	1	1	9	10	1	1

Tabla 67: Concentración de glucosa (mmol/l) de muestras de 2 participantes sometidos a cirugía cardíaca medida a las 0 y 24 horas de la centrifugación almacenadas a 21 °C.

B	Plasma Greiner				Suero Greiner				Suero con PtPA			
	0 h	24 h	Diferencia (24-0 h)	% de Diferencia (24-0 h)	0 h	24 h	Diferencia (24-0 h)	% de Diferencia (24-0 h)	0 h	24 h	Diferencia (24-0 h)	% de Diferencia (24-0 h)
Media	5,4	4,6	-0,8	-14,8	5,4	4,7	-0,8	-13,9	5,3	5,3	-0,1	-0,9
DT	0,1	0,1	0,0	0,4	0,1	0,1	0,1	1,0	0,1	0,1	0,1	1,3

En las muestras de suero producidas por PtPA, los resultados de LD y glucosa mostraron un cambio del -3 y -0,9 % a las 24 horas en comparación con el cambio del 9 % y -14,8 % en el plasma de heparina de litio, y del 13 % y -13,9 % de las muestras de suero, respectivamente. De forma similar al grupo de participantes sanos de los Ejemplos 11a, la presencia de células en plasma produjo el consumo de la glucosa y, con la lisis celular, se aumentó la actividad LD. Los tubos de suero Greiner mostraron resultados parecidos al plasma, como era de esperar, ya que las muestras nunca se coagularon.

En el tubo de suero Greiner no se observó coagulación sanguínea ni se detectó coagulación latente a simple vista ni mediante analizadores a largo de las 24 horas posteriores a la centrifugación. Las muestras de los tubos que contenían PtPA se coagularon en 3-5 minutos. Los 3 tubos del participante P1 se fotografiaron para indicar la presencia de células encima de la barrera del gel. En el tubo de PtPA, había muy pocas células presentes encima o dentro de la barrera del gel, en contraste con los otros dos tubos, en los que las células eran visibles por y encima de la barrera del gel.

Se retiró suavemente de cada uno de los 3 tubos la mayor parte del contenido de plasma o suero sin perturbar la capa de encima de la barrera de gel, dejando aproximadamente 0,5 ml del plasma o suero en el tubo. Se volvió a mezclar el plasma o suero residual de cada tubo con la capa leucocitaria, y se transfirió a una centrifugadora de portaobjetos, Cytospin (Shandon-Elliott Cytospin, Shandon-Elliott Instruments Limited) para concentrar las células y producir un portaobjetos de las células teñido con Giemsa, estroma celular, etc., para el examen microscópico. Las

diapositivas (que se muestran en la Figura 56) indican claramente la presencia de células en abundancia en el plasma, un poco menos en el suero Greiner, y las mínimas células en el suero producido con PtPA.

- 5 Estos resultados confirman que la coagulación de la sangre con PtPA se logró incluso en los llamados participantes "completamente heparinizados", en un tiempo muy corto, < 5 minutos. Tras la centrifugación, el número de células residuales fue mínimo e insuficiente para tener un efecto sobre la actividad LD o las concentraciones de glucosa.

Ejemplo 11c: Efecto del almacenamiento prolongado de muestras de suero y plasma de un participante sometido a cirugía cardíaca sobre los analitos

- 10 Las 3 muestras del participante de cirugía cardíaca P2 después de 24 horas a temperatura ambiente (21 °C) se almacenaron en los tubos primarios a 4 °C durante 13 días más, (total de 14 días o 336 horas después de la extracción) y luego se volvieron a analizar para determinar el K⁺, la glucosa, la LD y el fosfato (Pi). Los resultados se muestran en la tabla 68.

- 15 Tabla 68: Concentración de analitos en muestras de suero y plasma de un participante sometido a cirugía cardíaca medida a 0, 24 y 336 horas después de la centrifugación

Analito	0 h	24 h	336 h	Diferencia (24-0)	% de Diferencia (24-0)	Diferencia (336-0)	% de Diferencia (336-0)
Plasma Greiner							
K ⁺ (mmol/l)	4,7	4,6	4,9	-01	-2,1	0,2	4,3
Glucosa (mmol/l)	5,5	4,1	3,1	-1,4	-25,5	-2,4	-43,6
LD (U/l)	79	93	208	14	17,7	129	163,0
Pi (mmol/l)	0,59	0,6	0,69	0,01	1,7	0,1	16,9
Suero Greiner							
K ⁺ (mmol/l)	4,7	4,7	5,2	0	0	0,5	10,6
Glucosa (mmol/l)	5,5	4,7	3,8	-0,8	-14,5	-1,7	-30,9
LD (U/l)	81	91	180	10	12,3	99	122,2
Pi (mmol/l)	0,58	0,63	10,74	0,05	7,8	10,16	27,6
Suero con PtPA							
K ⁺ (mmol/l)	4,6	4,6	4,6	0	0	0	0
Glucosa (mmol/l)	5,4	5,3	5,3	0,1	1,9	-0,1	-1,9
LD (U/l)	77	74	64	3	3,9	-13	-20,3
Pi (mmol/l)	0,57	0,58	0,65	-0,01	-1,8	0,08	12,3

- 20 A diferencia del plasma de heparina de litio y el "suero" de los tubos Greiner, la muestra de suero con PtPA mostró cambios no relevantes en los resultados de K⁺ y glucosa, mientras que los resultados de LD y Pi mostraron cambios mínimos.

- 25 En este caso extremo, el suero producido usando PtPA proporcionó fácilmente el tipo de muestra más estable que permitirá a los laboratorios proporcionar pruebas de analitos adicionales en fechas posteriores y confiar en que los resultados sean precisos. La caída del 20 % en la actividad LD en la muestra de PtPA probablemente se debió a la lenta desnaturalización de la LD existente en el almacenamiento.

Conclusión general

- 30 El suero producido por PtPA ofrece una estabilidad sobresaliente a las concentraciones de analito que, con mayor probabilidad, se verán afectadas por la eliminación incompleta de las células del componente de plasma o suero de encima de la barrera de gel durante el proceso de coagulación y/o centrifugación en todos los pacientes. Los resultados de los presentes inventores también muestran por observación directa la relativa ausencia de células de los sueros producidos por PtPA en comparación con el plasma de heparina de litio Greiner preparado a partir de
- 35 participantes sanos o pacientes con altas dosis de heparina.

EJEMPLO 12: MEDICIÓN DE ANALITOS BIOQUÍMICOS EN MUESTRAS DE PLASMA Y SUERO PREPARADAS EN TUBOS COMERCIALES Y MUESTRAS DE SUERO PREPARADAS USANDO LOS ACTIVADORES DE LA PROTROMBINA DE VENENO ECARINA, PTPA, Y OSPA)

- 40 Como se ha comentado en partes anteriores de la presente memoria descriptiva, los actuales tubos de recogida de sangre disponibles en el mercado no pueden producir suero completamente coagulado de todas las muestras de sangre de una manera oportuna para satisfacer la calidad y las expectativas de tiempo de respuesta de los

laboratorios de bioquímica para la atención óptima del paciente. Los resultados de los ejemplos anteriores demuestran que los activadores de la protrombina pueden emplearse para producir una muestra de suero de calidad rápidamente con bajos niveles de fibrinógeno/fdp/FDP y sin contaminaciones celulares (según se determina mediante examen visual, claridad del suero y análisis) en sangre de una amplia variedad de pacientes/individuos.

Por lo tanto, era importante determinar si los activadores de la protrombina podrían interferir en el análisis de los analitos usados comúnmente para el tratamiento clínico de los pacientes. Los activadores de la protrombina son enzimas proteolíticas que podrían, en principio, escindir proteínas séricas o proteínas implicadas en la metodología analítica, lo que afectaría a los resultados analíticos. Las proteínas participan en métodos analíticos, ya sea como el analito de interés o como reactivos (por ejemplo, enzimas, anticuerpos) usados para medir los analitos de interés.

El fin de este ejemplo era investigar si el suero preparado usando activadores de la protrombina proporciona los mismos resultados analíticos que el plasma y el suero preparados en los tubos actuales disponibles en el mercado usando los métodos comerciales actuales.

No es raro que se soliciten y realicen más de 30 analitos bioquímicos a partir de un solo tubo de suero o plasma. A medida que el intervalo de analitos aumenta y los volúmenes analíticos por analito disminuyen con las mejoras tecnológicas, el número de análisis de un solo tubo aumentará aún más. Por lo tanto, es esencial que los aditivos para tubos, en concreto, los procoagulantes, sean inertes y no impongan ningún efecto analítico sobre los analitos, a la vez que proporcionen muestras de la más alta calidad para la estimación más exacta de los analitos.

Se usaron procedimientos de prueba analíticos convencionales en los siguientes experimentos para cada uno de los 33 ensayos que se enumeran a continuación:

Ensayo 1: Sodio (Na^+)

Ensayo 2: Potasio (K^+)

Ensayo 3: Cloruro (Cl^-)

Ensayo 4: Bicarbonato (HCO_3^-)

Ensayo 5: Glucosa (Glu)

Ensayo 6: Urea (Urea)

Ensayo 7: Creatinina (Creat)

Ensayo 8: Urato (Urato)

Ensayo 9: Proteína total (PT o Prot T)

Ensayo 10: Albúmina (Alb)

Ensayo 11: Bilirrubina total (Bili T)

Ensayo 12: Fosfatasa alcalina (FA)

Ensayo 13: Gamma-glutamyl transferasa (GGT)

Ensayo 14: Alanina aminotransferasa (ALT)

Ensayo 15: Aspartato aminotransferasa (AST)

Ensayo 16: Lactato Deshidrogenasa (LD)

Ensayo 17: Creatina quinasa (CK)

Ensayo 18: Calcio total (Ca T)

Ensayo 19: Fosfato (Pi o Phos)

Ensayo 20: Magnesio (Mg^{2+})

Ensayo 21: Lipasa (Lipasa)

Ensayo 22: Colesterol (Col)

Ensayo 23: Triglicéridos*

5 Ensayo 24: Colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C o HDL) Ensayo 25: Hierro (Fe^{2+})

Ensayo 26: Transferrina (Trf)

Ensayo 27: Proteína reactiva C (CRP)

10 Ensayo 28: Ensayo de cortisol (Cortisol)

Ensayo 29: Tiroxina libre (FT4)

15 Ensayo 30: Hormona estimulante de la tiroides (TSH)

Ensayo 31: Ferritina (Ferritina)

Ensayo 32: Troponina (Tnl)

20 Ensayo 33: Índice hemolítico (Índice Hem)**

Ensayo 34: Índice icterico*

25 Ensayo 35: Índice de lipemia

**Los triglicéridos no se midieron en estos experimentos debido a la presencia de glicerol en la preparación de PtPA. Tampoco se determinaron en este ensayo los índices icterico y lipémico.

30 ** Véase también el Ejemplo 10.

Análisis de ensayo

35 El análisis se realizó en los analizadores de química general DxC800 de Beckman y un analizador de inmunoensayo Dxl800 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EE.UU.). Las muestras se cargaron en los mismos instrumentos al mismo tiempo y de 1 a 2 horas después de la centrifugación, excepto cuando se encontró coagulación latente recurrente.

40 Los analitos probados más los niveles de hemólisis semicuantitativos se enumeran en las tablas de resultados. El límite superior de imprecisión del coeficiente de variación (CV) entre ciclos de las dos y tres concentraciones de control de calidad interno para los 35 analitos probados en los analizadores DxC800 de Beckman, y el analizador Dxl800, respectivamente, se muestran en la Tabla 69. También se midió el tiempo parcial de la tromboplastina activa (TTPa) en un AC^{TOPS}. (Instrumentation Laboratory, Lexington AM, EE. UU.), pues era difícil determinar la concentración exacta de anticoagulante en las muestras de sangre de los participantes en el momento de la obtención de la muestra en la unidad de cuidados cardíacos y de los participantes en diálisis. En todos los casos, los

45 resultados coincidieron con el grado de anticoagulación indicado.

Análisis de datos

50 Se obtuvieron los resultados de cada prueba, y luego se realizó el análisis de datos de la siguiente manera. Se calcularon la media y la desviación típica (DT) para cada prueba para cada tipo de tubo. También se calculó la diferencia (real y %) entre cada par de resultados para cada prueba entre los diferentes tubos (por ejemplo, el tipo de resultado del tubo de PtPA frente al tipo de resultado del suero Greiner). El % de diferencia se comparó entonces con los valores de precisión entre ciclos obtenidos en los analizadores (Tabla 69) para determinar si existían diferencias analíticamente significativas entre los diferentes tubos de suero, y los diferentes tubos de suero frente a

55 los tubos de plasma. Los datos de los participantes también se separaron en participantes sanos y participantes anticoagulados, y se realizó el mismo análisis. En caso de no obtenerse una medición para un analito en ninguno de los tres tubos (debido a coágulos latentes recurrentes que condujeron a muestras insuficientes, insuficientes muestras recogidas, no solicitadas en el analizador o reactivo insuficiente), el resultado no se incluyó en el cálculo de la variabilidad en el número de muestras analizadas por ensayo.

60 Tabla 69: Imprecisión del control de calidad (QC) en los analizadores DxC800 y Dxl800 de Beckman (* Dxl800)

Analito	Nivel de QC 1			Nivel de QC 2			Nivel de QC 3		
	Media	DT	% de VC	Media	DT	% de VC	Media	DT	% de VC
Na ⁺	132	1,27	1,0	150	1,33	0,9			

Analito	Nivel de QC 1			Nivel de QC 2			Nivel de QC 3		
	Media	DT	% de VC	Media	DT	% de VC	Media	DT	% de VC
K ⁺	3,9	0,06	1,4	6,0	0,07	1,2			
Cl ⁻	85	1,17	1,4	100	1,19	1,2			
HCO ₃ ⁻	17	0,66	3,8	29	0,85	2,9			
Gluc	4,8	0,12	2,6	16,7	0,28	1,8			
Urea	5,2	0,17	3,3	15,9	0,41	2,6			
Creat	68	3,34	4,9	491	8,93	1,8			
Urato	0,23	0,001	1,9	0,49	0,01	1,5			
Prot T	41	0,73	1,8	67	1,07	1,6			
Alb	26	0,37	1,4	40	0,54	1,3			
Bili T	21	1,37	6,4	93	1,96	2,1			
FA	106	2,79	2,6	471	7,93	1,7			
GGT	38,7	2,03	5,3	155	2,88	1,9			
ALT	25	1,52	6,2	94	2,00	2,1			
AST	34	1,35	3,9	201	2,39	1,2			
LD	149	3,21	2,2	408	5,65	1,4			
CK	139	2,53	1,8	459	5,8	1,3			
Ca T	2,07	0,03	1,6	2,86	0,04	1,3			
Phos	1,00	0,02	1,9	2,86	0,04	1,5			
Mg ²⁺	0,84	0,02	2,5	1,63	0,04	2,3			
Lipasa	29	2,39	8,2	57	4,05	7,1			
Col	3,0	0,05	1,7	6,5	0,15	2,3			
Trig	1,0	0,04	3,6	2,0	0,05	2,7			
HDL	1,1	0,04	3,5	1,9	0,05	2,6			
Fe ²⁺	10	0,29	2,8	34	1,93	5,7			
Trf	1,0	0,04	3,5	2,3	0,08	3,5			
CRP	4,6	0,36	7,9	10,0	0,55	5,4			
TnI*	0,052	0,01	16,1	0,55	0,04	7,9	10,2	0,69	6,7
Cortisol*	139	8,85	6,4	552	28,48	5,2	906	41,7	4,6
fT4*	7,51	0,62	8,2	23,93	0,94	4,0	50,9	1,92	3,8
TSH*	0,71	0,05	7,1	4,17	0,26	6,3	23,1	1,53	6,6
Ferritina*	19	1,68	8,8	159	9,67	6,1	358	22,42	6,3

Ejemplo 12a: Comparación del suero de PtPA con suero y plasma de heparina de litio preparados en tubos comerciales

- 5 Se reclutó un total de 61 participantes. Los 61 participantes eran adultos, > 18 años de edad, siendo una mezcla de varones y mujeres. Los participantes consistían en dos grupos: 26 voluntarios sanos y 35 pacientes anticoagulados.

De los 35 pacientes anticoagulados, 1 era un paciente ambulatorio con dosis bajas de warfarina y 34 pacientes estaban hospitalizados.

- 10 De los 34 pacientes hospitalizados, 11 se sometieron a cirugía cardíaca, 8 eran pacientes de la unidad de cuidados cardíacos y 15 estaban en diálisis.

- 15 Los 11 pacientes hospitalizados sometidos a cirugía cardíaca habían recibido un total de 25.000 a 41.000 unidades de heparina en el momento de la extracción de sangre, que fue en los 30 minutos posteriores a la infusión de heparina. Las muestras se recogieron mientras los participantes estaban en derivación coronaria (en la que la sangre es bombeada por una máquina, no por el corazón).

- 20 Los 8 participantes de la unidad de cuidados cardíacos se reclutaron la noche anterior a la extracción de la muestra, y recibieron heparina por infusión IV, 950-1450 unidades de heparina por hora. Siete permanecieron con infusión IV

de heparina (la extracción de sangre fue ≥ 12 horas después de comenzar la infusión IV de heparina) en el momento de la extracción de las muestras, y el otro se debía someterse a cirugía ese día, por lo que se suspendió la infusión aproximadamente tres horas antes de la extracción de muestras (la extracción de sangre fue > 9 horas después de que la infusión IV hubiera comenzado y ~ 3 horas después de que se detuviera la infusión IV de heparina). A partir de la información que figuraba en los registros de los pacientes, la concentración de heparina en la infusión y la velocidad de infusión no cambiaron para los participantes durante el período comprendido entre el inicio de la infusión IV de heparina y la extracción de sangre.

De los 15 pacientes hospitalizados en diálisis, 12 recibieron infusión IV de heparina, 1 recibió warfarina/heparina (~ 1.750 - 7.000 unidades de heparina, dosis inicial en bolo más una dosis de recarga por hora) y 2 recibieron clexano. La sangre de estos pacientes se recogió al menos una hora después del comienzo de la diálisis.

La sangre se extrajo usando un orden de extracción estandarizado. La sangre se extrajo por punción venosa en los voluntarios sanos, a través del puerto de la derivación coronaria en los pacientes cardíacos, y a través de la línea de sangre de los pacientes de diálisis. Se usaron los siguientes tubos:

tubo de citrato Vacuette™ de Greiner (para los estudios de coagulación);

tubo sin aditivos Vacuette™ de Greiner con PtPA añadido (tubo de $1,2 \mu\text{g}/4 \text{ ml}$) (PtPA);

tubo de plasma Vacuette™ de Greiner (GLH);

tubo de plasma Vacutainer™ de BD/PST II (BDLH);

tubo de suero Vacuette™ de Greiner (GRS);

tubo de suero de BD/SST II (BDS); y

tubo BD RST (BD RST).

La sangre para el tubo que contenía PtPA se extrajo en una jeringa sencilla y luego se transfirió desde la jeringa al tubo Greiner que contenía PtPA sin una aguja para minimizar la lisis celular.

El suero Greiner y los tubos BD SST se dejaron coagular durante el tiempo convencional de 30 minutos para los participantes sanos y de 60 minutos para los participantes anticoagulados. Estos tubos se examinaron visualmente en busca de la formación de coágulos antes de cargarlos en la centrifugadora.

Los tubos BD RST y de PtPA se examinaron visualmente en busca de la formación de coágulos a los 5 minutos para todos los participantes en el punto de extracción (flebotomía o unidad clínica). Las muestras de BD RST para los participantes sanos y para los participantes anticoagulados que formaron un coágulo sólido a los 5 minutos se centrifugaron tan pronto como fueron entregadas al laboratorio (< 20 minutos). En caso de coagulación incompleta, las muestras se volvieron a verificar cada 10-15 minutos para determinar la coagulación y se dejaron coagular durante 60 minutos como máximo. Los tubos de heparina de litio y PtPA se centrifugaron inmediatamente después su entrega en el laboratorio (< 20 minutos desde la extracción).

Todos los tubos se centrifugaron a 3.000 g durante 10 minutos a 20°C en centrifugadoras de cubo oscilante, y luego se almacenaron a $\sim 21^\circ\text{C}$. Los tubos se examinaron visualmente en busca de coagulación latente inmediatamente después de la centrifugación y de nuevo justo antes de la carga en los analizadores. Estos tubos (tubos primarios) se usaron para el análisis, excepto en los casos en que se observó coagulación latente. En los tubos en los que se observó coagulación latente, el suero de los tubos primarios se transfirió a un tubo alícuota, se volvió a centrifugar para eliminar los coágulos, y el suero limpio se transfirió a otro tubo alícuota (tubo secundario) que se usó para el análisis. El tubo sin aditivos Greiner no contenía una barrera de gel en suero, por lo tanto, el suero generado con PtPA también se transfirió a un tubo secundario para su análisis, a fin de evitar una nueva mezcla y un contacto prolongado con las células.

Resultados

Los resultados se muestran en la tabla 70. Además, en la Figura 57, se proporciona un ejemplo de los resultados para la medición de la proteína total (PT). El gráfico de la izquierda muestra la media con el valor de desviación típica de todos los resultados de pacientes normales ($n = 26$) para cada tipo de tubo. El gráfico central muestra el valor medio de todos los resultados de los pacientes ($n = 61$) para cada tipo de tubo. El gráfico de la derecha muestra el valor medio de los resultados para los pacientes cardíacos ($n = 11$) para cada tipo de tubo. Las unidades del eje y son g/l de proteína. Las barras de error son la desviación típica.

Comparación de sueros de PtPA con sueros de tubos comerciales de participantes sanos y anticoagulados

No se observaron diferencias significativas con ninguno de los analitos. Esta conclusión se basa en la comparación de los valores medios de la prueba de la Tabla 70 y un análisis estadístico emparejado descrito anteriormente.

5 Comparación de sueros de PtPA con plasma de heparina de litio en tubo comercial de participantes sanos y anticoagulados

10 Se observaron diferencias significativas en algunos analitos (K^+ , PT, AST y Pi) como era de esperar debido a las diferencias bien establecidas entre el plasma y el suero. Los sueros preparados en los tubos de suero disponibles en el mercado mostraron diferencias analíticas similares del plasma a las mostradas con los sueros de PtPA.

Tabla 70: Datos analíticos para 32 analitos en muestras de suero y plasma.

Número de muestras	Analito	Unidades	Media $\pm$ DT					
			PtPA	GLH	BDLH	GS	BDS	BD RST
60	Na^+	mmol/l	136,9 $\pm$ 2,24	137,4 $\pm$ 2,44	137,2 $\pm$ 2,38	137,5 $\pm$ 2,29	137,5 $\pm$ 2,34	137,4 $\pm$ 2,38
61	K^+	mmol/l	4,09 $\pm$ 0,59	3,91 $\pm$ 0,63	3,93 $\pm$ 0,65	4,13 $\pm$ 0,62	4,15 $\pm$ 0,60	4,07 $\pm$ 0,60
61	Cl^-	mmol/l	104,1 $\pm$ 3,8	104,6 $\pm$ 4,2	104,8 $\pm$ 4,1	104,6 $\pm$ 4,0	104,8 $\pm$ 3,8	104,7 $\pm$ 3,9
61	HCO_3^-	mmol/l	24,8 $\pm$ 2,8	25,8 $\pm$ 3,0	25,3 $\pm$ 2,7	25,7 $\pm$ 3,1	25,1 $\pm$ 2,9	25,0 $\pm$ 3,0
61	Gluc	mmol/l	6,2 $\pm$ 2,09	6,3 $\pm$ 2,15	6,3 $\pm$ 2,11	6,2 $\pm$ 2,07	6,2 $\pm$ 2,11	6,3 $\pm$ 2,08
61	Urea	mmol/l	5,3 $\pm$ 2,0	5,3 $\pm$ 2,0	5,4 $\pm$ 2,0	5,3 $\pm$ 2,1	5,4 $\pm$ 2,1	5,3 $\pm$ 2,1
61	Creat	μ mol/l	134,1 $\pm$ 112,8	135,1 $\pm$ 115,0	136,3 $\pm$ 114,7	137,1 $\pm$ 116,0	136,7 $\pm$ 116,0	138,1 $\pm$ 116,6
60	Urato	mmol/l	0,27 $\pm$ 0,11	0,27 $\pm$ 0,12	0,27 $\pm$ 0,12	0,28 $\pm$ 0,11	0,28 $\pm$ 0,11	0,27 $\pm$ 0,12
61	PT	g/l	62,6 $\pm$ 13,0	65,0 $\pm$ 13,2	65,5 $\pm$ 13,3	63,0 $\pm$ 12,6	63,0 $\pm$ 12,5	62,8 $\pm$ 12,6
61	Alb	g/l	36,1 $\pm$ 8,3	35,9 $\pm$ 8,1	35,9 $\pm$ 8,1	36,1 $\pm$ 8,3	36,1 $\pm$ 8,3	36,2 $\pm$ 8,3
58	Bili T	μ mol/l	13,5 $\pm$ 3,8	13,6 $\pm$ 3,7	13,4 $\pm$ 3,4	13,3 $\pm$ 3,6	13,4 $\pm$ 4,0	13,2 $\pm$ 3,8
61	FA	U/l	74,1 $\pm$ 26,9	68,9 $\pm$ 26,5	69,4 $\pm$ 26,6	71,3 $\pm$ 26,9	71,7 $\pm$ 27,5	71,4 $\pm$ 26,9
61	GGT	U/l	27,9 $\pm$ 17,6	28,3 $\pm$ 17,0	28,1 $\pm$ 16,9	27,3 $\pm$ 17,1	28,1 $\pm$ 17,1	227,8 $\pm$ 17,5
61	sALT	U/l	30,4 $\pm$ 19,9	29,6 $\pm$ 18,8	29,6 $\pm$ 19,1	30,4 $\pm$ 19,1	29,8 $\pm$ 19,2	30,7 $\pm$ 20,1
59	sAST	U/l	34,2 $\pm$ 37,7	32,5 $\pm$ 37,5	32,6 $\pm$ 36,9	32,0 $\pm$ 34,9	32,6 $\pm$ 38,7	32,4 $\pm$ 39,1
58	sLD	U/l	212,9 $\pm$ 110,0	215,4 $\pm$ 113,1	215,3 $\pm$ 110,7	213,8 $\pm$ 106,0	222,8 $\pm$ 120,0	212,5 $\pm$ 119,2
59	sCK	U/l	147,1 $\pm$ 250,3	146,6 $\pm$ 250,0	145,3 $\pm$ 242,8	146,0 $\pm$ 241,3	149,4 $\pm$ 259,6	147,7 $\pm$ 253,3
61	Ca T	mmol/l	2,19 $\pm$ 0,26	2,17 $\pm$ 0,24	2,17 $\pm$ 0,24	2,20 $\pm$ 0,26	2,20 $\pm$ 0,26	2,19 $\pm$ 0,26
61	Pi	mmol/l	1,07 $\pm$ 0,28	1,02 $\pm$ 0,28	1,02 $\pm$ 0,28	1,08 $\pm$ 0,30	1,08 $\pm$ 0,30	1,08 $\pm$ 0,30
57	Mg^{2+}	mmol/l	0,94 $\pm$ 0,19	0,95 $\pm$ 0,20	0,94 $\pm$ 0,19	0,94 $\pm$ 0,18	0,94 $\pm$ 0,20	0,93 $\pm$ 0,20
59	Lipasa	U/l	28,2 $\pm$ 9,0	28,3 $\pm$ 9,0	28,3 $\pm$ 8,9	28,2 $\pm$ 9,0	28,6 $\pm$ 9,2	28,2 $\pm$ 9,0
57	Col	mmol/l	4,2 $\pm$ 1,6	4,2 $\pm$ 1,6	4,2 $\pm$ 1,6	4,3 $\pm$ 1,6	4,3 $\pm$ 1,6	4,3 $\pm$ 1,6
58	HDL-C	mmol/l	1,17 $\pm$ 0,6	1,25 $\pm$ 0,58	1,26 $\pm$ 0,60	1,20 $\pm$ 0,58	1,21 $\pm$ 0,58	1,21 $\pm$ 0,59
59	Fe^{2+}	μ mol/l	14,6 $\pm$ 6,6	14,5 $\pm$ 6,5	14,6 $\pm$ 6,7	14,7 $\pm$ 6,7	14,9 $\pm$ 6,7	14,6 $\pm$ 6,6

Número de muestras	Analito	Unidades	Media $\pm$ DT					
			PtPA	GLH	BDLH	GS	BDS	BD RST
59	Trf	g/l	2,17 $\pm$ 0,74	2,13 $\pm$ 0,71	2,14 $\pm$ 0,72	2,17 $\pm$ 0,73	2,19 $\pm$ 0,73	2,18 $\pm$ 0,77
57	CRP	μ g/l	14,4 $\pm$ 49,3	14,5 $\pm$ 49,5	14,6 $\pm$ 50,5	14,2 $\pm$ 46,8	15,0 $\pm$ 52,3	15,1 $\pm$ 52,4
59	Cortisol*	mmol/l	356 $\pm$ 247	354 $\pm$ 241	356 $\pm$ 254	356 $\pm$ 249	352 $\pm$ 248	358 $\pm$ 250
60	FT4*	Pmol/l	13,6 $\pm$ 4,1	12,7 $\pm$ 3,7	12,7 $\pm$ 3,6	12,7 $\pm$ 3,9	12,7 $\pm$ 3,9	12,8 $\pm$ 3,7
61	TSH*	μ UI/ml	1,81 $\pm$ 2,12	1,87 $\pm$ 2,05	1,89 $\pm$ 2,12	1,83 $\pm$ 2,10	1,82 $\pm$ 2,02	1,86 $\pm$ 2,08
43	Ferritina*	μ g/l	204 $\pm$ 191	199 $\pm$ 191	202 $\pm$ 192	208 $\pm$ 203	207 $\pm$ 198	204 $\pm$ 187
60	§ Tnl*	μ g/l	0,873 $\pm$ 5,33	0,994 $\pm$ 6,06	0,945 $\pm$ 5,75	0,782 $\pm$ 4,77	0,869 $\pm$ 5,25	0,951 $\pm$ 5,75
61	Índice hem		0,2 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,7
* Análisis realizado en un analizador de inmunoensayo DxI800. § significa distribución no paramétrica usada. El valor <i>p</i> se determinó mediante la prueba de los rangos de Paris coincidentes de Wilcoxon.								

Ejemplo 12b: Comparación de suero de PtPA, OsPA y ecarina con suero y plasma preparados en tubos comerciales

Se reclutaron 7 participantes que consistían en 5 voluntarios sanos con una mezcla de 4 varones y 1 mujer, y 2 pacientes sometidos a cirugía cardíaca (todos adultos > 18 años de edad). Los dos pacientes cardíacos habían recibido 34.000 y 43.000 unidades de heparina en los 30 minutos posteriores a la infusión de heparina.

Se extrajo sangre de los participantes sanos mediante venopunción usando un orden de extracción estandarizado: tubo de plasma de citrato Greiner; tubo de suero Greiner; tubo de plasma Greiner; una jeringa sencilla (Thermo de 10 ml n.º CE0197) para los tubos sin aditivos Greiner que contenían PtPA, OsPA o ecarina (la concentración de los activadores de la protrombina en estos tubos de 4 ml fue de PtPA a 1,2 μ g, OsPA a 0,5 μ g y ecarina a 0,625 unidades para los participantes sanos y 1,25 unidades para los participantes de cirugía cardíaca). La sangre de la jeringa se transfirió a los tubos sin aditivos Greiner que contenían los activadores de la protrombina sin una aguja para minimizar la lisis celular.

Para los participantes cardíacos, la sangre se extrajo en una jeringa sencilla (30 ml) mientras estaban en la derivación coronaria. La sangre se entregó al laboratorio en 15 minutos y se dispensó en los diversos tubos enumerados anteriormente.

Los tubos de suero Greiner se dejaron coagular durante el tiempo convencional de 30 minutos para los participantes sanos y de 60 minutos para los participantes sometidos a cirugía cardíaca, y luego se examinaron visualmente antes de cargarlos en la centrifugadora en busca de la formación de coágulos. Las muestras de PtPA, OsPA y ecarina se examinaron visualmente en busca de la formación de coágulos a los 3 y 5 minutos para todos los participantes en el punto de recogida (flebotomía para los participantes sanos y en la unidad clínica para los participantes en cirugía cardíaca). Los tubos de heparina de litio, PtPA, OsPA y ecarina se centrifugaron inmediatamente después de entregarlos al laboratorio (< 30 minutos desde la extracción).

Todos los tubos se centrifugaron a 3.000 g durante 10 minutos a 20 °C en una centrifugadora de cubeta oscilante, y luego se almacenaron a ~21 °C. Los tubos se examinaron visualmente en busca de coagulación latente inmediatamente después de la centrifugación y de nuevo justo antes de la carga en los analizadores. Los tubos primarios de Greiner se usaron para el análisis. El tubo sin aditivos Greiner no contenía una barrera de gel en suero, por lo que el suero generado mediante el uso de activadores de la protrombina se transfirió a tubos de alícuotas (secundarios) para evitar que se volvieran a mezclar y el contacto prolongado con las células.

Resultados

Los resultados se muestran en la Tabla 71, y respaldan las siguientes conclusiones:

1. Comparación de los sueros producidos por los activadores de la protrombina frente a los sueros Greiner: no se observaron diferencias significativas con ninguno de los analitos.

2. Comparación de los sueros producidos por activadores de la protrombina frente al plasma de heparina de litio Greiner: se observaron diferencias significativas en algunos analitos (K^+ , PT, AST y Pi) como era de esperar debido a las diferencias bien establecidas entre el plasma y el suero. Los sueros preparados en tubos de suero comerciales mostraron diferencias analíticas similares del plasma a las mostradas con sueros activadores de la protrombina.

5

Tabla 71: Datos para cada analito de los tres procoagulantes de serpiente diferentes y los tubos Greiner.

N.º de muestras	Analito	Media $\pm$ DT									
		Unidades	GLH	GS	PIPA	OsPA	Ecarina				
7	Na ⁺	mmol/l	138,1 $\pm$ 1,22	138,1 $\pm$ 1,46	137,3 $\pm$ 1,25	136,7 $\pm$ 2,36	137,1 $\pm$ 1,57				
7	K ⁺	mmol/l	4,40 $\pm$ 0,82	4,61 $\pm$ 0,71	4,53 $\pm$ 0,77	4,50 $\pm$ 0,76	4,49 $\pm$ 0,79				
7	Cl ⁻	mmol/l	104,0 $\pm$ 2,8	104,0 $\pm$ 2,6	103,0 $\pm$ 2,6	102,9 $\pm$ 2,34	103,4 $\pm$ 2,4				
7	HCO ₃ ⁻	mmol/l	25,1 $\pm$ 3,2	25,3 $\pm$ 3,5	23,9 $\pm$ 2,4	24,1 $\pm$ 2,7	23,3 $\pm$ 2,2				
7	Gluc	mmol/l	5,76 $\pm$ 0,88	5,69 $\pm$ 0,94	5,63 $\pm$ 0,81	5,60 $\pm$ 0,80	5,64 $\pm$ 0,90				
7	Urea	mmol/l	4,63 $\pm$ 0,82	4,66 $\pm$ 0,80	4,64 $\pm$ 0,85	4,54 $\pm$ 0,83	4,54 $\pm$ 0,88				
7	Creat	μ mol/l	75,1 $\pm$ 10,9	75,7 $\pm$ 12,35	75,9 $\pm$ 12,10	76,29 $\pm$ 12,54	75,0 $\pm$ 12,7				
7	Urato	mmol/l	0,33 $\pm$ 0,08	0,33 $\pm$ 0,08	0,33 $\pm$ 0,08	0,32 $\pm$ 0,07	0,32 $\pm$ 0,08				
7	PT	g/l	68,5 $\pm$ 11,0	62,7 $\pm$ 11,6	63,9 $\pm$ 11,8	62,4 $\pm$ 14,1	63,4 $\pm$ 13,4				
7	Alb	g/l	38,3 $\pm$ 5,5	38,3 $\pm$ 5,5	38,6 $\pm$ 5,8	38,4 $\pm$ 6,0	38,6 $\pm$ 5,8				
7	Bili T	μ mol/l	15,6 $\pm$ 4,6	15,6 $\pm$ 4,7	16,4 $\pm$ 4,5	16,1 $\pm$ 4,6	15,7 $\pm$ 5,2				
7	FA	U/l	65,7 $\pm$ 18,6	65,0 $\pm$ 18,4	66,1 $\pm$ 20,7	69,3 $\pm$ 16,7	67,9 $\pm$ 18,7				
7	GGT	U/l	27,4 $\pm$ 15,2	25,1 $\pm$ 15,0	25,4 $\pm$ 14,7	25,7 $\pm$ 15,8	24,9 $\pm$ 15,8				
7	γ ALT	U/l	30,4 $\pm$ 11,4	31,0 $\pm$ 11,8	32,0 $\pm$ 11,4	31,7 $\pm$ 12,2	32,1 $\pm$ 11,8				
7	γ ASTI	U/l	22,6 $\pm$ 7,8	25,0 $\pm$ 8,3	24,1 $\pm$ 7,2	24,9 $\pm$ 6,5	24,9 $\pm$ 6,7				
7	γ LD	U/l	194,4 $\pm$ 23,1	193,6 $\pm$ 41,6	195,6 $\pm$ 22,4	189,0 $\pm$ 18,9	192,7 $\pm$ 21,2				
7	γ CK	U/l	98,9 $\pm$ 34,9	97,9 $\pm$ 37,5	98,6 $\pm$ 36,8	97,1 $\pm$ 34,0	98,0 $\pm$ 36,1				
7	Ca T	mmol/l	2,20 $\pm$ 0,236	2,23 $\pm$ 0,245	2,22 $\pm$ 0,255	2,20 $\pm$ 0,260	2,21 $\pm$ 0,25				
7	Pi	mmol/l	1,13 $\pm$ 0,13	1,18 $\pm$ 0,14	1,19 $\pm$ 0,13	1,16 $\pm$ 0,14	1,17 $\pm$ 0,13				
7	Mg ²⁺	mmol/l	1,04 $\pm$ 0,23	1,06 $\pm$ 0,22	1,03 $\pm$ 0,20	1,03 $\pm$ 0,19	1,04 $\pm$ 0,21				
7	Col	mmol/l	4,3 $\pm$ 1,7	4,3 $\pm$ 1,7	4,3 $\pm$ 1,7	4,3 $\pm$ 1,7	4,3 $\pm$ 1,7				
7	HDL-C	mmol/l	1,07 $\pm$ 0,27	1,04 $\pm$ 0,23	1,01 $\pm$ 0,27	1,03 $\pm$ 0,28	1,01 $\pm$ 0,06				
7	Fe ²⁺	μ mol/l	16,1 $\pm$ 5,8	15,3 $\pm$ 5,9	16,4 $\pm$ 5,8	16,4 $\pm$ 5,7	16,1 $\pm$ 5,8				
7	Trf	g/l	2,18 $\pm$ 0,51	2,18 $\pm$ 0,51	2,21 $\pm$ 0,54	2,20 $\pm$ 0,53	2,21 $\pm$ 0,55				
7	CRAP	μ g/l	1,7 $\pm$ 1,5	1,9 $\pm$ 1,6	1,7 $\pm$ 1,5	1,9 $\pm$ 1,6	1,7 $\pm$ 1,5				
7	Cortisol*	mmol/l	382,1 $\pm$ 251,4	379,7 $\pm$ 247,2	373,6 $\pm$ 256,9	366,3 $\pm$ 241,2	359,3 $\pm$ 237,7				
7	FT4*	Pmol/l	13,53 $\pm$ 2,63	13,56 $\pm$ 3,26	13,46 $\pm$ 1,23	13,76 $\pm$ 3,17	14,23 $\pm$ 3,13				
7	FT3*	Pmol/l	4,83 $\pm$ 0,35	4,66 $\pm$ 0,43	4,91 $\pm$ 0,51	4,74 $\pm$ 0,35	4,97 $\pm$ 0,48				
7	TSH*	μ U/ml	1,86 $\pm$ 0,48	1,88 $\pm$ 0,56	1,72 $\pm$ 0,30	1,75 $\pm$ 0,30	1,73 $\pm$ 0,32				
7	Ferritina*	μ g/l	236,6 $\pm$ 297,2	234,9 $\pm$ 304,8	226,4 $\pm$ 280,8	207,3 $\pm$ 236,5	225,3 $\pm$ 280,1				

N.º de muestras	Analito	Media $\pm$ DT						
		Unidades	GLH	GS	PtPA	OsPA	Ecarina	
7	\$Tnl^*\$	$\mu\text{g/l}$	$0,079 \pm 0,136$	$0,071 \pm 0,137$	$0,091 \pm 0,165$	$0,092 \pm 0,170$	$0,093 \pm 0,174$	
7	índice hem		$0,4 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,8$	$0,6 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,5$	$0,4 \pm 0,5$	
§ significa distribución no paramétrica usada. El valor p se determinó mediante la prueba de los rangos de Paris coincidentes de Wilcoxon.								
* Análisis realizado en un analizador de inmunoensayo Dx1800.								

Resumen del Ejemplo 12

La sangre de todos los participantes sanos y anticoagulados que varían de la dosis más baja hasta el participante "totalmente" heparinizado más alta se coaguló en 5 minutos en los tubos que contenían PtPA, OsPA y ecarina, dando coágulos firmes e inmóviles. Los analizadores no observaron ni detectaron visualmente ninguna coagulación latente en ninguno de los sueros producidos por los activadores de la protrombina. A pesar de que los activadores de la protrombina son enzimas proteolíticas, no produjeron ningún efecto analítica o clínicamente significativo en ninguno de los analitos medidos independientemente de si los analitos eran proteínas o de si se usaron proteínas como compuestos reactivos en los métodos analíticos. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los analitos entre los sueros preparados en el tubo comercial y los sueros preparados usando activadores de la protrombina. Las diferencias analíticas y clínicas observadas en los analitos entre el plasma de heparina de litio preparado en un tubo comercial y los sueros producidos usando activadores de la protrombina estaban en línea con los datos publicados.

EJEMPLO 13: MEDICION ADICIONAL DE ANALITOS BIOQUIMICOS EN MUESTRAS DE PLASMA Y DE SUERO PREPARADAS EN TUBOS COMERCIALES Y MUESTRAS DE SUERO PREPARADAS USANDO ACTIVADORES DE LA PROTROMBINA DE VENENO (NOTECARINA Y CARINACTIVASA-2)

Este Ejemplo se deduce del Ejemplo 12, y usa la misma metodología descrita en el mismo.

Ejemplo 13a: Medida de los analitos

Se extrajo sangre de 5 participantes sanos en tubos sin aditivos Greiner (n.º de cat. 454001) a los que se habían añadido 25 µl de notabinina o carinactivasa-2 para dar concentraciones de 12 nmol/ml y 45 nmol/ml, respectivamente. Se usaron tubos de suero Vacuette de Greiner (n.º de cat. 456078; GS) como controles. Los tubos GS se dejaron coagular durante 30 minutos según las recomendaciones del fabricante antes de la centrifugación. Los tubos que contenían los activadores de la protrombina se observaron en busca de la coagulación inmediatamente después de la adición de la sangre.

Los tubos de notecarina y carinactivasa-2 se coagularon en 2 minutos, y se llevaron al laboratorio y se centrifugaron a los 7 a 15 minutos de la extracción. Los coágulos formados en los tubos que contenían los activadores eran sólidos, y no se observó ni detectó formación de coágulos latentes.

Las muestras fueron analizadas para 31 analitos, y los resultados se muestran en la Tabla 72. Para 27 analitos, los valores obtenidos fueron iguales más menos el error experimental, con diferencias entre resultados emparejados inferiores al cambio menos significativo (% de LSC). Los resultados en los que las diferencias fueron mayores que el LSC establecido (resaltados) se pueden explicar de la siguiente manera:

(1) Para LD, las actividades ligeramente más bajas en las dos muestras de activador de la protrombina pueden reflejar la disminución de la contaminación celular de estas en comparación con el suero Greiner;

(2) El alto nivel de triglicéridos (Trig) en la muestra de Notecarina se debe a la interferencia del glicerol en el que se almacenó la Notecarina;

(3) El suero de Notecarina produjo niveles de AST más altos, sin embargo, las diferencias fueron clínicamente insignificantes;

(4) Los resultados de la troponina para los cinco pacientes fueron demasiado bajos para una diferenciación precisa.

Tabla 72: Resultados analíticos para muestras de suero generadas por notecarina y carinactivasa-2.

N.º de muestras	Análito	Media ± DT		Notec -GS		CA2-GS		LSC (%)	CAL (%)
		Unidades	GS	Notecarina	CA-2	Diferencia media entre los pares (%)	Diferencia media entre los pares (%)		
5	Na ⁺		mmol/l	138 ± 1,5	138 ± 1,6	138 ± 1,5	-0,4	2,8	3
5	K ⁺		mmol/l	3,94 ± 0,17	3,94 ± 0,18	3,83 ± 0,18	-2,9	3,3	5
5	Cl ⁻		mmol/l	104,2 ± 2,4	104,2 ± 2,7	106,5 ± 2,6	2,2	3,3	5
5	HCO ₃ ⁻		mmol/l	26,8 ± 2,6	25,6 ± 2,5	25,6 ± 2,2	-4,5	4,8	10
5	Gluc		mmol/l	4,86 ± 0,86	4,76 ± 0,82	4,74 ± 0,65	-2,1	4,4	10
5	Urea		mmol/l	5,58 ± 2,49	5,56 ± 2,44	5,55 ± 2,42	-0,4	5,0	10
5	Creat		μmol/l	69,2 ± 25,0	69,2 ± 22,9	67,2 ± 22,9	-2,9	5,5	10
5	Urato		mmol/l	0,242 ± 0,026	0,240 ± 0,026	0,240 ± 0,023	-0,8	3,8	10
5	PT		g/l	66,0 ± 2,0	65,0 ± 2,2	63,6 ± 2,4	-1,5	3,5	5
5	Alb		g/l	40,8 ± 1,9	40,2 ± 1,9	39,5 ± 1,4	-1,5	3,2	5
5	Bili T		μmol/l	11,4 ± 8,8	11,6 ± 9,0	10,6 ± 6,9	1,8	7,0	10
5	FA		U/l	60,0 ± 4,1	60,4 ± 4,2	58,4 ± 4,3	0,7	4,8	10
5	GGT		U/l	14,6 ± 4,9	14,4 ± 6,5	14,8 ± 5,0	-1,4	7,3	10
5	ALT		U/l	22,6 ± 8,0	23,2 ± 7,6	23,9 ± 7,6	2,7	6,8	10
5	AST		U/l	17,2 ± 3,8	19,8 ± 4,4	17,3 ± 3,5	15,1\$	6,2	10
5	LD		U/l	192,2 ± 17,0	184,8 ± 18,3	179,9 ± 17,6	-3,9\$	3,7	15
5	CK		U/l	81,4 ± 15,9	81,0 ± 15,4	78,8 ± 14,1	-0,5	3,7	15
5	Ca T		mmol/l	2,330 ± 0,07	2,290 ± 0,07	2,267 ± 0,07	-1,7	3,5	5
5	Pi		mmol/l	1,314 ± 0,118	1,282 ± 0,117	1,271 ± 0,099	-2,4	3,8	10
5	Mg ²⁺		mmol/l	0,804 ± 0,046	0,802 ± 0,051	0,792 ± 0,034	-0,3	4,4	10
5	Col		mmol/l	4,94 ± 0,35	4,78 ± 0,39	4,70 ± 0,34	-1,2	3,6	10
5	Trig		mmol/l	1,52 ± 0,55	5,61 ± 0,96	1,56 ± 0,65	269#	5,3	10
5	HDL-C		mmol/l	1,420 ± 0,399	1,424 ± 0,293	1,388 ± 0,277	0,3	5,2	10
5	Fe ²⁺		μmol/l	17,2 ± 3,8	16,8 ± 4,1	16,6 ± 3,6	-2,3	3,7	10
5	Trf		g/l	2,596 ± 0,187	2,566 ± 0,188	2,508 ± 0,188	-1,16	4,8	10
5	Cortisol*		mmol/l	236,0 ± 27,2	244,4 ± 21,5	231,9 ± 297,7	3,6	6,4	15
5	FT4*		Pmol/l	10,54 ± 1,45	11,38 ± 2,05	11,08 ± 1,05	-2,7	6,5	30
5	TSH*		μU/ml	1,142 ± 0,783	1,142 ± 0,783	1,080 ± 0,783	1,1	7,3	15
5	Ferritina*		μg/l	43,6 ± 20	43,6 ± 17,5	14,2 ± 17,7	0,0	7,2	15
5	Tnl*		μg/l	0,009 ± 0,003	0,010 ± 0,005	0,011 ± 0,002	11,6	14	30

N.º de muestras	Análito	Media ± DT			Notec -GS		CA2-GS		LSC (%)	CAL (%)
		Unidades	GS	Notecarina	CA-2	Diferencia media entre los pares (%)	Diferencia media entre los pares (%)	Diferencia media entre los pares (%)		
5	Índice hem		0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0	0	0		
Análisis realizado en los analizadores de inmunoensayo Beckman DxC800 y *Dxl800.										
§ = Los resultados que difieren en más del LSC y/o CAL.										

Ejemplo 13b: Estabilidad de los analitos

Se lavaron tubos de suero Greiner (5 veces con agua destilada) para eliminar el tensioactivo y procoagulante, pero retener la barrera de gel, y luego se secaron en horno. Se añadieron notecarina y carinactivasa-2 (alícuotas de 25 µl) a los tubos para obtener concentraciones de 12 nmol/ml y 45 nmol/ml, respectivamente. Se recogió sangre (5 ml) de un voluntario sano en un tubo que contenía notecarina y uno que contenía carinactivasa-2. Los tubos se centrifugaron después de 5 minutos. Se determinaron K^+ , glucosa, LD y fosfato a intervalos de 3 veces tras la preparación del suero. Las muestras se almacenaron a 23 °C durante 5 horas y luego de 5 a 26,5 horas a 4 °C. El nivel de hemoglobina también se midió.

Los resultados se muestran en la tabla 73.

Tabla 73: Estabilidad de los analitos en muestras de suero generado por notecarina y carinactivasa-2

Analito	Tiempo cero	5 h	26,5 h	Hb sérica mg/l
Notecarina				32
K^+	4,0	4,1	4,0	
Glucosa	5,4	5,3	5,1	
LD	176	175	173	
Fosfato	1,05	1,13	1,05	
Carinactivasa-2				46
K^+	3,9	3,9	3,9	
Glucosa	5,3	5,0	4,9	
LD	176	177	170	
Fosfato	1,03	1,04	1,06	

Un nivel de hemoglobina < 50 mg/l se considera clínicamente insignificante. Por lo tanto, estos resultados indican que las muestras de suero producidas por los activadores de la protrombina estaban eficazmente libres de hemoglobina (por lo tanto, hay muy poca hemólisis durante el proceso de coagulación), y libres de contaminación celular. Si hubiera células o desechos celulares, la concentración de K^+ , LD y fosfato cabría esperar que aumentara y la concentración de glucosa disminuyera durante el almacenamiento. Se tomaron muestras de los sueros y se analizaron las células usando el método Cytospin. Se detectaron muy pocas células.

En resumen, las muestras de suero preparadas usando un activador de la protrombina del grupo B (carinactivasa-2) y un activador de la protrombina del grupo D (notecarina) fueron de alta calidad basándose en la coagulación completa, en los resultados analíticos y en la ausencia de contaminantes celulares.

EJEMPLO 14: MEDICIÓN DE ANALITOS BIOQUÍMICOS EN MUESTRAS DE PLASMA Y SUERO PREPARADAS EN TUBOS COMERCIALES Y MUESTRAS DE SUERO PREPARADAS USANDO VENENOS QUE CONTENÍAN ACTIVADORES DE LA PROTROMBINA

Este ejemplo usa la misma metodología de análisis de analitos descrita en los Ejemplos 12 y 13.

Los descubrimientos hechos en los ejemplos anteriores demostraron que, sorprendentemente, los activadores de la protrombina del veneno de serpiente serían adecuados para su uso como procoagulantes en entornos clínicos. Esto planteó la cuestión de si los venenos sin elaborar que contenían estos activadores de la protrombina podrían usarse en dispositivos de coagulación sanguínea sin una purificación previa de los activadores de la protrombina.

Por lo tanto, se diseñaron y se realizaron los siguientes experimentos para demostrar si se podrían usar los venenos para producir rápidamente suero de alta calidad a partir de muestras de sangre humana. La cantidad de veneno usada fue aproximadamente cuatro veces la cantidad de activadores de la protrombina purificados usada en los experimentos anteriores, lo que refleja el hecho de que los venenos contienen otras proteínas además de los activadores de la protrombina.

Ejemplo 14a: Uso de venenos sin elaborar de *P. textilis* y *O. scutellatus* como procoagulantes en tubos de coagulación

Se recogió sangre de 2 voluntarios sanos en 10 tubos sin aditivos Greiner (n.º 454001, Greiner Bio-One, Kremsmuster, Austria) (4 ml de capacidad) que contenían 2 y 4 µg (por duplicado para los 4 µg de veneno de *O. scutellatus*) o veneno de *P. textilis* u *O. scutellatus*. Las muestras de sangre también se recogieron en tubos de suero convencionales Greiner (n.º 456071, Greiner Bio-One, Kremsmuster, Australia) para la comparación.

La coagulación en los tubos que contenían veneno pareció completa según la observación visual en 2 minutos. Las muestras de los tubos que contenían veneno se centrifugaron después de 15 minutos y las de los tubos de suero Greiner después de 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 3.000 g, 10 min y 20 °C (centrifugadora Hereaus 1 SR, Alemania). Los sueros de los tubos sin aditivos Greiner se transfirieron inmediatamente a tubos de plástico sencillos Beckman (n.º 448778, Beckman coulter, Brea, CA, EE. UU.) para su observación y análisis. Se observó coagulación latente en aproximadamente la mitad (6 de los 10) de los tubos que contenían veneno, pero no en ninguno de los tubos de suero Greiner. Esto indica que, en algunos tubos, la coagulación fue incompleta a las concentraciones de veneno usadas. Se volvieron a centrifugar las muestras de los tubos de plástico sencillos para eliminar las células, el estroma celular y los coágulos latentes, y los sueros claros obtenidos se analizaron en 2 horas en busca de 31 analitos. El análisis de la muestra se realizó en las dos horas posteriores a la centrifugación en busca de 31 analitos en el analizador químico general DxC800 de Beckman y en el inmunoanalizador DxI800 (Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU.). No hubo diferencias clínicamente significativas en los niveles de concentración evaluados entre los resultados obtenidos para los 12 sueros (4 sueros de *P. textilis* y 6 sueros de *O. scutellatus* y los 2 sueros de Greiner).

Los resultados se muestran en la tabla 74.

Tabla 74: Resultados analíticos para muestras de suero generadas por sueros de *P. textilis* y veneno de *O. scutellatus*.

N.º de muestras	Análito	Media ± DT		Diferencia mínima entre pares (%)										LSC (%)	CAL (%)
		Unidades	GS	Marrón 2,0 µg	Marrón 4,0 µg	Taipán 2,0 µg	Taipán 4,0 µg	Taipán 4,0 µg	BR2- GS	BR4- GS	T2- GS	T4- GS	T4R- GS		
2	Na ⁺	mmol/l	136,5 ± 0,71	137,0 ± 1,41	136,5 ± 0,71	137,0 ± 1,41	136 ± 0,00	136,0 ± 0,00	-0,4	0,0	0,4	-0,4	-0,4	2,8	3
2	K ⁺	mmol/l	4,05 ± 0,21	4,05 ± 0,07	4,0 ± 0,00	4,20 ± 0,28	4,00 ± 0,00	4,25 ± 0,35	0,0	-1,2	3,7	-1,2	4,9	3,3	5
2	Cl ⁻	mmol/l	103,5 ± 0,71	103,5 ± 0,71	103,5 ± 0,71	103,5 ± 0,71	104,0 ± 0,00	103,5 ± 0,71	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	3,3	5
2	HCO ₃ ⁻	mmol/l	26,0 ± 0,0	24,5 ± 0,7	24,0 ± 0,0	24,5 ± 0,7	23,5 ± 0,7	24,0 ± 0,0	-5,8	-7,7	-5,8	-9,6	-7,7	4,8	10
2	Gluc	mmol/l	5,45 ± 0,35	5,20 ± 0,42	5,30 ± 0,14	5,35 ± 0,50	5,2 ± 0,28	5,4 ± 0,42	-4,6	-2,8	-1,8	-4,6	-0,9	4,4	10
2	Urea	mmol/l	7,45 ± 2,76	7,30 ± 2,83	7,25 ± 2,90	7,30 ± 2,97	7,3 ± 2,97	7,35 ± 2,90	-2,0	-2,7	-2,0	-1,3	-2,0	5,0	10
2	Creat	µmol/l	106,0 ± 2,8	101,5 ± 12,0	104,0 ± 7,1	103,5 ± 6,4	107,0 ± 0,00	105,0 ± 8,5	-4,2	-1,9	-2,4	0,9	-0,9	5,5	10
2	Urato	mmol/l	0,31 ± 0,13	0,30 ± 0,14	0,30 ± 0,14	0,30 ± 0,14	0,30 ± 0,14	0,30 ± 0,14	-3,2	-3,2	-3,2	-3,2	-3,2	3,8	10
2	PT	g/l	65,0 ± 0,0	64,5 ± 0,71	65,5 ± 0,71	66,0 ± 0,0	63,5 ± 0,71	65,5 ± 0,71	-0,8	0,8	1,5	-2,3	0,8	3,5	5
2	Alb	g/l	39,5 ± 0,7	40,5 ± 0,7	40,5 ± 0,7	40,5 ± 0,71	40,0 ± 0,0	40,0 ± 0,0	2,5	2,5	2,5	1,3	1,3	3,2	5
2	Bili T	µmol/l	13,5 ± 5,0	11,5 ± 5,0	11,0 ± 4,2	11,0 ± 5,7	12,5 ± 5,0	12,5 ± 5,0	-14,8	-18,5	-18,5	-7,4	-7,4	7,0	20
2	FA	U/l	66,5 ± 17,7	65,5 ± 20,5	69,0 ± 21,2	67,5 ± 21,9	66,0 ± 21,2	68,0 ± 19,8	-1,5	3,88	1,5	-0,8	2,3	4,8	10
2	GGT	U/l	14,5 ± 6,4	15,0 ± 2,8	15,0 ± 7,1	16,5 ± 5,0	15,5 ± 9,2	14,0 ± 7,1	3,4	3,4	13,8 ^s	6,9	-3,4	7,3	10
2	ALT	U/l	3200 ± 2,8	30,5 ± 6,4	30,5 ± 5,0	31,5 ± 3,5	31,5 ± 5,0	30,5 ± 2,1	-4,7	-4,7	-1,6	-1,6	-4,7	6,8	10
2	AST	U/l	23-5±0,7	26,5 ± 0,7	30,0 ± 0,0	29,5 ± 2,1	29,5 ± 2,1	29,0 ± 0,0	12,8	27,7 ^s	25,5 ^s	25,5 ^s	23,4 ^s	6,2	15
2	LD	U/l	189,5 ± 10,6	189,5 ± 20,5	193,5 ± 6,4	197,5 ± 20,5	201,5 ± 14,8	201,5 ± 13,4	0,0	2,1	4,2	6,3	6,3	3,7	15
2	CK	U/l	152,0 ± 83,4	154,5 ± 84,0	145,5 ± 90,0	145,5 ± 89,8	147,5 ± 92,6	145,5 ± 94,0	1,6	-4,3	-4,3	-3,0	-4,3	3,7	15
2	Ca T	mmol/l	2,17 ± 0,06	2,18 ± 0,09	2,17 ± 0,09	2,18 ± 0,06	2,15 ± 0,08	2,17 ± 0,09	0,5	0,0	0,2	-1,2	-0,2	3,5	5
2	Pi	mmol/l	1,22 ± 0,04	1,22 ± 0,04	1,21 ± 0,07	1,21 ± 0,06	1,21 ± 0,04	1,20 ± 0,04	0,0	-0,8	-1,2	-1,2	-2,0	3,8	10
2	Mg ²⁺	mmol/l	0,915 ± 0,049	0,935 ± 0,05	0,935 ± 0,049	0,930 ± 0,057	0,950 ± 0,057	0,945 ± 0,049	2,2	2,2	1,6	3,8	3,3	4,4	10
[0907]	Col	mmol/l	4,60 ± 0,00	4,70 ± 0,00	4,70 ± 0,14	4,70 ± 0,00	4,65 ± 0,07	4,70 ± 0,00	2,2	2,9	2,2	1,1	2,2	3,6	10
2	Trig	mmol/l	2,40 ± 0,28	2,50 ± 0,57	2,55 ± 0,50	2,50 ± 0,57	2,50 ± 0,42	2,50 ± 0,42	4,2	6,2	4,2	4,2	4,2	5,3	10
2	HDL-C	mmol/l	1,50 ± 0,42	1,35 ± 0,07	1,50 ± 0,14	1,45 ± 0,07	1,50 ± 0,28	1,50 ± 0,14	-10,0	0,0	-3,3	0,0	0,0	5,2	10
2	Fe ²⁺	µmol/l	13,0 ± 5,7	13,0 ± 5,7	13,5 ± 5,0	13,0 ± 5,7	13,0 ± 5,7	13,5 ± 5,0	0,0	3,8	0,0	0,0	3,8	3,7	10
2	Trf	g/l	2,59 ± 0,46	2,61 ± 0,44	2,58 ± 0,35	2,62 ± 0,43	2,56 ± 0,44	2,55 ± 0,36	1,0	-0,2	1,2	-1,0	-1,5	4,8	10
2	Cortisol*	mmol/l	236,0 ± 27,2	±	±	±	±	±	3,6	-1,7	±	±	±	6,4	15
2	FT4*	Pmol/l	11,55 ± 1,34	12,80 ± 0,28	12,90 ± 2,55	12,70 ± 2,12	13,25 ± 4,03	12,75 ± 1,34	10,8	11,7	10,0	14,7	10,4	6,5	30
2	TSH*	µU/ml	2,185 ± 1,011	2,135 ± 0,841	2,430 ± 1,202	2,160 ± 0,834	2,070 ± 0,891	2,085 ± 0,884	-2,3	11,2	-1,1	-5,3	-4,6	7,3	15

N.º de muestras	Analito	Media ± DT		Diferencia mínima entre pares (%)								LSC (%)	CAL (%)		
		Unidades	GS	Marrón 2,0 µg	Marrón 4,0 µg	Taipán 2,0 µg	Taipán 4,0 µg	Taipán 4,0 µg	BR2- GS	BR4- GS	T2- GS			T4- GS	T4R- GS
2	Ferritina*	µg/l	50,0 ± 0,0	56,0 ± 0,0	56,5 ± 2,1	51,5 ± 9,2	55 ± 9,9	51,0 ± 7,1	12,0	13,0	3,0	10,0	2,0	7,2	15
2	Tnl*	µg/l	0,010±0,005	0,012 ± 0,008	0,010 ± 0,002	0,012 ± 0,007	0,010 ± 0,003	0,007 ± 0,002	26,3	0,0	26,3	5,3	-31,6	14	30
2	Índice hem		0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 ± 0,7	0,5 ± 0,7							
§ = los resultados difieren en más de CAL.															

El análisis se realizó en los analizadores DxC800 y *Dxl800 de Beckman; Br2 - 2,0 µg de veneno de serpiente marrón; Br4 - 4,0 µg de veneno de serpiente marrón; T2: 2,0 µg de veneno de serpiente Taipán; T4 y T4R - 4,0 µg de veneno de serpiente Taipán.

- 5 En resumen, se ha demostrado que los venenos de *P. textilis* y *O. scutellatus* sin elaborar son procoagulantes potenciales para producir suero en tubos de coagulación sanguínea. Las concentraciones óptimas deben determinarse para evitar la coagulación latente y mantener la integridad analítica.

Ejemplo 14b: Uso de veneno de *E. carinatus* sin elaborar como procoagulante en tubos de coagulación

- 10 Se realizaron los siguientes experimentos para demostrar si el veneno de *E. carinatus* se podría usar para producir rápidamente suero de alta calidad a partir de muestras de sangre humana.

- 15 Se recogió sangre de 2 voluntarios sanos en 10 tubos sin aditivos Greiner (n.º 454001, Greiner Bio-One, Kremismuster, Austria) (4 ml de capacidad) que contenían 4 µg de veneno de *E. carinatus*. Al mismo tiempo, se recogió sangre en tubos de suero convencional Greiner (n.º 456071, Greiner Bio-One, Kremismuster, Australia) para la comparación.

- 20 La coagulación en los tubos que contenían veneno pareció completa según la observación visual en 3 minutos. Las muestras de los tubos que contenían veneno se centrifugaron después de 10 minutos y las de los tubos de suero Greiner después de 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 3.000 g, 10 min y 20 °C (centrifugadora Hereaus 1 SR, Alemania). Los sueros de los tubos sin aditivos Greiner se transfirieron inmediatamente a tubos de plástico sencillos Beckman (n.º 448778, Beckman coulter, Brea, CA, EE. UU.) para su observación y análisis. No se observó coagulación latente en los tubos que contenían veneno ni en los tubos de suero Greiner. Se volvieron a centrifugar las muestras de los tubos de plástico sencillos para eliminar cualquier célula durante la transferencia de suero y los sueros claros obtenidos se analizaron en 2 horas en busca de 31 analitos. El análisis de la muestra se realizó en las dos horas posteriores a la centrifugación en busca de 31 analitos en el analizador químico general DxC800 de Beckman y el inmunoanalizador Dxl800 (Beckman Coulter, Brea, CA, EE.UU.). Los resultados se muestran en la tabla 75. Hubo diferencias clínicamente significativas con AST y HDL y ningún otro analito en el nivel de concentraciones probado entre los resultados obtenidos para los sueros de *E. carinatus* y Greiner.

Tabla 75: Resultados analíticos para muestras de suero generadas por el veneno de serpiente *Echis carinatus*.

N.º de muestras	Analito	Media ± DT			Diferencia mínima entre pares (%)	LSC (%)	CAL (%)
		Unidades	GS	4,0 µg de <i>E.carinatus</i>			
2	Na ⁺	mmol/l	138,5 ± 0,71	137,5 ± 0,71	-0,7	2,8	3
2	K ⁺	mmol/l	4,0 ± 0,14	4,0 ± 0,14	0,0	3,3	5
2	Cl ⁻	mmol/l	103 ± 0,0	103,5 ± 0,7	-0,5	3,3	5
2	HCO ₃ ⁻	mmol/l	27,4 ± 0,92	26,1 ± 0,14	-4,6	4,8	10
2	Gluc	mmol/l	5,45 ± 0,07	5,35 ± 0,07	-1,8	4,4	10
2	Urea	mmol/l	7,25 ± 0,64	7,30 ± 0,71	0,7	5,0	10
2	Creat	µmol/l	88,5±12,1	86,0±17,0	-2,8	5,5	10
2	Urato	mmol/l	0,28 ± 0,09	0,28 ± 0,09	0	3,8	10
2	PT	g/l	63,5 ± 0,7	63,5 ± 0,7	0	3,5	5
2	Alb	g/l	39,5 ± 0,7	40,5 ± 0,7	2,5	3,2	5
2	Bili T	µmol/l	13,5±6,4	12,0±5,7	-11,1	7,0	20
2	FA	U/l	71,5 ± 23,3	70,0 ± 19,8	-2,1	4,8	10
2	GGT	U/l	14,0 ± 4,2	14,5 ± 7,8	3,6	7,3	10
2	ALT	U/l	34,0 ± 0,0	35,5 ± 2,1	4,4	6,8	10
2	AST	U/l	20,5 ± 2,1	27,0 ± 00	31,7 ^s	6,2	15
2	LD	U/l	185 ± 5,7	193 ± 11,3	4,3	3,7	15
2	CK	U/l	135 ± 50,9	133,5 ± 48,8	-1,1	3,7	15
2	Ca T	mmol/l	2,20 ± 0,014	2,17 ± 0,021	-1,6	3,5	5
2	Pi	mmol/l	1,215 ± 0,247	1,17 ± 0,226	-3,7	3,8	10
2	Mg ²⁺	mmol/l	0,91 ± 0,0	0,93 ± 0,04	1,6	4,4	10
2	Col	mmol/l	4,75 ± 0,64	4,75 ± 0,64	0,0	3,6	10

N.º de muestras	Analito	Media $\pm$ DT			Diferencia mínima entre pares (%)	LSC (%)	CAL (%)
		Unidades	GS	4,0 μ g de <i>E. carinatus</i>			
2	Trig	mmol/l	1,45 $\pm$ 0,50	1,50 $\pm$ 0,14	3,4	5,3	10
2	HDL-C	mmol/l	1,25 $\pm$ 0,21	1,80 $\pm$ 0,57	44,0 [§]	5,2	10
2	Fe ²⁺	μ mol/l	13,5 $\pm$ 5,0	13,5 $\pm$ 5,0	0	3,7	10
2	Trf	g/l	2,62 $\pm$ 0,49	2,60 $\pm$ 0,44	1,3	4,8	10
2	Cortisol*	mmol/l	232 $\pm$ 10,6	238 $\pm$ 7,8	2,6	6,4	15
2	FT4*	Pmol/l	12,2 $\pm$ 0,6	12,6 $\pm$ 0,7	3,7	6,5	30
2	TSH*	μ UI/ml	2,16 $\pm$ 0,76	2,10 $\pm$ 0,67	-3,0	7,3	15
2	Ferritina*	μ g/l	50 $\pm$ 2,8	47 $\pm$ 2,8	-6,0	7,2	15
2	Tnl*	μ g/l	0,024 $\pm$ 0,000	0,020 $\pm$ 0,006	-18,8	14	30
2	Índice hem		0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0			

§ = los resultados difieren en más de CAL.

El análisis se realizó en analizadores DxC800 y *Dxl800 de Beckman; EC4 - 4,0 μ g de veneno de *Echis carinatus*.

5 Dado que estos son resultados preliminares, se requiere investigación adicional para establecer por qué hubo diferencias clínicamente significativas para los resultados de AST y HDL.

10 En resumen, se ha demostrado que el uso de veneno de *E. carinatus* sin elaborar como procoagulante en tubos de coagulación sanguínea puede ser viable. Se deben determinar la concentración óptima y otros estudios sobre la interferencia en los analitos con precisión para evitar la coagulación latente y mantener la integridad analítica.

EJEMPLO 15: ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Para que un activador de la protrombina de veneno sea útil como componente de los dispositivos de extracción de sangre, debe cumplir tres tipos de requisitos de estabilidad:

15 (1) Estabilidad durante el almacenamiento a granel: debe ser estable durante el período posterior a la purificación antes de su uso en la fabricación de los tubos. Para la certeza del suministro, este período de almacenamiento puede ser de varios meses. El almacenamiento podría ser en forma de solución acuosa concentrada o de un sólido liofilizado. El almacenamiento puede estar bajo refrigeración si es necesario.

20 (2) Estabilidad durante la fabricación: necesita ser estable durante la fabricación del dispositivo de extracción de sangre. Es probable que el proceso implique la adición de una alícuota de una solución madre del activador de la protrombina a tubos que ya contenían otros componentes tales como el gel separador, el tensioactivo y, posiblemente, un procoagulante particulado. A esto, le seguiría un secado para dar una capa superficial de activador de la protrombina, el sellado de los tubos al vacío y la esterilización por radiación.

25 (3) Estabilidad durante el almacenamiento del dispositivo antes de su uso: Sería necesario que el activador se mantuviera casi en actividad completa durante un período de al menos 12 meses a temperatura ambiente, es decir, a 23 °C, preferentemente, durante un período más largo a temperatura más alta.

30 Los experimentos realizados hasta la fecha sugieren que se encontrarán condiciones para cumplir estos requisitos para al menos algunos de los activadores de la protrombina de veneno.

Ejemplo 15a: Estabilidad durante el almacenamiento a granel

35 Se determinó la estabilidad de PtPA manteniendo a un intervalo de temperaturas en forma de solución salina diluida en tampón fosfato a pH 7 en tubos Eppendorf de plástico sencillos. Los resultados de los ensayos de coagulación plasmática se muestran en la Figura 58. Los resultados muestran que no hubo una pérdida significativa de actividad de coagulación tras dos semanas (336 horas) a 4 o 25 °C. Se obtuvieron resultados similares cuando se midió la actividad de PtPA frente al sustrato cromogénico de Factor Xa S- 2222. A 37 °C, la PtPA perdió una cantidad significativa de su actividad después de 168 horas.

40 En experimentos relacionados, se demostró que el pH 7,4 era la temperatura óptima para el almacenamiento y que la adición de iones de calcio al tampón de almacenamiento estabilizaba la actividad de coagulación del plasma.

Estos experimentos indican que debería ser posible encontrar las condiciones para el almacenamiento a granel de PtPA y de OsPA, estrechamente relacionada, para que conserven toda o casi toda su actividad en el almacenamiento durante períodos prolongados.

5 Ejemplo 15b: Estabilidad durante la fabricación

Se realizó un experimento para determinar el efecto de la radiación gamma sobre OsPA añadida a los tubos de recogida de sangre como una solución diluida.

10 Se diluyó la OsPA de reserva (1,089 mg/ml; 4,36 mM) a 1:25 con tampón de Hepes 0,02 M, pH 7,4. Se añadieron 50 µl a cada uno de los 5 tubos de extracción de sangre sencillos sin otros aditivos, que se irradiaron con radiación gamma (16 megaBeq) y a 5 tubos similares que no se irradiaron. De forma similar, se añadieron 50 µl de OsPA diluida a cada uno de 10 tubos de recogida de sangre que contenían sílice de Greiner (tubos de suero Greiner) y 5 de estos tubos se irradiaron.

15 Tras la irradiación gamma, todos los tubos se prepararon hasta 2,0 ml con tampón de Hepes 0,02 M, pH 7,4. Luego se tomaron alícuotas y se probaron para determinar la actividad hidrolítica contra S-2765 y la actividad de coagulación usando plasma citrado normal con calcio 10 mM añadido.

20 Los resultados se muestran en las Figuras 59 y 60, y muestran que la irradiación no tuvo efecto sobre la actividad de coagulación contra el plasma citrado recalcificado ni en actividad hidrolítica contra el sustrato cromogénico S-2765.

25 La adición de OsPA (1,5 nM) al tubo de extracción de sangre sencillo mostró una pérdida significativa de actividad en comparación con la OsPA recién diluida. Esto se puede explicar por la unión hidrófoba de OsPA al tubo de plástico sencillo. La adición de OsPA a tubos de recogida de sangre que contenían sílice mostró una recuperación de más del 95 % de las actividades hidrolítica y de coagulación. De nuevo, no se observó actividad de pérdida con el tratamiento de irradiación gamma.

30 En conclusión, la irradiación gamma de OsPA en un tubo de recogida de sangre no afectó a la actividad hidrolítica ni a la actividad de coagulación. La adición de OsPA a un tubo de coagulación que contenía sílice, barrera de gel y tensioactivo es la combinación más eficaz determinada hasta la fecha para coagular sangre normal en menos de 1 minuto.

35 Ejemplo 15c: Estabilidad durante el almacenamiento del dispositivo

Se dispusieron alícuotas (50 µl) de una solución diluida de OsPA en tampón de Hepes 0,02 M, pH 7,4 (1,5 nM) en tubos de suero convencionales Greiner. Se hizo girar cada tubo para recubrir la superficie con OsPA, y se dispusieron los tubos en un desecador de vacío y se purgaron mediante una corriente de nitrógeno seco antes de aplicar un bajo vacío durante 3 días a 23 °C para secar. Se abrió el desecador, se enjuagó con nitrógeno y se volvieron a sellar los tubos. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente (23 °C). Después de los tiempos especificados, se abrieron tres tubos, se volvió a disolver el contenido en 2 ml de agua y se analizaron frente al sustrato específico de Factor Xa S-2222. Los resultados se muestran en la Figura 61, y muestran que la actividad (expresada como el aumento en A405/min) de OsPA hacia S-2222 permaneció sin cambios durante el almacenamiento a 23 °C como una capa de superficie seca en los tubos de suero Greiner durante 14 días. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. En la Figura 61, la barra de la derecha es la actividad de una muestra recién diluida de solución madre de OsPA (4,05 µM), y su actividad fue la misma que la encontrada en los tubos, lo que demuestra que el proceso usado para preparar los tubos no causó pérdida significativa de la actividad de OsPA.

50 EJEMPLO 16: PREPARACIÓN DEL TUBO DE RECOGIDA DE SANGRE

Actualmente, todos los tubos comerciales de suero y plasma son de plástico y contienen una serie de componentes que han sido desarrollados por los proveedores para mejorar la calidad de las muestras preparadas en los mismos. Como se ha comentado anteriormente, algún recipiente (por ejemplo, tubos) para la preparación de una muestra de suero o una muestra de plasma contiene:

- 55 (1) una barrera de gel que pretende separar las células (y coagular en el caso del suero) del sobrenadante (suero o plasma) después de la centrifugación y limitar la repetición de la mezcla. El gel se añade en forma de un líquido tibio que se solidifica al enfriarse hasta la temperatura ambiente;
- 60 (2) un tensioactivo pulverizado sobre la superficie interna del tubo de plástico por encima de la barrera de gel para disminuir la unión de las células, residuos y material de coágulos y lisis celular; y
- (3) un procoagulante/anticoagulante, normalmente, en forma de partículas, pulverizado como una suspensión sobre la superficie interna del tubo encima del agente tensioactivo.

65

La presente invención prevé un tubo de suero (por ejemplo, un tubo de plástico) que comprende los componentes (1), (2) y (3) descritos anteriormente, en la que el tubo se prepara añadiendo primero los componentes (1) y (2.) al tubo, y luego añadiendo el componente (3) al tubo. El componente (3) comprende un procoagulante que comprende una composición de coagulación que comprende, consiste esencialmente en o consiste en un activador de la protrombina como se define en el presente documento, por ejemplo, el componente (3) puede comprender procoagulantes particulados existentes usados en algunos tubos de suero comerciales. La cantidad de activador de la protrombina dentro de cada tubo puede determinarse usando los resultados experimentales descritos en detalle anteriormente, y las técnicas de rutina. Los tubos se vacían luego y se tapan de forma estéril. Los tubos se almacenan a temperatura ambiente.

También se prevé un tubo de suero (por ejemplo, un tubo de plástico) que comprenda el componente (3) y que comprenda opcionalmente los componentes (1) y/o (2). La cantidad de activador de la protrombina dentro de cada tubo puede determinarse usando los resultados experimentales descritos en detalle anteriormente, y las técnicas de rutina. Los tubos se vacían y se tapan de forma estéril, y pueden almacenarse a temperatura ambiente.

EJEMPLO 17: REALIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO INMEDIATO

Como se ha comentado anteriormente, la prueba de "diagnóstico inmediato" significa que la prueba se realiza en o cerca del sitio de atención del paciente. Las pruebas de diagnóstico inmediato se están volviendo cada vez más populares en los hospitales y otros entornos donde se necesitan resultados rápidos. Se realizan usando una variedad de dispositivos, algunos de los cuales son relativamente económicos, pequeños y portátiles.

En la práctica actual, muchos dispositivos de diagnóstico inmediato funcionan de la siguiente manera: se coloca una gota de sangre sobre una membrana que retiene células sanguíneas, pero permite que el plasma se difunda a través de la membrana en un dispositivo microfluídico con múltiples canales, en los que se realiza un número de análisis. Como se ha mencionado en otra parte, se prefiere el suero al plasma como muestra para ensayos bioquímicos u otros ensayos de patología. En esta realización, la presente invención contempla el uso de composiciones de coagulación que comprenden, que consisten esencialmente en o que consisten en un activador de la protrombina para producir suero en dispositivos diseñados para la prueba de diagnóstico inmediato.

En uno de dichos dispositivos, adecuados para su uso en hospitales y en procedimientos quirúrgicos, se extrae una muestra de sangre obtenida por venopunción en una jeringa (o similar) que contiene una composición de coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o consiste en un activador de la protrombina, en el que la composición se logra en ~30 segundos. El dispositivo está diseñado para permitir la filtración o la centrifugación para separar rápidamente el suero del coágulo. El suero así obtenido se usa en dispositivos microfluídicos existentes para ensayos bioquímicos u otros ensayos de patología, aumentándose el rango de análisis, ya que la muestra que se analiza es suero en lugar del plasma que se usa en los dispositivos existentes de diagnóstico inmediato. Además, se puede conservar una muestra del suero para permitir un análisis adicional en el laboratorio de patología.

El dispositivo de filtración de la jeringa descrita anteriormente puede comprender un mecanismo de filtración que permita empujar el suero tras 5 minutos para el análisis. De manera adecuada, la jeringa se puede dividir en compartimientos como se ilustra en la Figura 62, con la jeringa marcada de la siguiente manera:

A - puerto de entrada, que tendrá un adaptador de aguja de extracción de sangre que se desenroscaría para minimizar el componente protuberante;

B - puerto para dispensar suero o punto de entrada para las agujas de muestras de diagnóstico inmediato;

C - válvulas para permitir la entrada de una vía de sangre y evitar que la sangre sea empujada al compartimiento del suero;

D - filtro de émbolo que permitiría que el suero salga al compartimiento del suero (parte frontal de la jeringa);

E - apertura para que la sangre entre en el compartimiento de sangre.

F - ion del compartimiento en el que se produce la coagulación.

En la Figura 62, G se recubre con la composición de coagulación en el interior para establecer el proceso de coagulación en su lugar. Luego se empuja para forzar el suero a través del filtro (D).

En otro dispositivo de este tipo, el dispositivo de diagnóstico inmediato incluye un sistema capilar, en el que parte del dispositivo está recubierto con una composición de coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o consiste en un activador de la protrombina y un absorbente que puede extraer el suero en la cámara de reacción para el análisis.

En otro dispositivo de este tipo, se podría acoplar una composición de coagulación que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en un activador de la protrombina a la membrana de un dispositivo microfluídico para lograr una rápida coagulación de una gota de sangre colocada sobre la membrana. El suero así formado se difunde en el dispositivo y se analiza en lugar del plasma analizado actualmente en dichos dispositivos.

RESUMEN DE LOS EJEMPLOS

La obtención de una muestra adecuada para el análisis de manera oportuna es fundamental en la provisión de servicios de química clínica. Se reconoce que el suero es la muestra más limpia, pero, debido al tiempo requerido para completar la coagulación (30 minutos para garantizar la coagulación completa en la mayoría de los tubos comerciales disponibles en la actualidad más el tiempo de análisis en los protocolos convencionales) y al número cada vez mayor de pacientes con tratamiento anticoagulante, normalmente, se usa plasma, en especial, en los entornos hospitalarios. Sin embargo, se puede producir la coagulación latente (coagulación tras la centrifugación) en las muestras de plasma, lo que conduce a errores analíticos y a retrasos en la entrega de resultados de importancia fundamental. Algunos de estos problemas se ilustran en los ejemplos anteriores.

Los resultados de los ejemplos anteriores también muestran que el uso de activadores de la protrombina puede producir suero de alta calidad muy rápidamente a partir de muestras de sangre de una amplia variedad de pacientes, incluyendo pacientes que están siendo tratados con anticoagulantes. Proporcionan alternativas adecuadas a los tubos de plasma de heparina de litio y de suero convencionales al:

- completar el proceso de coagulación en ~5 minutos (tiempo necesario para enviar las muestras al laboratorio) permitiendo un análisis rápido tras la extracción de las muestras de sangre y, por tanto, tiempos de respuesta rápidos comparables a los tiempos de los tubos de plasma y mejores que los de la mayoría de los tubos de suero actuales;
- al mismo tiempo, proporcionar muestras de suero de alta calidad para sangre de los individuos tanto sanos como totalmente anticoagulados que se pueden encontrar en un entorno clínico con la mínima interferencia en los análisis por parte de los residuos celulares y/o la microcoagulación latente; y
- producir una sola muestra de suero que sea adecuada para una amplia gama de ensayos normalmente usados en el entorno clínico, siendo la muestra de suero superior a la de plasma para el análisis de análisis, y reduciendo la muestra única la carga de recursos escasos (sangre en pacientes en estado crítico, tiempo del personal y consumibles por la necesidad de extraer menos tubos de sangre).

A lo largo de la memoria descriptiva, el objetivo ha sido describir las realizaciones preferidas de la invención sin limitar la invención a ninguna realización o conjunto específico de características. Los expertos en la materia apreciarán, por tanto, que, a la luz de la presente divulgación, se pueden realizar diversas modificaciones y cambios en las realizaciones particulares ilustradas sin apartarse del alcance de la presente invención. Todas estas modificaciones y cambios pretenden incluirse dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Bibliografía

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* 1 de septiembre de 1997; 25(17): 3389-402.
- Arkin, A. P., Youvan, D. C., "An algorithm for protein engineering: simulations of recursive ensemble mutagenesis", 1992 *Proc. Natl. Acad. Sci. EE,UU.*, 89: 7811-7815.
- Atherton, E., Shephard, R. C., "Solid Phase Peptide Synthesis - A Practical Approach", 1989, IRL Press, Oxford England.
- Austen, D. E., Rhymes, I. L., "Laboratory manual of blood coagulation" (1975) Blackwell Scientific Publications, Londres, documento p37.
- Bos, M. H. A., Boltz, M., St Pierre, L., Masci, P. P., de Jersey, J., Lavin, M. F., Camire, R. M., "Venom factor V from the common brown snake escapes hemostatic regulation through procoagulant adaptations" *Blood*, 16 de julio de 2009; 114(3): 686-692.
- Camenzind, E., Bakker, W. H., Reijs, A., van Geijlswijk, I. M., Boersma, E., Kutryk, M. J., Krenning, E. P., Roelandt, J. R., Serruys, P. W., "Site-specific intracoronary heparin delivery in humans after balloon angioplasty. A radioisotopic assessment of regional pharmacokinetics". *Circulation* 1997; 96: 154-65.
- Ciuti, R., Rinaldi, G., "Serum and plasma compared for use in 19 common chemical tests performed in the Hitachi 737 analyzer". *Clin Chem.* 1989; 35: 1562-3.
- Cowley, D. M., Nagle, B. A., Chalmers, A. H., Sinton, T. J., "Effects of platelets on collection of specimens for assay of ammonia in plasma". *Clin Chem* 1985; 31: 332.
- Davidson, A. S., Dam, S. M., Sodi, R., "Can lithium heparin plasma be used for protein electrophoresis and paraprotein identification?", *Ann Clin Biochem* 2006; 43: 31-34.

- Dayhoff, M. O., Schwartz, R. M., Orcutt, B. C., et al., "A model of evolutionary change in proteins. Matrices for determining distance relationships", 1978 en *Atlas of protein sequence and structure* (Dayhoff, M. O. ed.), Vol 5, pág. 345-358, National Biomedical Research Foundation, Washington DC.
- Delagrave, S., Goldman, E. R., Youvan, D. C., "Recursive ensemble mutagenesis", abril de 1993 *Protein Eng.* 6(3): 327-31.
- Devereux, J., Haeberli, P., Smithies, O., "A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX". *Nucleic Acids Res.* 11 de enero de 1984; 12(1 Pt 1): 387-95.
- Dimeski, G., Masci, P. P., Trabi, M., Lavin, M. F., de Jersey, J., "Evaluation of the Becton-Dickinson rapid serum tube: does it provide a suitable alternative to lithium heparin plasma tubes?", *Clin Chem Lab Med* 2010; 48(5): 2111-2120.
- Dimeski, G., Hadrick, T., Flatman, R., Ormiston, B., "Roche IFCC Methods for Lactate Dehydrogenase Tested for Duplicate Errors with Greiner and Becton-Dickinson Lithium-Heparin and Greiner Serum Samples", *Clin Chem* 2004; 50(12): 2391-2392.
- Dimeski, G., Carter, A., "Rare IgM Interference with Roche/Hitachi Modular Glucose and γ -Glutamyltransferase Methods in Heparin Samples", *Clin Chem* 2005; 51(11): 2202-2204.
- Dimeski, G., Clague, A. E., Hickman, P. E., "Correcting and reporting of potassium results in haemolysed samples", *Ann. Clin. Biochem.* 2005; 42: 119-123.
- Dimeski, G., McWhinney, B., Jones, B., Mason, R., Carter, A., "Extent of bilirubin interference in Beckman-Coulter creatinine methods". *Ann Clin Biochem* 2008; 45:91-92.
- Filippovich, I., Sorokina, N., St Pierre, L., Filght, S., de Jersey, J., Perry, N., Masci, P. P., Lavin, M. F. "Cloning and functional expression of venom prothrombin activator protease from *Pseudonaja textilis* with whole blood procoagulant activity", *British Journal of Haematology* 2005; 131: 237-246.
- Gonnet, G. H., Cohen, M. A., Benner, S. A., "Exhaustive matching of the entire protein sequence database", 5 de junio de 1992, *Science* 256(5062): 1443-5.
- Hartland, A. J., Neary, R. H., "Serum potassium is unreliable as an estimate of in vivo plasma potassium", *Clin Chem* 1999; 45:1091-1092.
- Kini, R. M., Morita, T., Ross, J., "Classification and Nomenclature of Prothrombin Activators Isolated from Snake Venoms", *Thromb. Haemost.* 2001 85:710-711.
- Kini, R. M., "The intriguing world of prothrombin activators from snake venom", *Toxicon* (2005) 45: 1133-1145.
- Kunkel, T. A., "Rapid and Efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection", 1985 *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 82: 488-492.
- Kunkel, T. A., Roberts, J. D., Zakour, R. A., "Rapid and Efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection", 1987, *Methods in Enzymol.* 154: 367-382.
- Kuzmic, P., "Program DYNAFIT for the Analysis of Enzyme Kinetic Data: Application to HIV Proteinase", 1996, *Anal. Biochem.* 237: 260-273.
- Lavin, M. F., Masci, P. P., "Prothrombinase complexes with different physiological roles", *Thromb Haemost* 2009; 102: 421-423.
- Masci, P. P., "The Effects of Australian Snake Venoms on Coagulation and Fibrinolysis", *Thesis for Masters of Science in the subject of Biochemistry*, julio de 1986, University of Queensland, St Lucia, Brisbane, Australia.
- Masci, P. P., Whitaker, A. N., de Jersey, J., "Purification and characterization of a prothrombin activator from the venom of the Australian brown snake, *Pseudonaja textilis textilis*", *Biochem. Int.* 1988; 17(5):825-835.
- Miles, R. R., Roberts, R. F., Putnam, A. R., Roberts, W. L., "Comparison of serum and heparinized plasma samples for measurement of chemistry analytes". *Clin Chem* 2004; 50: 1704-5.
- National Pathology Laboratory Accreditation Advisory Council - Requirements for the Retention of Laboratory Records and Diagnostic Material (Quinta edición 2009), disponible en línea, en: [http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf.Content/0392138A9970DFD1CA25737100D9200/\\$File/NPAAC%20Pub%20-%20Ret%20Records%20040110.pdf](http://www.health.gov.au/internet/main/publishing.nsf.Content/0392138A9970DFD1CA25737100D9200/$File/NPAAC%20Pub%20-%20Ret%20Records%20040110.pdf)
- Nishida, S., Fujita, T., Kohno, N., Atoda, H., Morita, T., Takeya, H., Kido, I., Paine, M. J. I., Kawabata, S-i., Iwanaga, S. "cDNA Cloning and Deduced Amino Acid Sequence of Prothrombin Activator (Ecarin) from Kenyan *Echis carinatus* venom". *Biochemistry* 1995; 34: 1771-1778.
- Morita, T., Iwanaga, S., "Prothrombin activator from *Echis carinatus* venom", *Meth Enzymol* 1981; 80-pt. C: 303-311.
- Nicholson, J., Mirtschin, P., Madaras, F., Venning, M., Kokkinn, M., "Digestive properties of the venom of the Australian Coastal Taipan, *Oxyuranus scutellatus* (Peters, 1867)", *Toxicon* 2006; 48: 422-428.
- O'Keane M. P., Cunningham, S. K., "Evaluation of three different specimen types (serum, plasma lithium heparin and serum gel separator) for analysis of certain analytes: clinical significance of differences in results and efficiency in use". *Clin Chem Lab Med.* 2006; 44: 662-8.
- Parker, H. W., Grandison, A. G. C., "Snakes: A natural history", University of Queensland Press, St. Lucia, Queensland 1977: pág 5, 59 y 87.
- Roberge, J. Y., Beebe, X., Danishefsky, S. J., "A strategy for a convergent synthesis of N-linked glycopeptides on a solid support", *Science* 1995 269(5221); 202-204.
- Ross, J., Tans, G., "Inventory of Exogenous Prothrombin Activators", *Thrombosis and Haemostasis* (Stuttgart) 1991 65(2): 627-630.
- Ross, J., Tans, G., "structural and Functional Properties of Snake Venom Prothrombin Activators", *Toxicon* 30(12): 1515-1527, 1992.
- Sambrook, J., Russell, D. W., "Molecular cloning. A laboratory manual" (tercera edición) 2001; Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Schieck, A., Komalik, F., Habermann, E. "The prothrombin-activating principle from *Echis carinatus* venom. I. Preparation and biochemical properties", *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1972; 272: 402-416.
- Sheppard, C. A., Allen, R. C., Austin, G. E., Young, A. N., Ribeiro, M. A., Fantz, C. R., "Paraprotein interference in automated chemistry analyzers". *Clin Chem*, junio de 2005; 51(6): 1077-8.
- 5 Smith, G. F., Craft, T. J., "Heparin reacts stoichiometrically with thrombin during thrombin inhibition in human plasma". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976; 71: 738-45.
- Sonder, S. A., Fenton, J. W., "Thrombin specificity with tripeptide chromogenic substrates: comparison of human and bovine thrombins with and without fibrinogen clotting activities", *Clin. Chem.* 1986; 32:934-7.
- 10 Speijer, H., Goversriemslag, J. W. P., Zwaal, R. F. A., Ross, J., "Prothrombin activation by an activator from the venom of *Oxyuranus scutellatus* (Taipan snake)", *J. Biol. Chem.* 1986; 261(28): 3258-3267.
- Starr, H., Rhodes, P., Lam-Po-Tang, P. R., Archer, G. T., "Prothrombin times: an evaluation of four thromboplastins and four machines", *Pathology* 1980; 12: 567-574.
- St Pierre, L., Masci, P., Filippovich, I., Sorokina, N., Marsh, N., Miller, D. J., Lavin, M. F., "Comparative Analysis of Prothrombin Activators from the Venom of Australian Elapids", *Mol. Biol. Evol.* 2005; 22(9): 1853-1864.
- 15 Tans, G., Govers-Riemslog, J. W., van Rijn, J. L., Ross, J. J., "Purification and properties of a prothrombin activator from the venom of *Notechis scutatus scutatus*", *Biol. Chem.* 5 de agosto de 1985; 260(16): 9366-72.
- Thorelli, E., Kaufman, R. J., Dahlbäck, B., "Cleavage requirements of factor V in tissue-factor induced thrombin generation", *Thromb. Haemost.* julio de 1998; 80(1) 92-98.
- 20 Wannaslip, N., Sribhen, K., Pussara, N., Hwanpuch, T., Wangchajaroekit, S., Opartkiattikul, N., "Heparin is unsuitable anticoagulant for the detection of plasma ammonia". *Clin Chimica Acta* 2006; 371: 196-7.
- Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A., Weiner, A. M. "Molecular Biology of the Gene". Cuarta edición, 1987 The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Menlo Park, California.
- Yamada, D., Sekiya, F., Morita, T., "Isolation and Characterization of Carinactivase, a Novel Prothrombin Activator in *Echis carinatus* Venom with a Unique Catalytic Mechanism", *J. Biol. Chem.* 1996; 271(9): 5200-5207.
- 25 Yamada, D., Morita, T., "Purification and Characterization of a Ca²⁺-Dependent Prothrombin Activator, Multactivase, from the Venom of *Echis multisquamatus*" *J. Biochem.* 1997; 122: 991-997.
- Yamanouye, N., Kerchove, C. M., Moura-da-Silva, A. M., Carneiro, S. M., Markus, R. P., "Long-term primary culture of secretory cells of *Bothrops jararaca* gland for venom production in vitro", *Nature Protocols* 2007; 1: 2763-2766.
- 30 Yonemura, H., Imamura, T., Soejima, K., Nakahara, Y., Morikawa, W., Ushio, Y., Kamachi, Y., Nakatake, H., Sugawara, K., Nakagaki, T., Nozaki, C., "Preparation of Recombinant α -Thrombin: High-Level Expression of Recombinant Human Prethrombin-2 and Its Activation by Recombinant Ecarin", *J. Biochem.* 2004; 135: 577-582.
- Zubay, G., *Biochemistry*, Tercera edición, Wm.C. Brown Publishers, Oxford (1993).

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición de coagulación en la preparación de una muestra de suero para la detección de analitos, en el que la composición de coagulación consiste esencialmente en activador de la protrombina purificado o comprende activador de la protrombina purificado o parcialmente purificado de veneno de serpiente.
2. Un recipiente para preparar una muestra de suero que es adecuada para detectar un analito de interés que está presente en la muestra de suero, recipiente que contiene una composición de coagulación que consiste esencialmente en activador de la protrombina purificado o que comprende activador de la protrombina purificado o parcialmente purificado de veneno de serpiente, y recipiente que está vacío.
3. Uso de una composición de coagulación que consiste esencialmente en un activador de la protrombina purificado o que comprende activador de la protrombina purificado o parcialmente purificado de veneno de serpiente en la fabricación de un recipiente para preparar una muestra de suero para la detección de analitos.
4. Un método para analizar una muestra de suero para determinar la presencia, ausencia o cantidad de un analito de interés, comprendiendo el método: poner en contacto una muestra de sangre con una composición de coagulación que consiste esencialmente en un activador de la protrombina purificado o que comprende activador de la protrombina purificado o parcialmente purificado de veneno de serpiente; y analizar la muestra de suero para determinar la presencia, ausencia o cantidad de un analito de interés.
5. Un método para diagnosticar la presencia, ausencia o gravedad de una enfermedad o afección en un sujeto, en el que la presencia, ausencia o gravedad de la enfermedad o afección está asociada con la presencia, ausencia o cantidad anómala de un analito de interés en el sujeto, método que comprende analizar una muestra de suero de acuerdo con el método de la reivindicación 4 para determinar de ese modo la presencia, ausencia o gravedad de la enfermedad o afección en el sujeto.
6. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 3, recipiente de acuerdo con la reivindicación 2, o método de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en los que el activador de la protrombina es un activador de la protrombina del grupo A.
7. Un uso, recipiente o método de acuerdo con la reivindicación 6, en los que el activador de la protrombina se selecciona entre ecarina y basparina.
8. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 3, recipiente de acuerdo con la reivindicación 2, o método de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en los que el activador de la protrombina es un activador de la protrombina del grupo B.
9. Un uso, recipiente o método de acuerdo con la reivindicación 8, en los que el activador de la protrombina se selecciona entre carinactivasa-1, carinactivasa-2 y multiactivasa.
10. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 3, recipiente de acuerdo con la reivindicación 2, o método de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en los que el activador de la protrombina es un activador de la protrombina del grupo C.
11. Un uso, recipiente o método de acuerdo con la reivindicación 10, en los que el activador de la protrombina se selecciona entre pseutarina C, oscutarina C y Omicarina C.
12. Un uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 3, recipiente de acuerdo con la reivindicación 2, o método de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en los que el activador de la protrombina es un activador de la protrombina del grupo D.
13. Un uso, recipiente o método de acuerdo con la reivindicación 12, en los que el activador de la protrombina se selecciona entre porfarina D, notecarina D, trocarina D, hopsarina D y notenarina D.

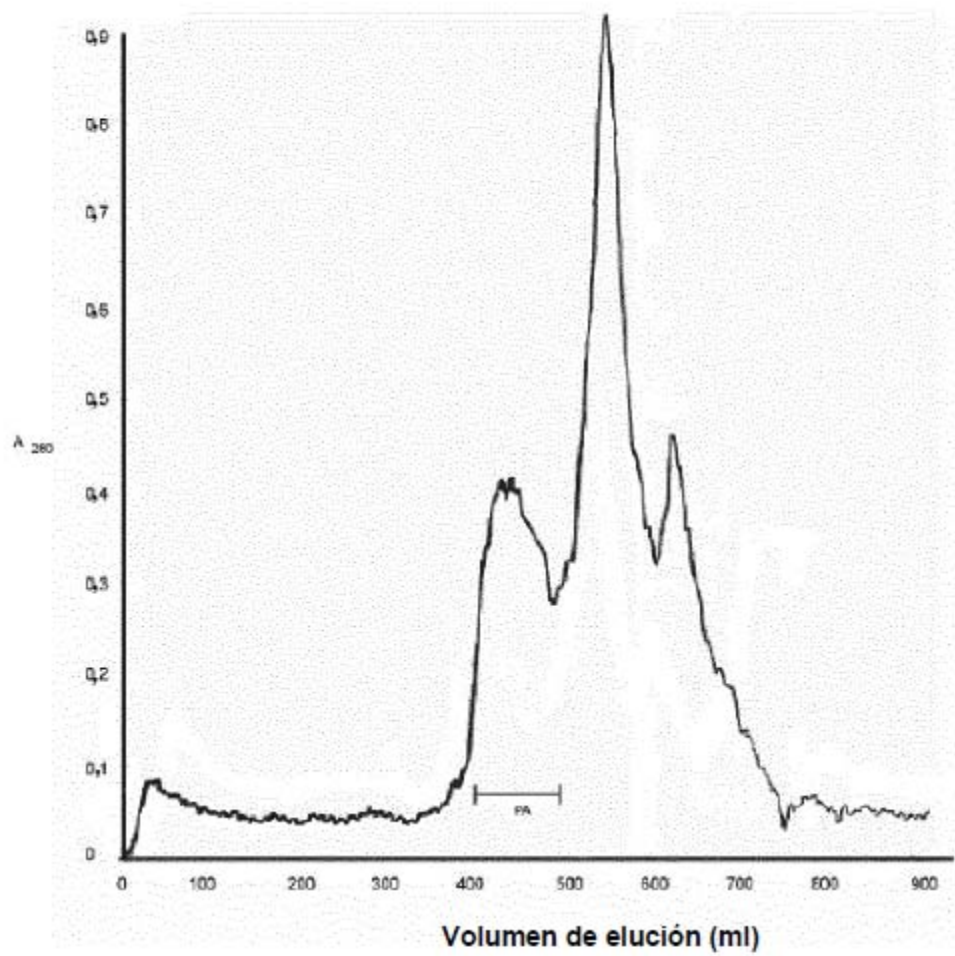


FIGURA 1

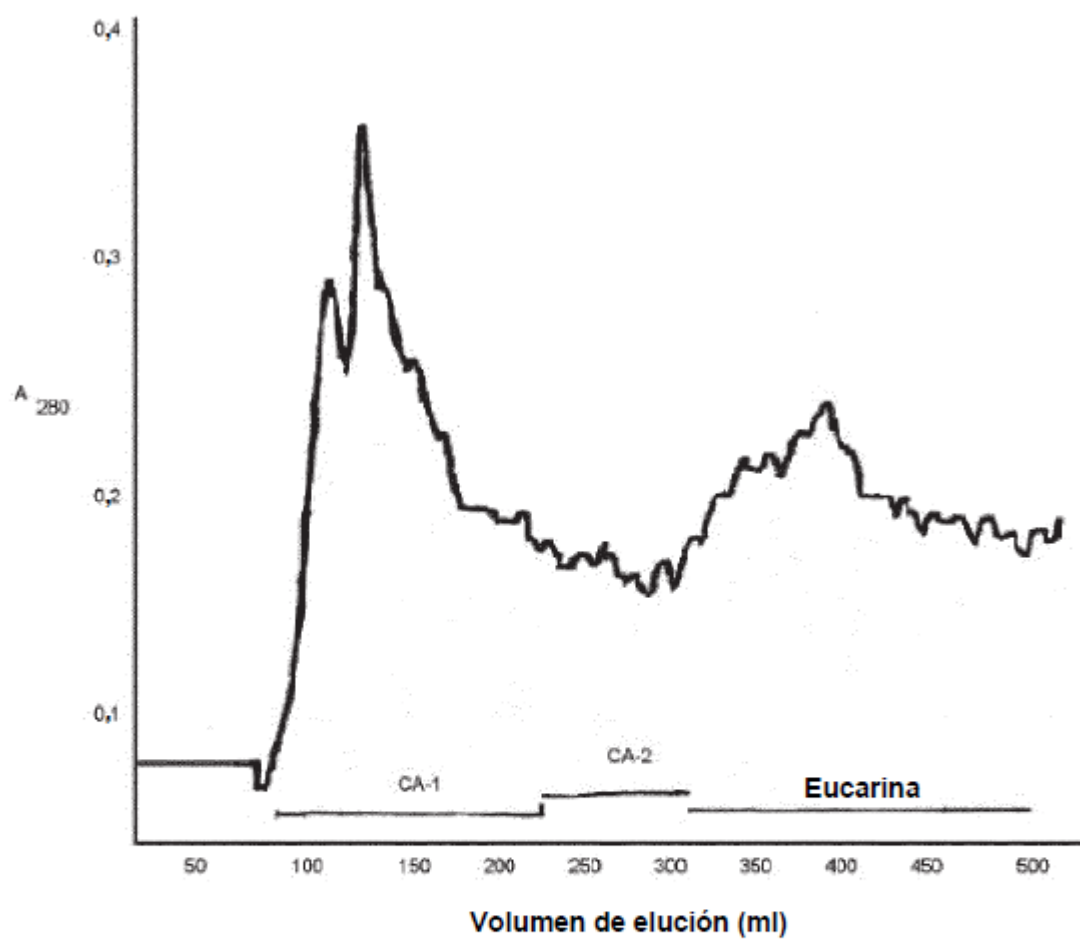


FIGURA 2

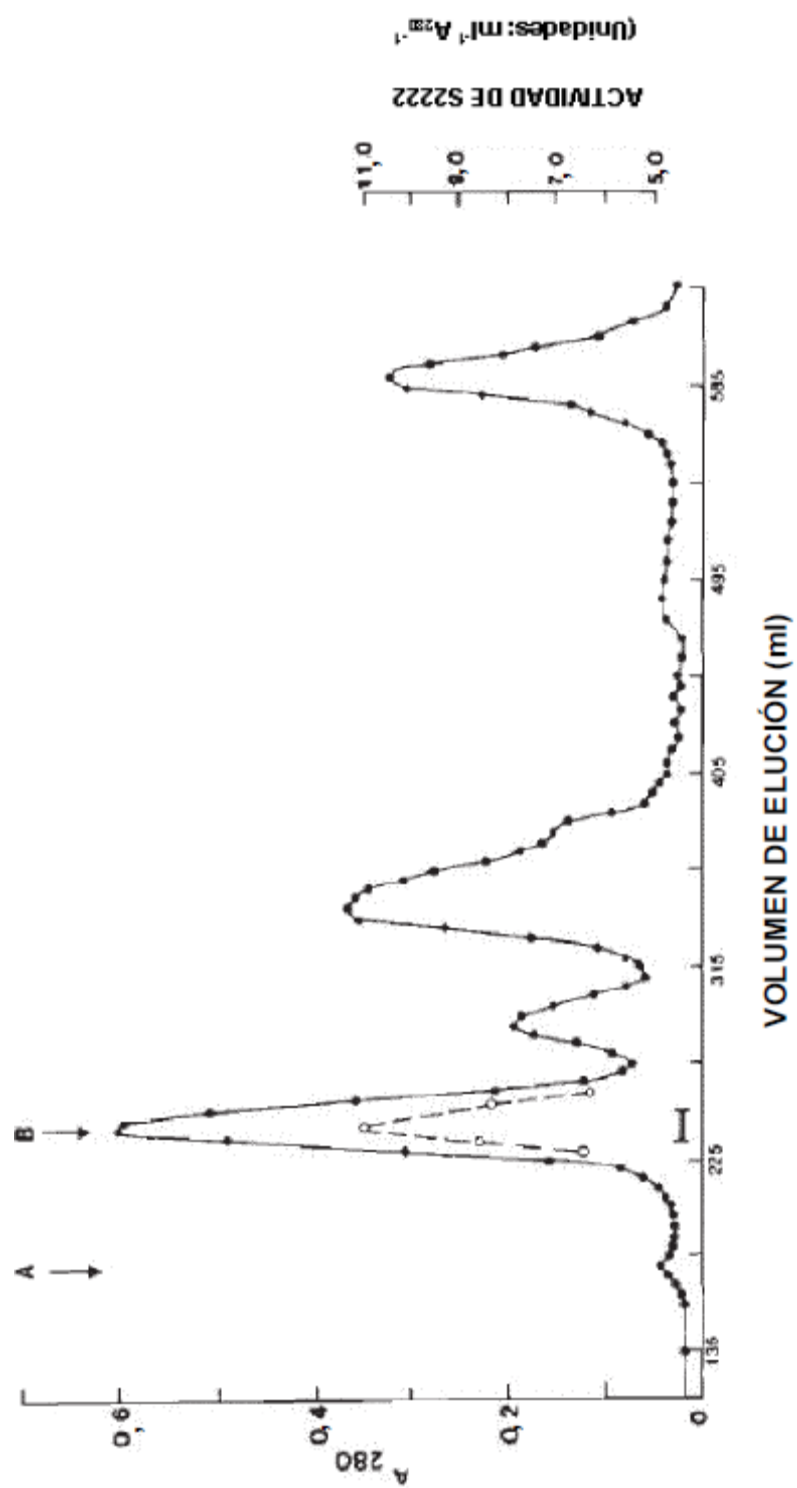


FIGURA 3

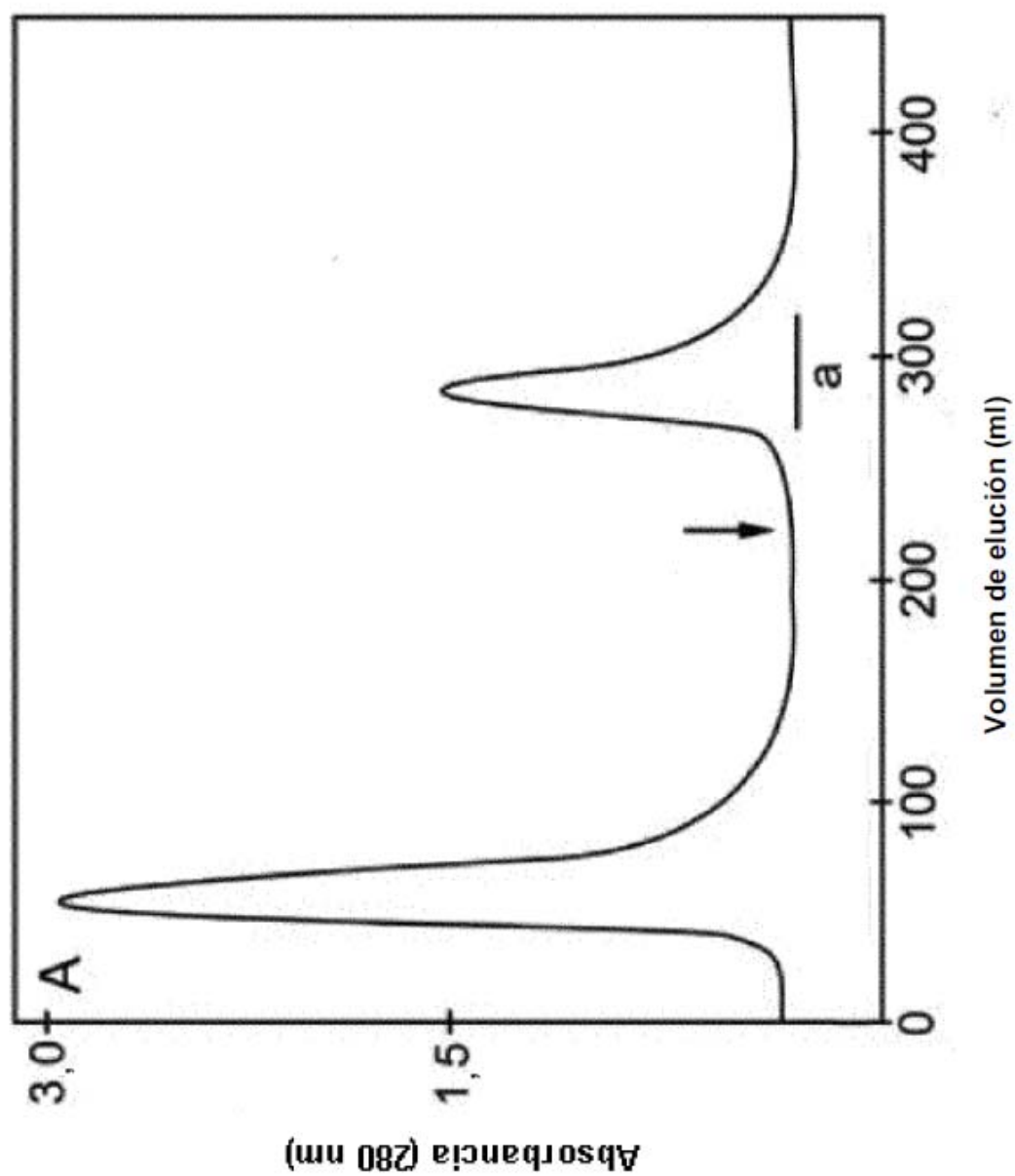


FIGURA 4

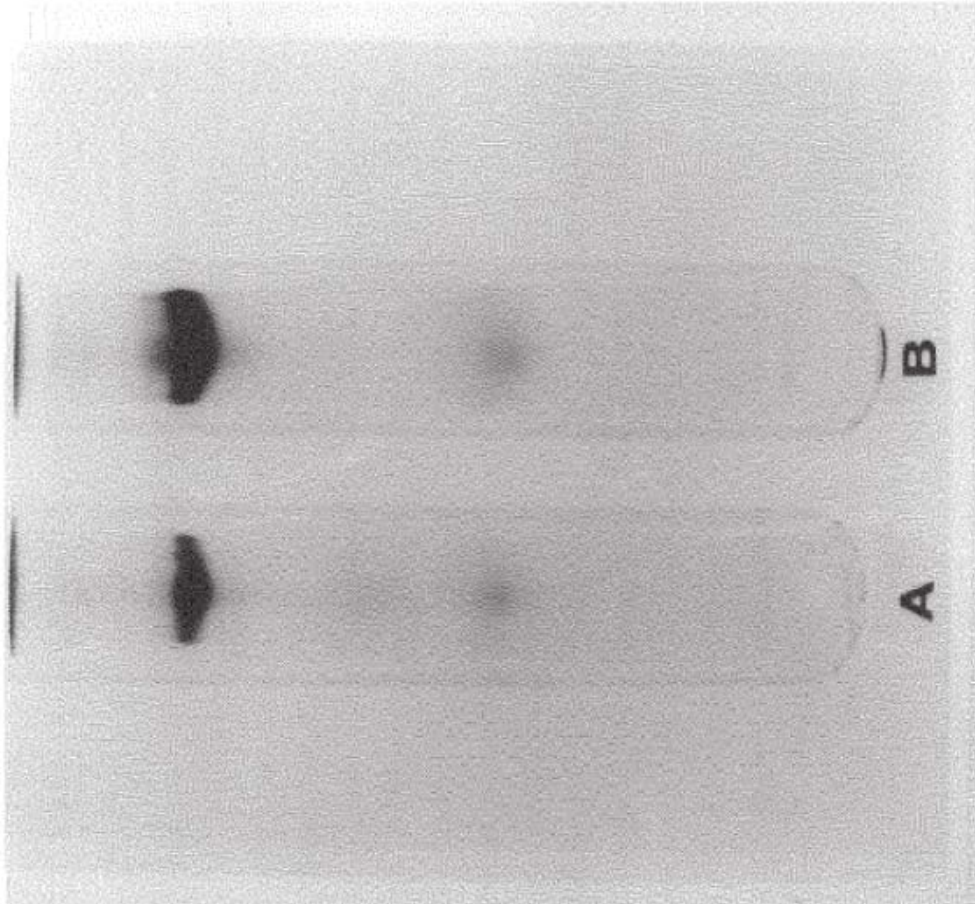


FIGURA 5

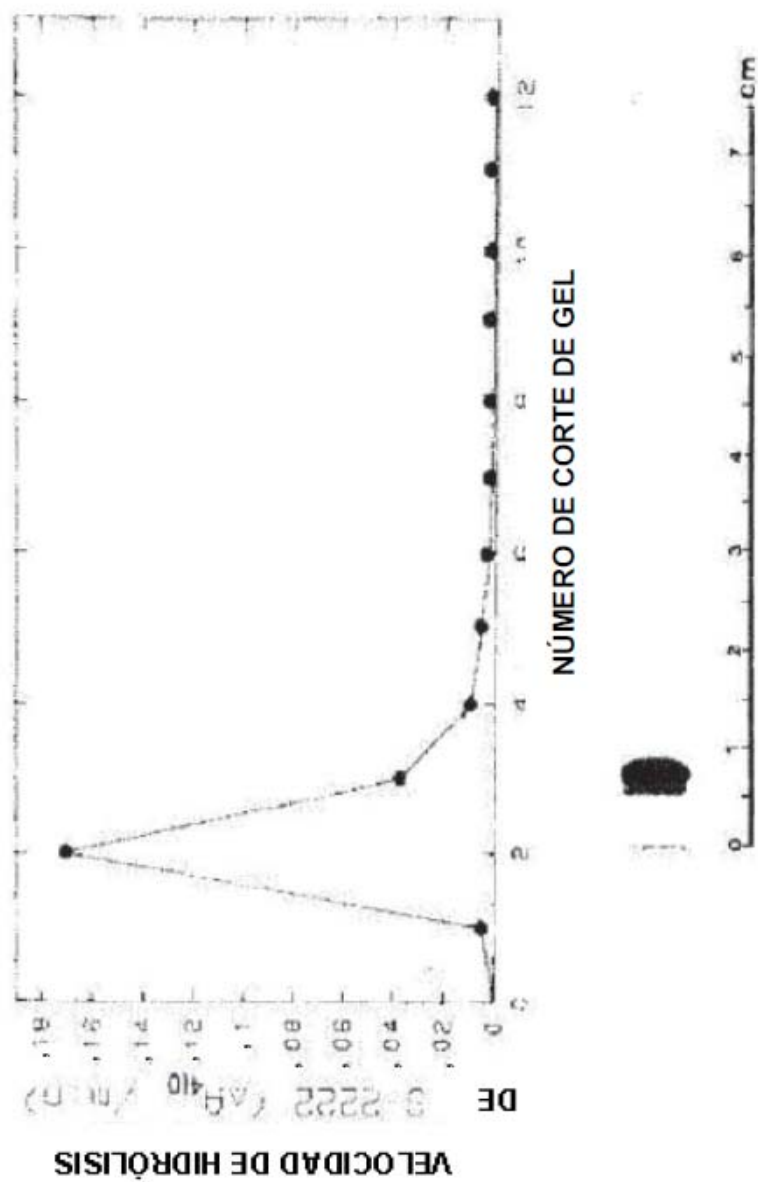


FIGURA 6

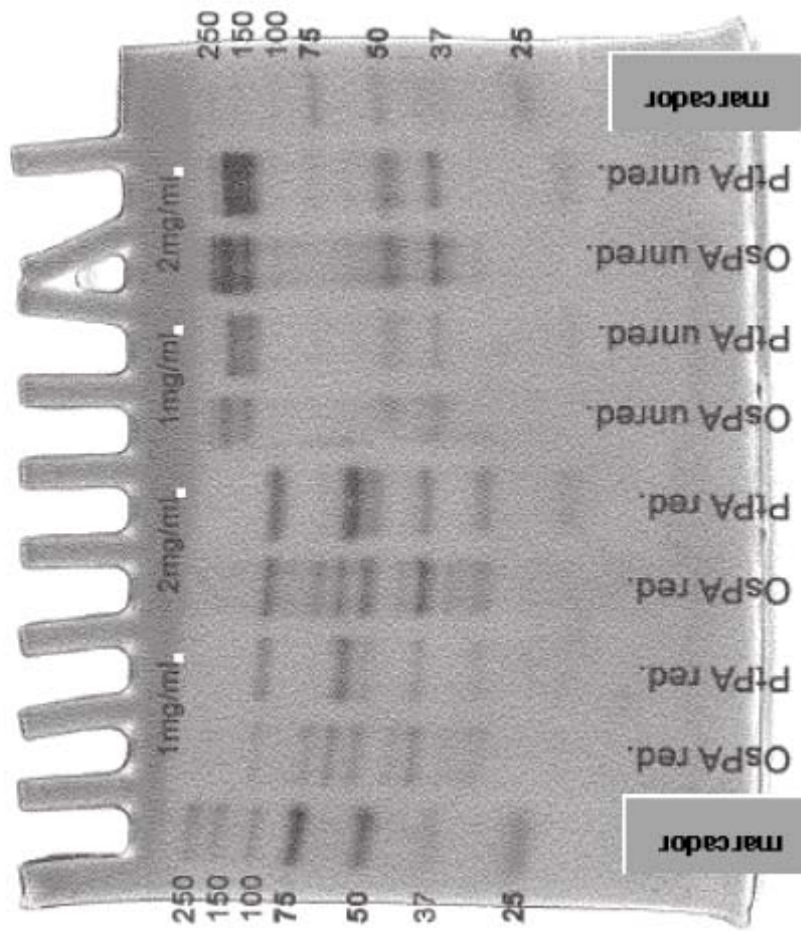


FIGURA 7

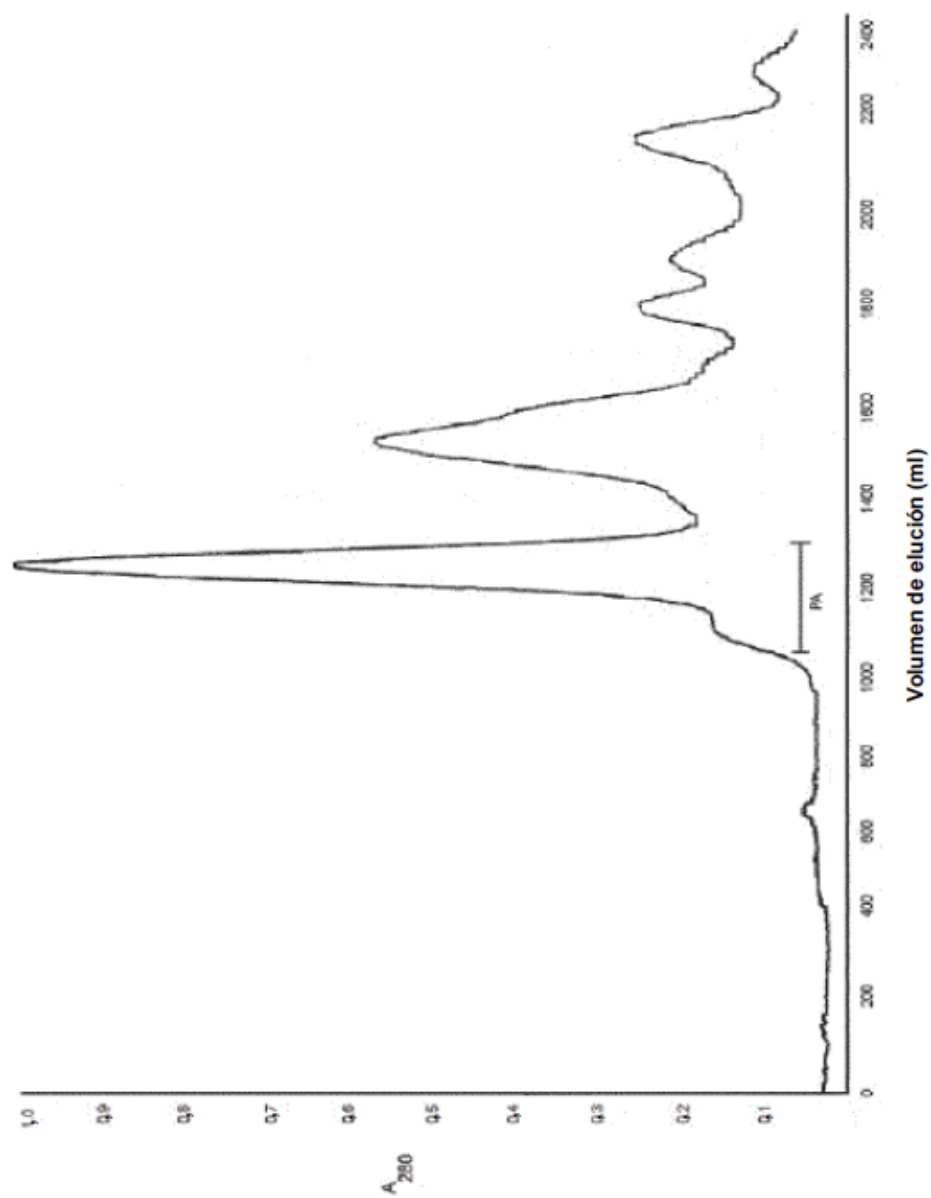


FIGURA 8

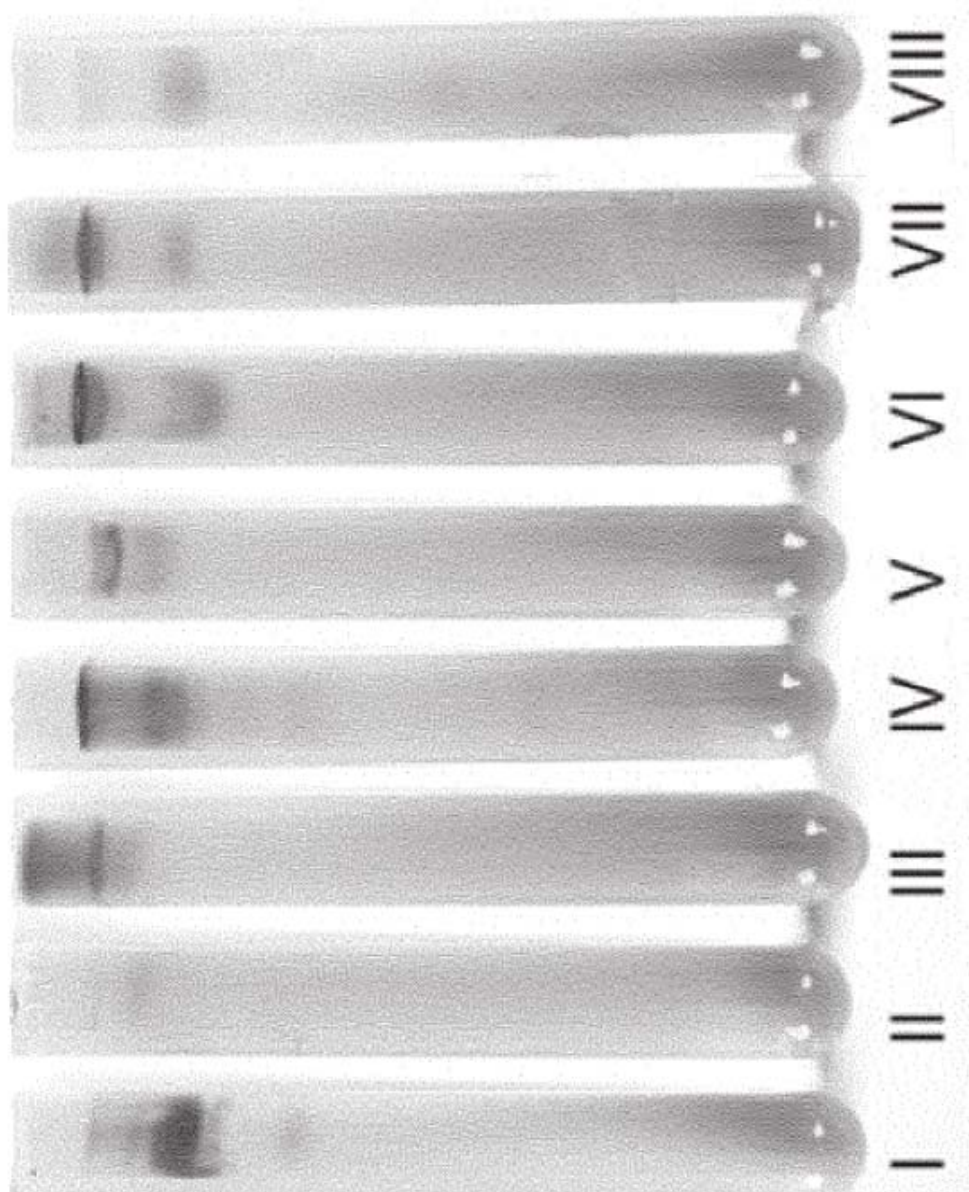


FIGURA 9

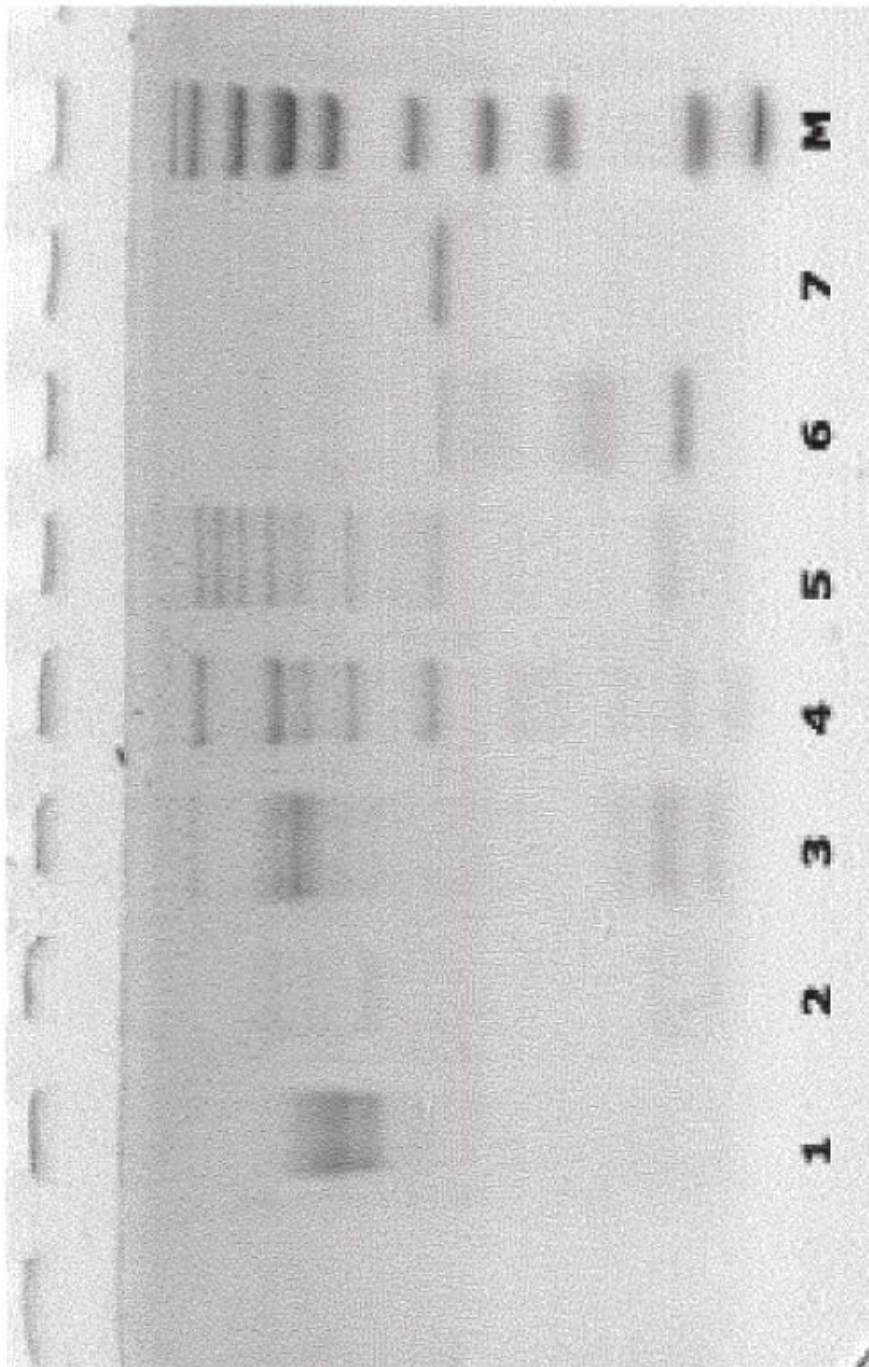


FIGURA 10

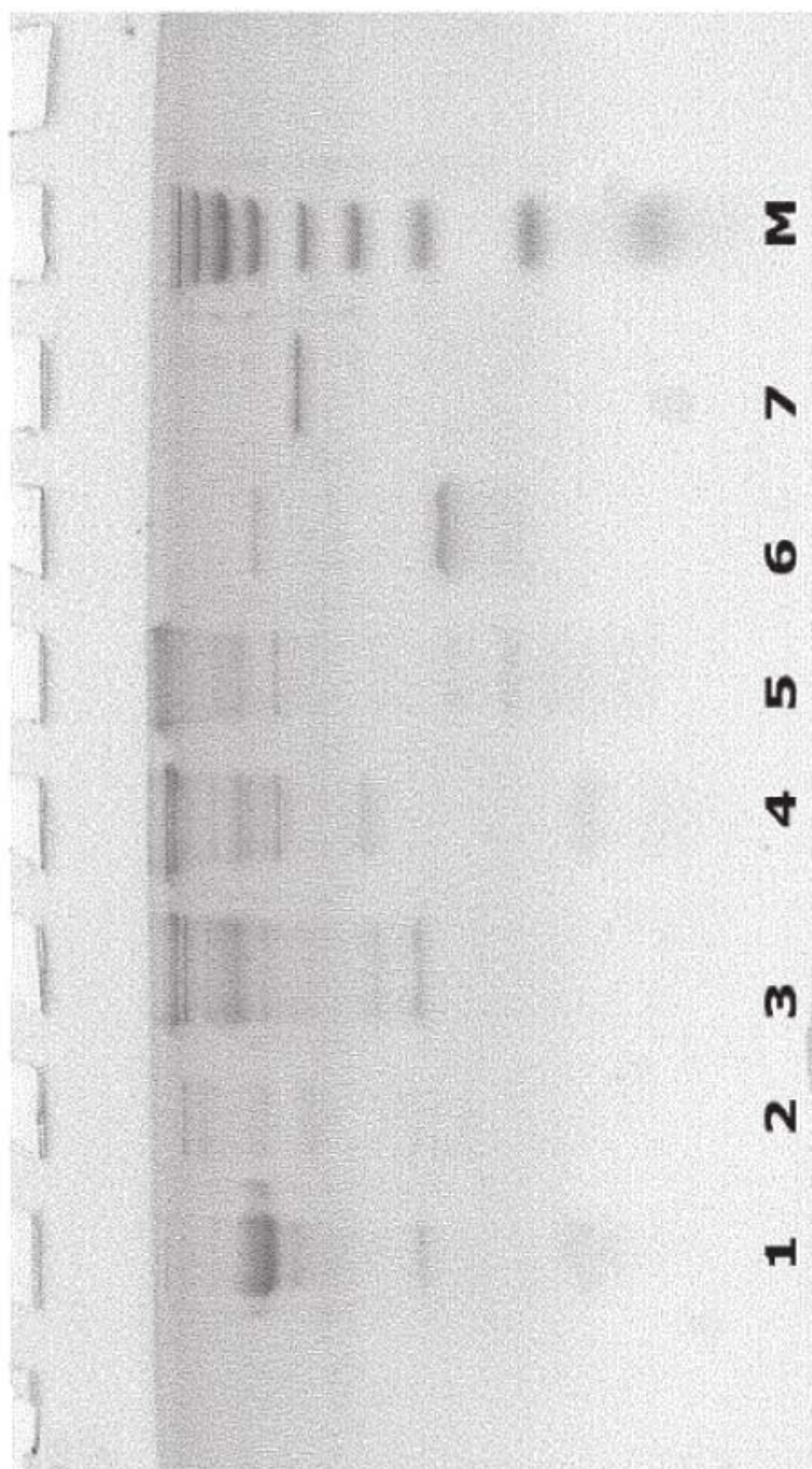


FIGURA 11

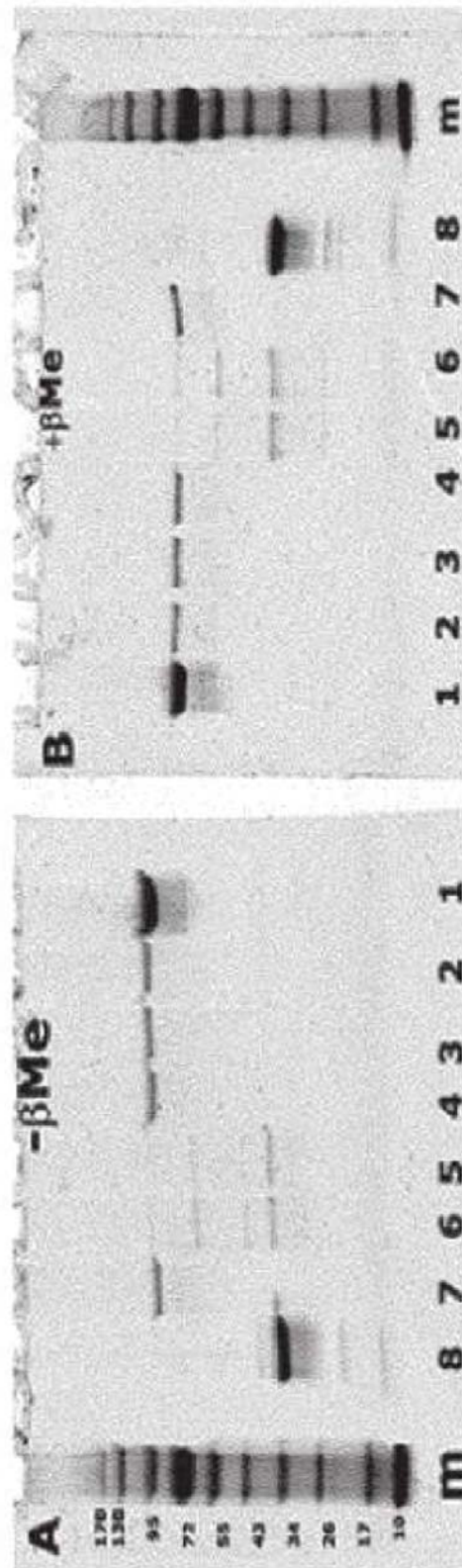
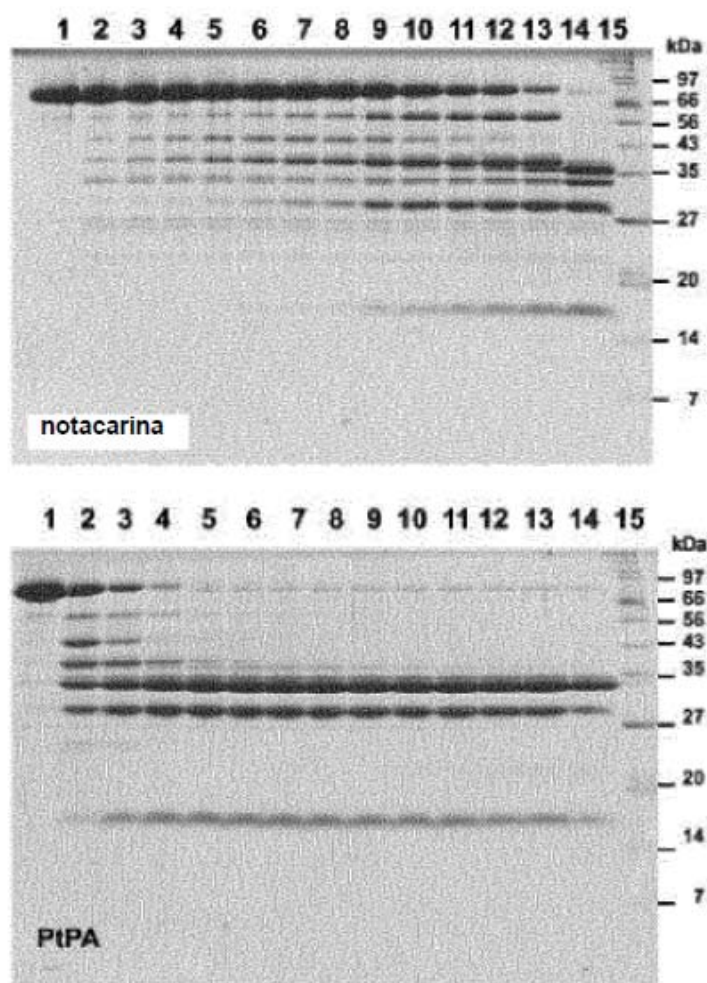


FIGURA 12



Carril	Tiempo (min)
1	0
2	0,5
3	1
4	2
5	4
6	6
7	8
8	10
9	15
10	20
11	25
12	30
13	45
14	150

FIGURA 13

Datos de la secuencia N-terminal de escisión de la protrombina

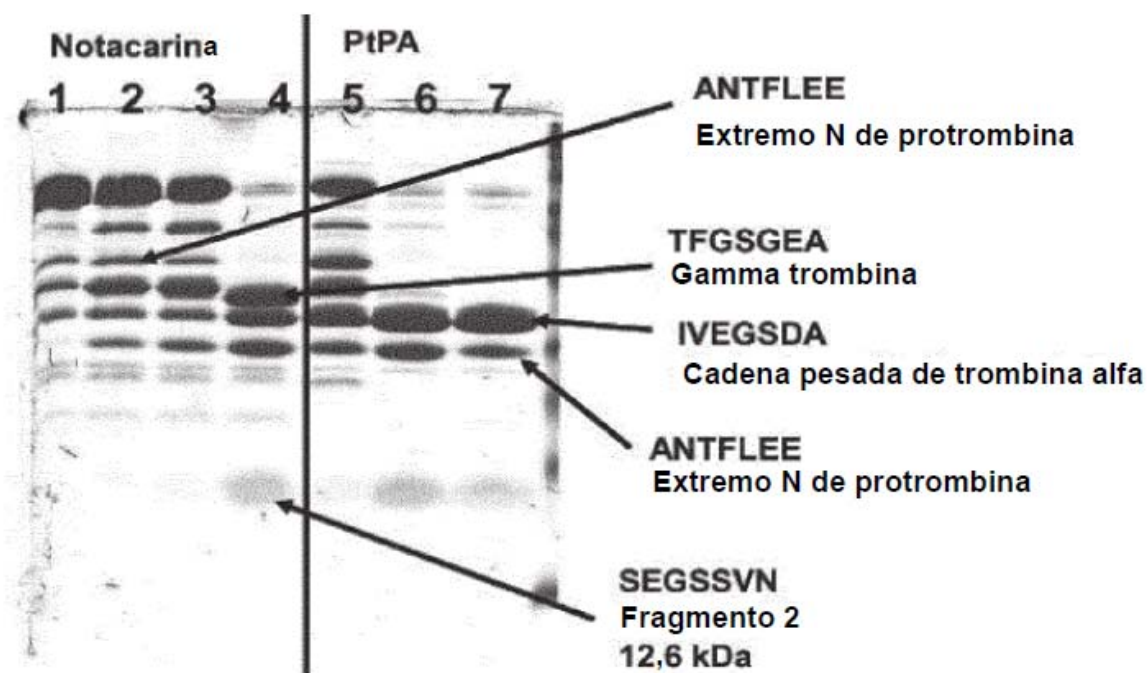


FIGURA 14

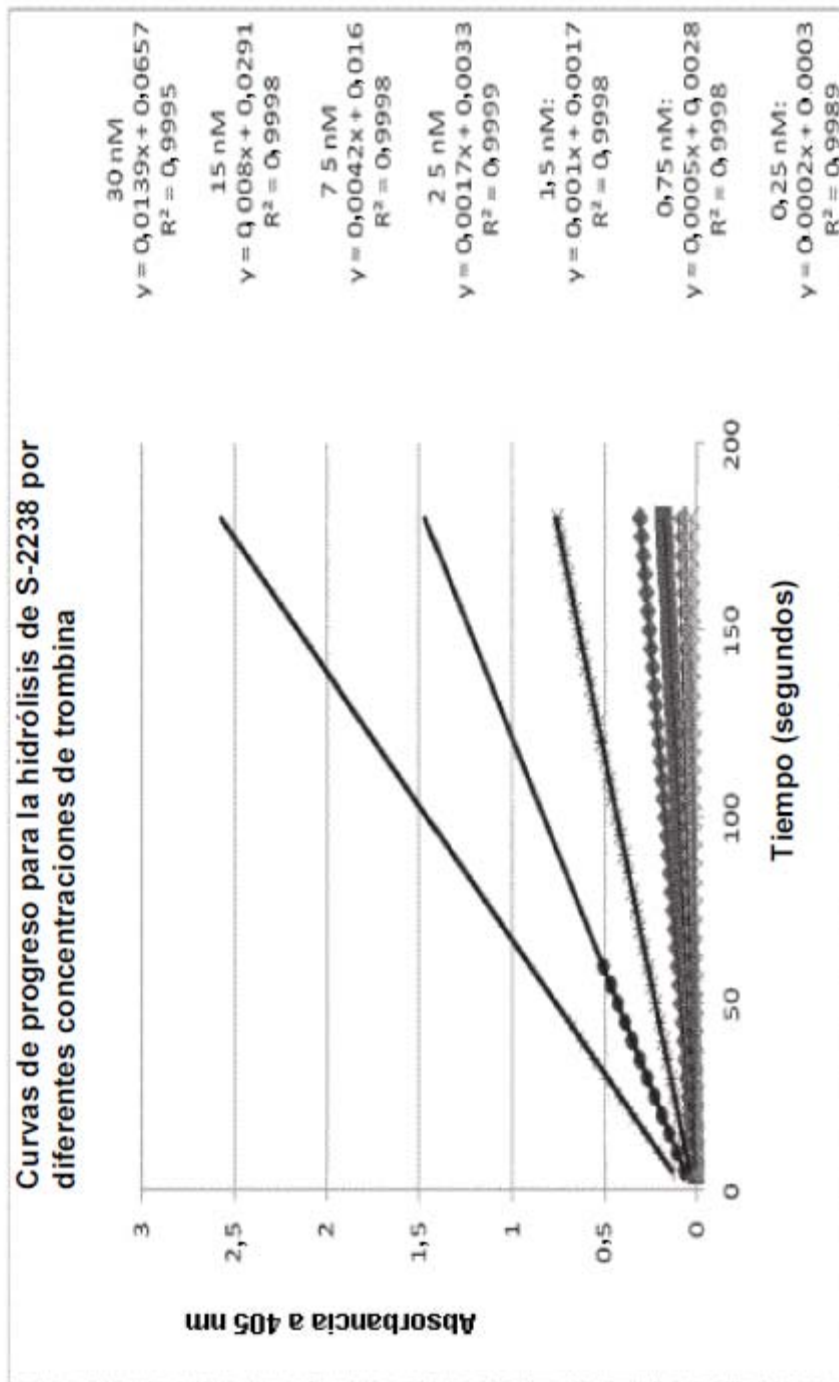


FIGURA 15

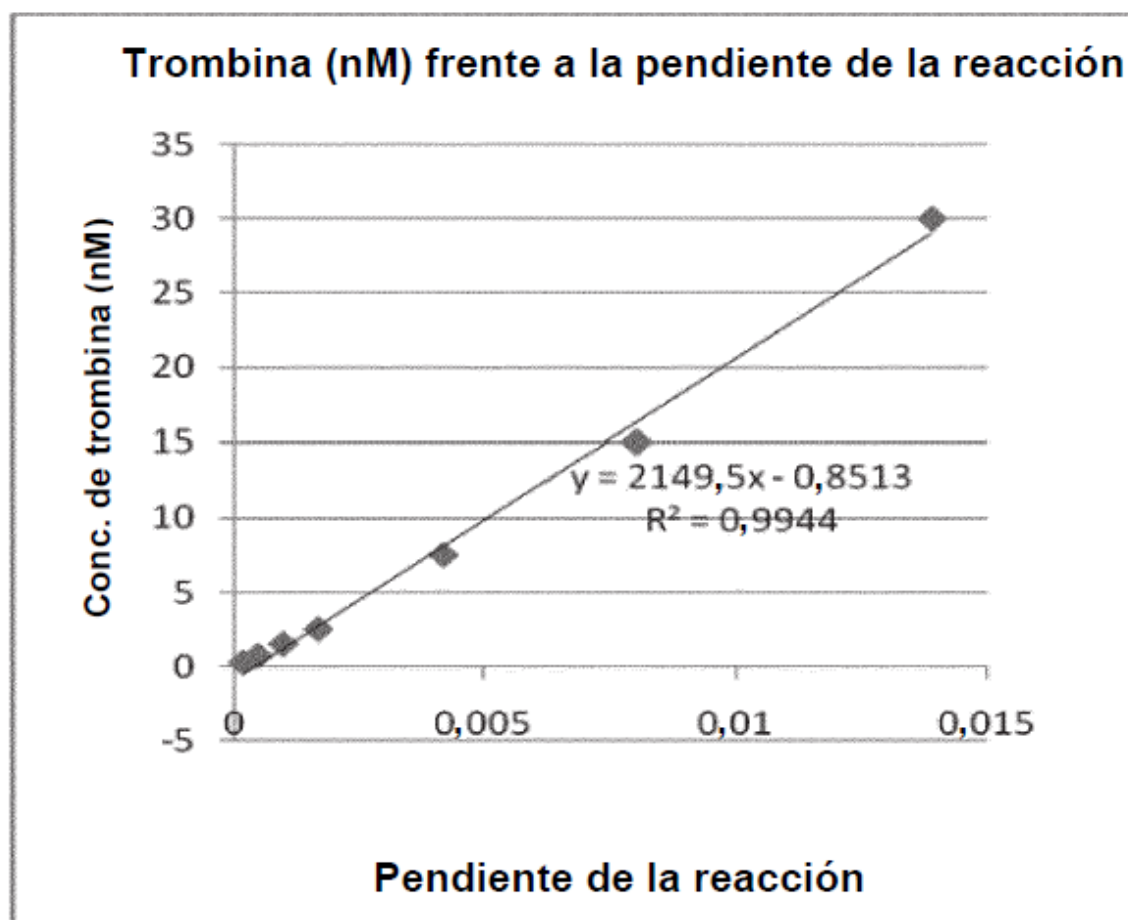


FIGURA 16

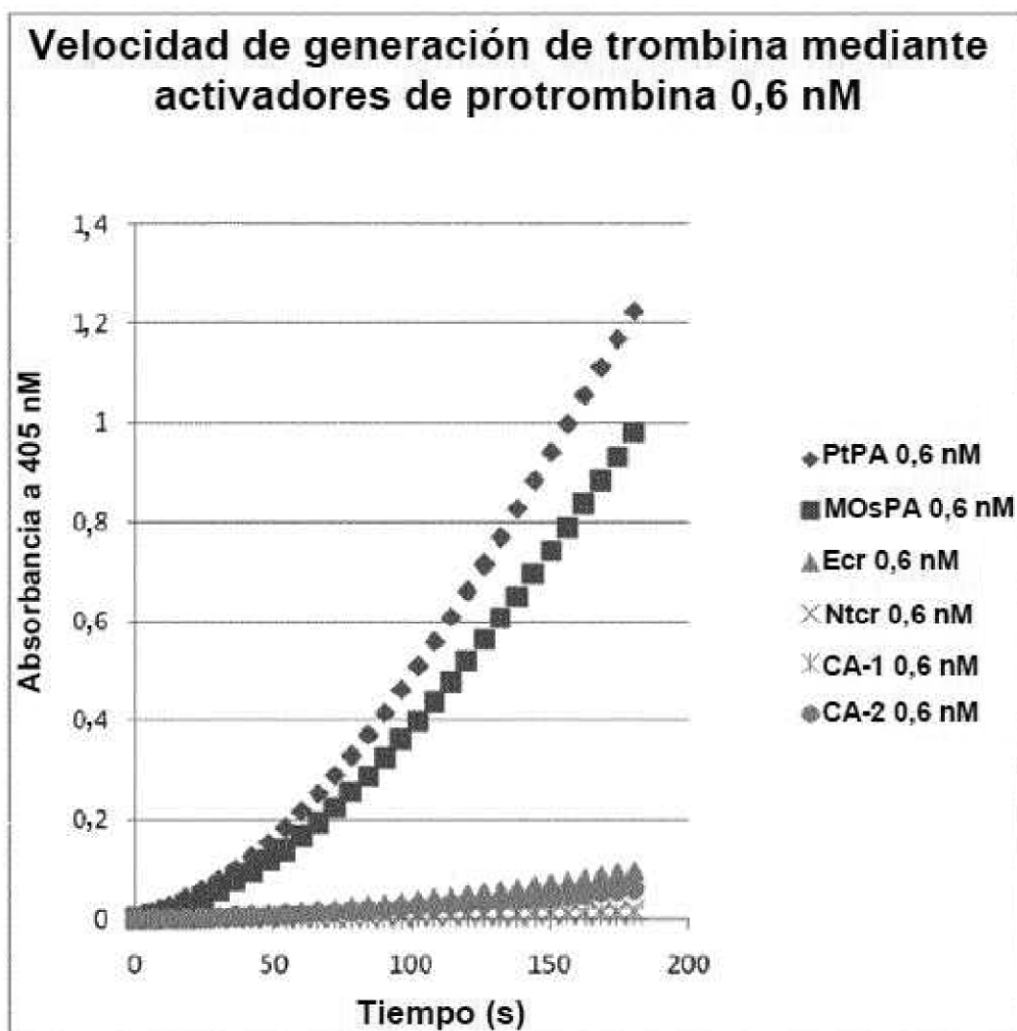


FIGURA 17

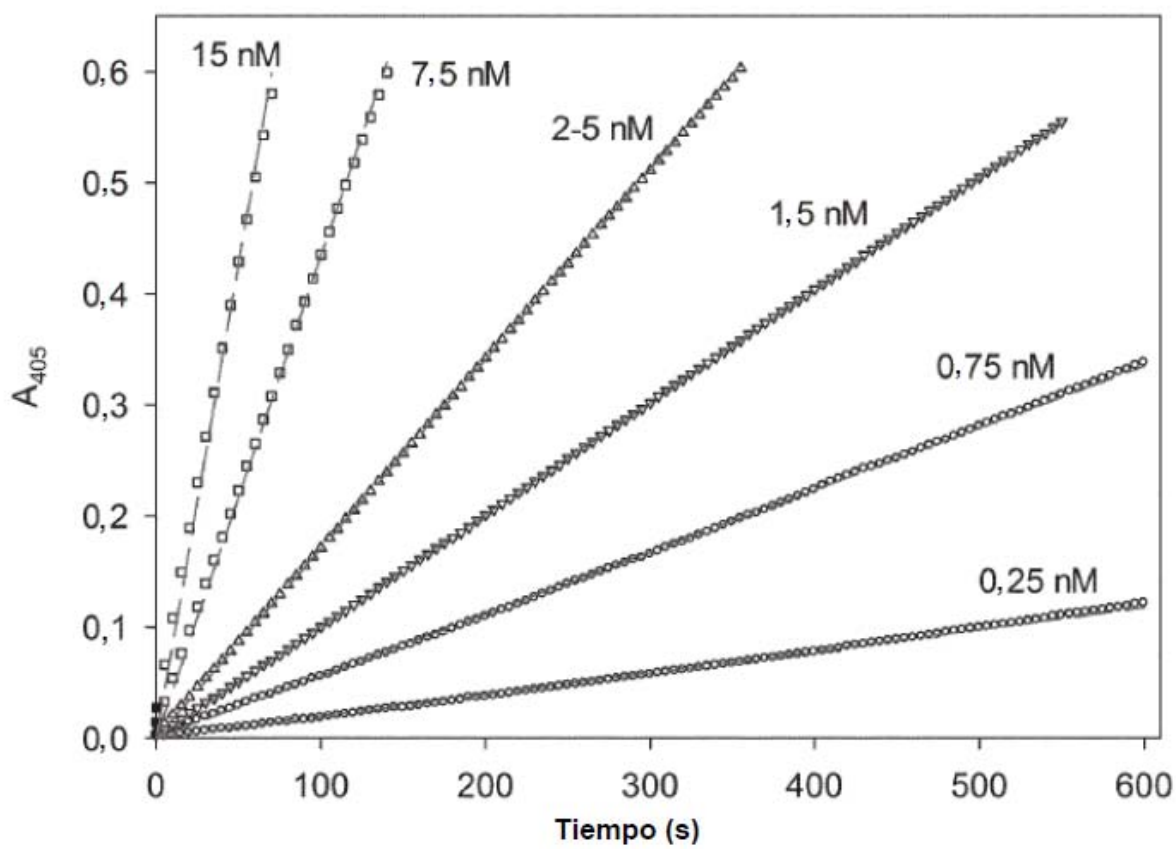


FIGURA 18

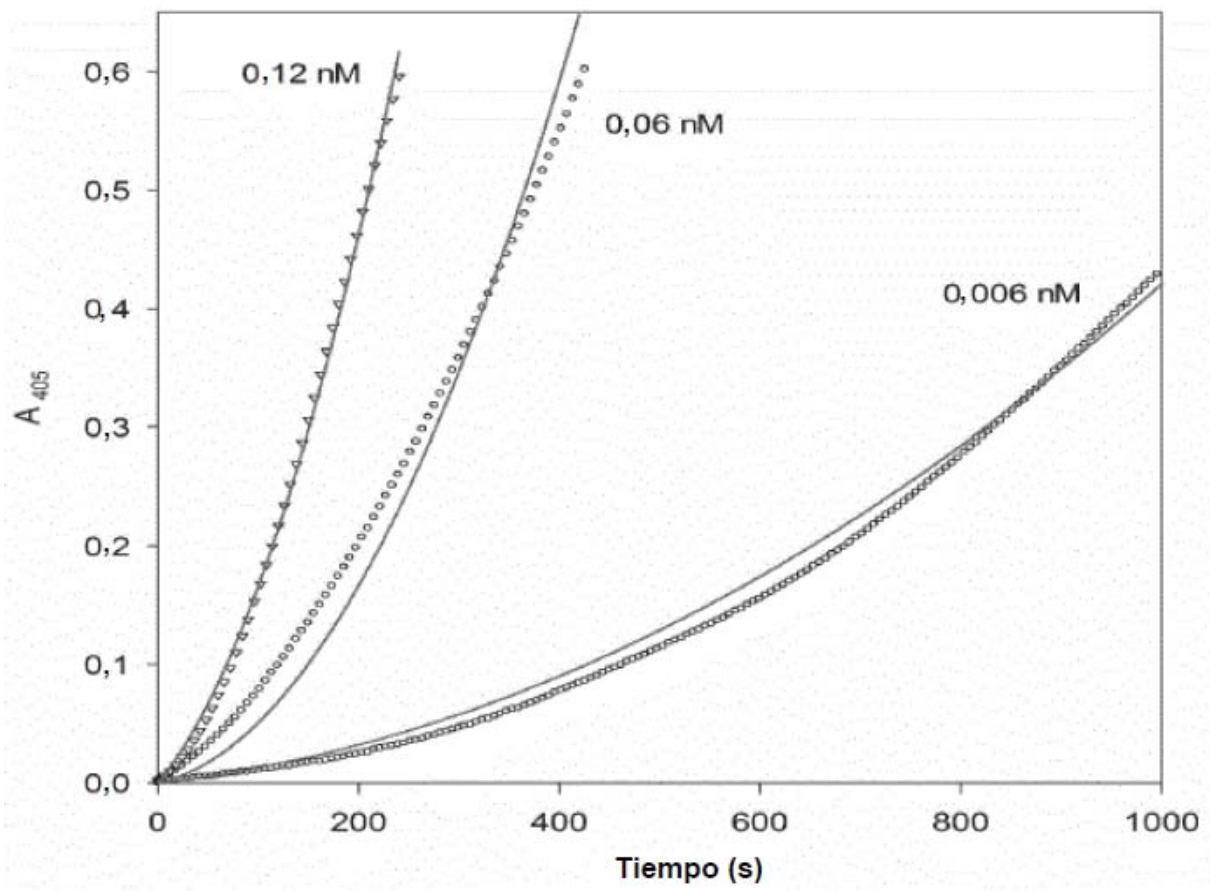


FIGURA 19

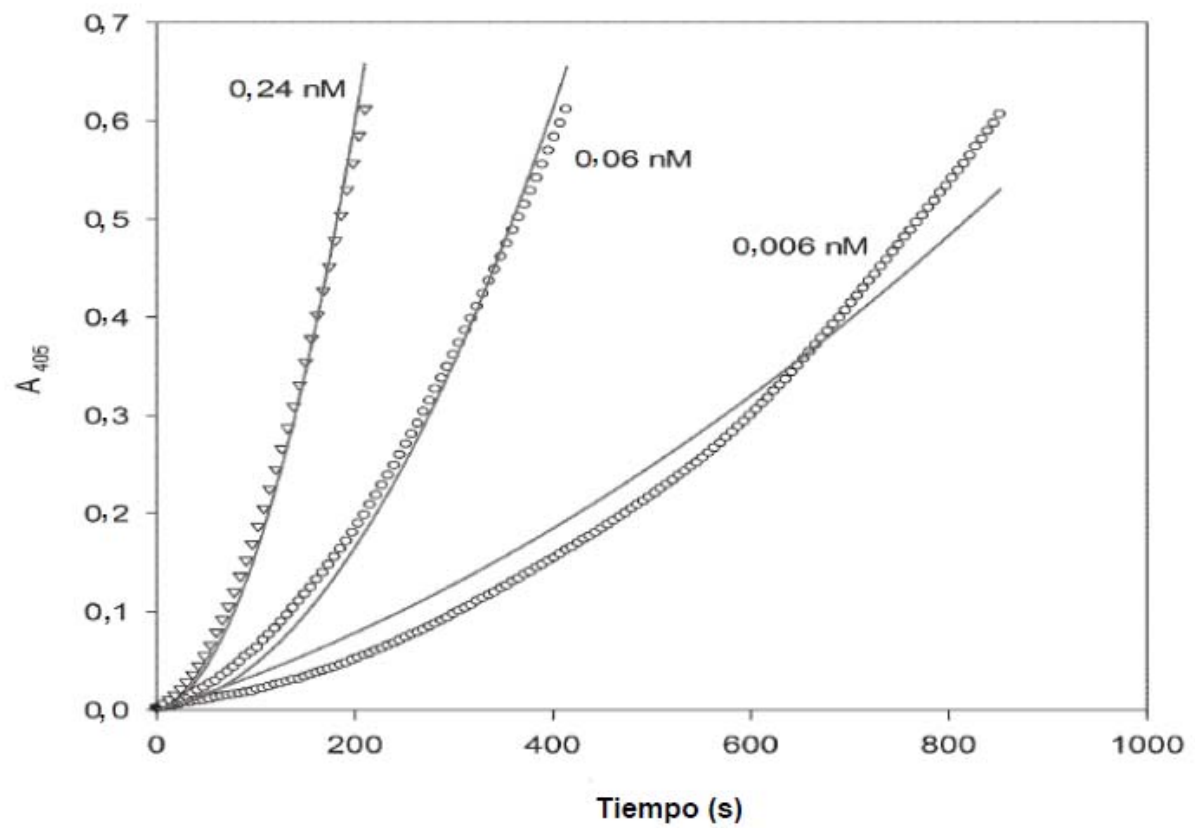


FIGURA 20

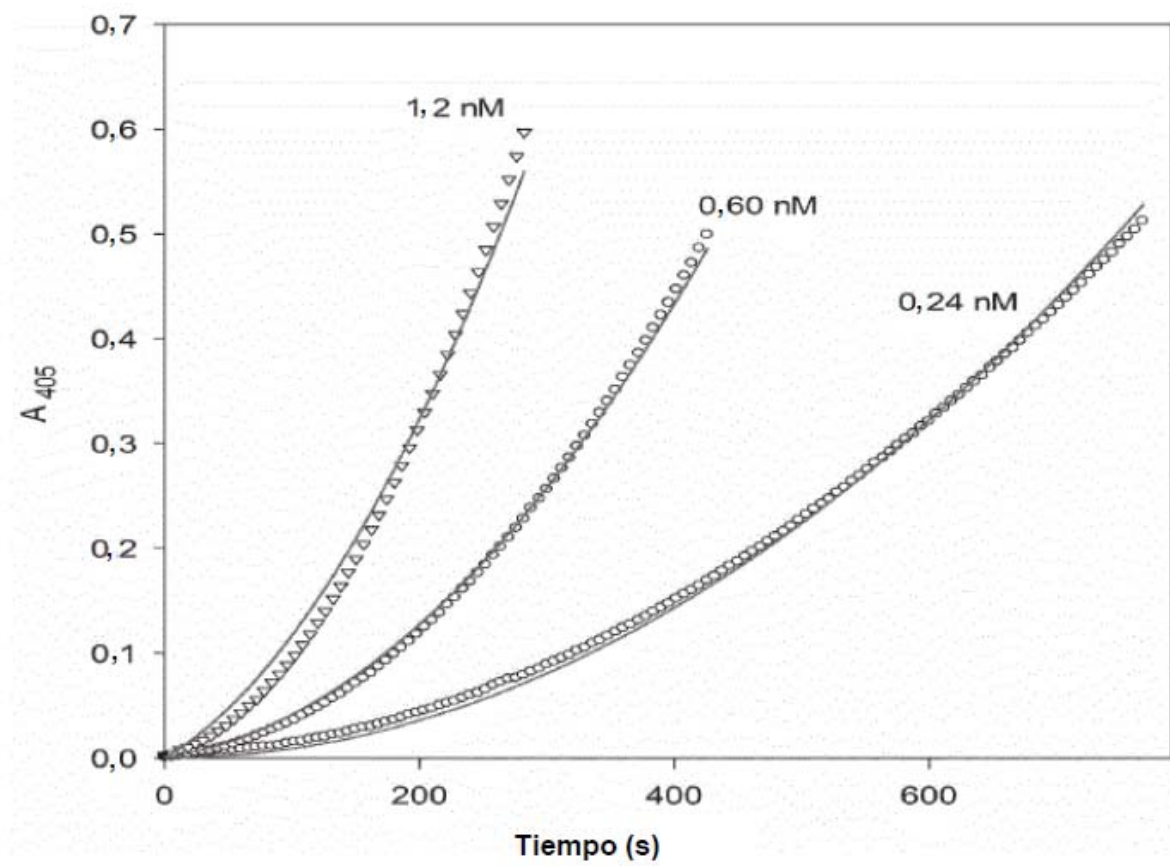


FIGURA 21

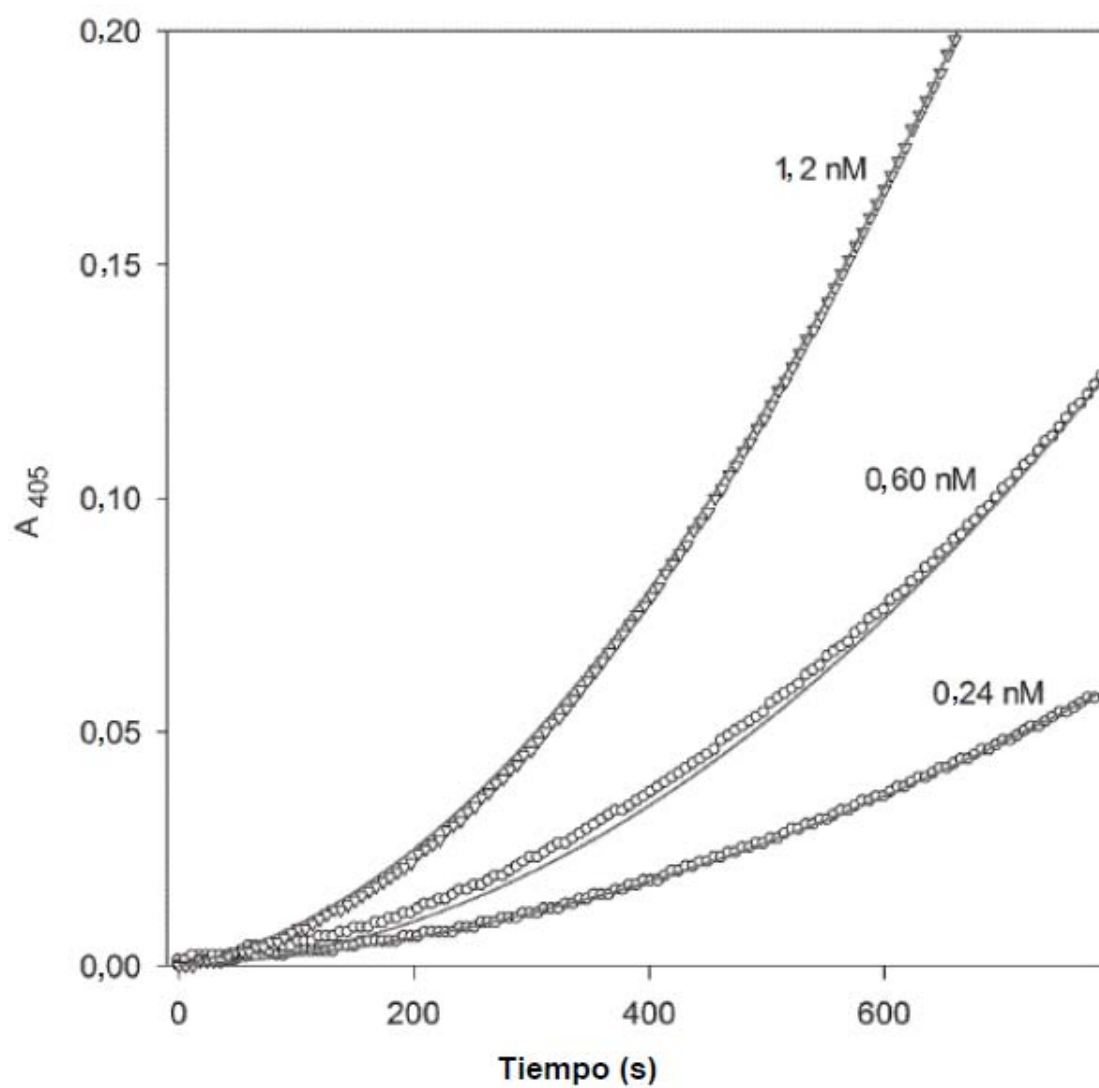


FIGURA 22

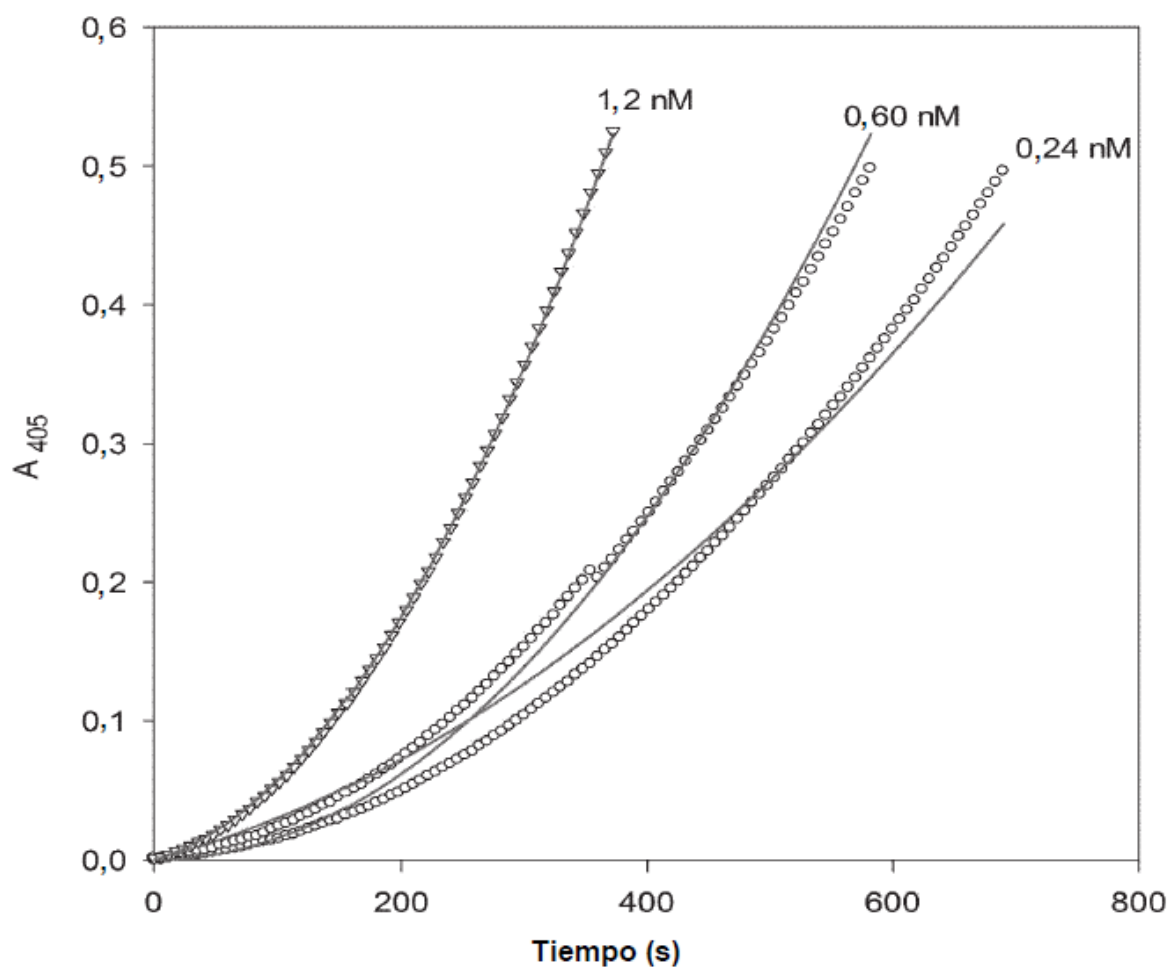


FIGURA 23

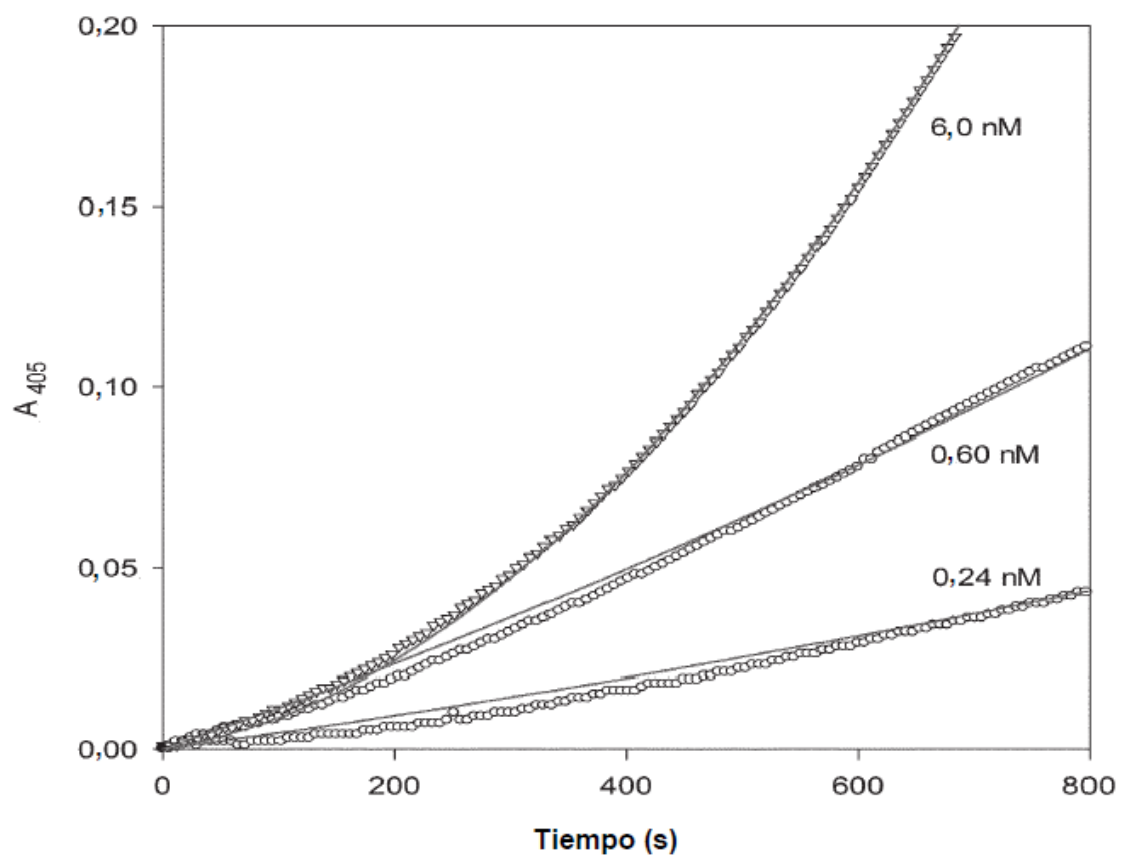


FIGURA 24

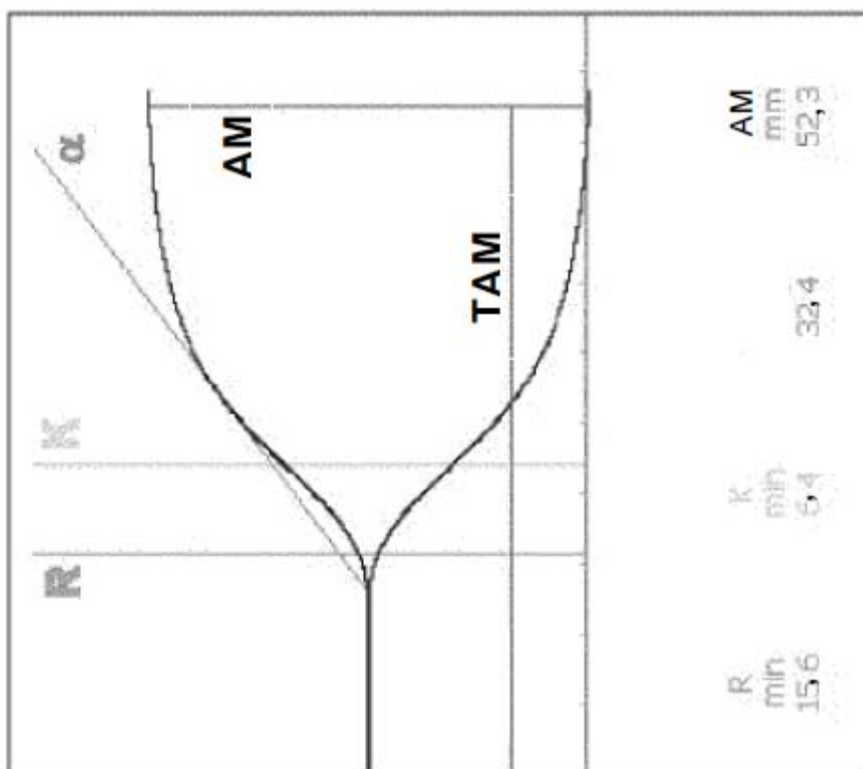


FIGURA 25

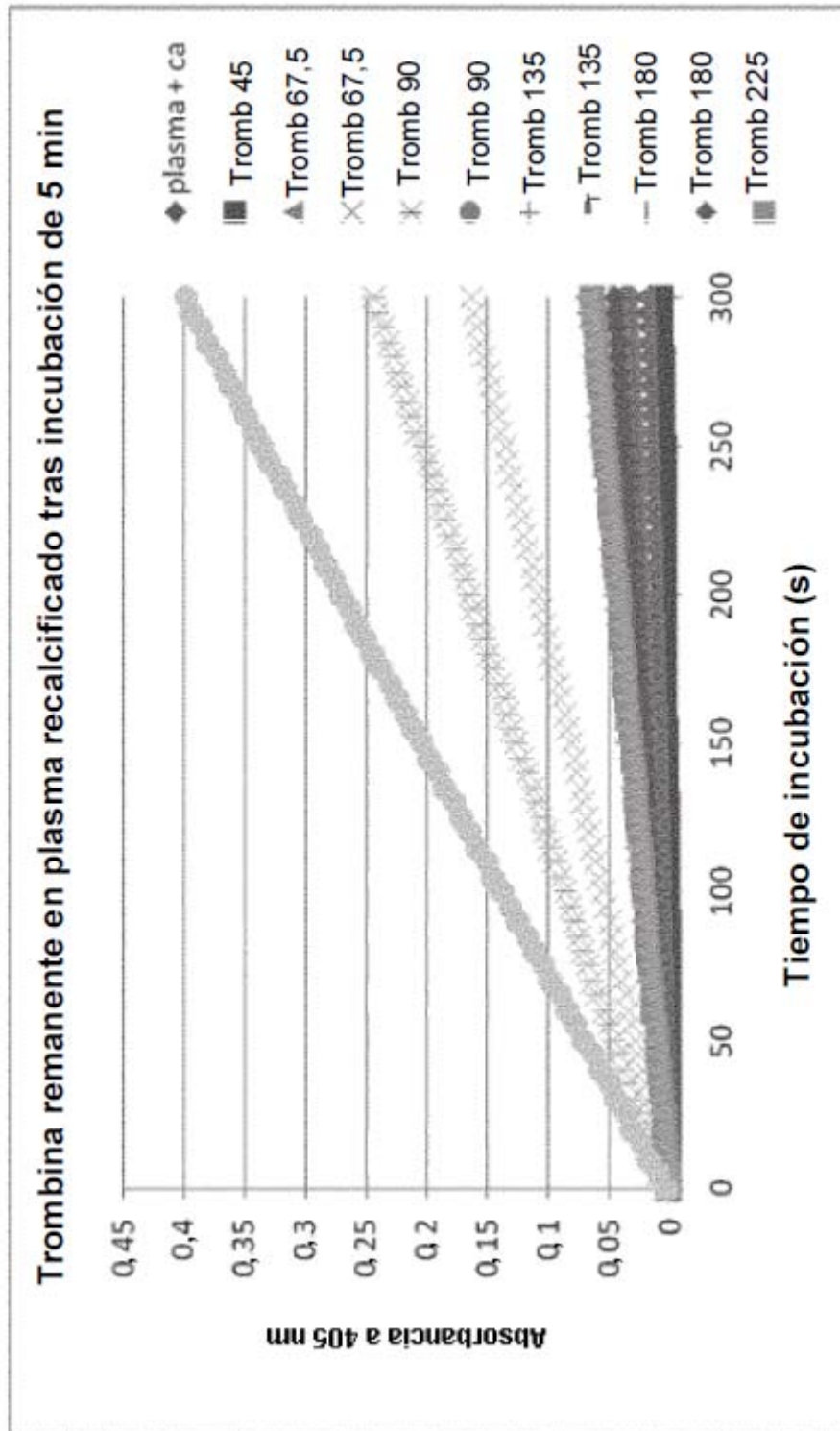


FIGURA 26

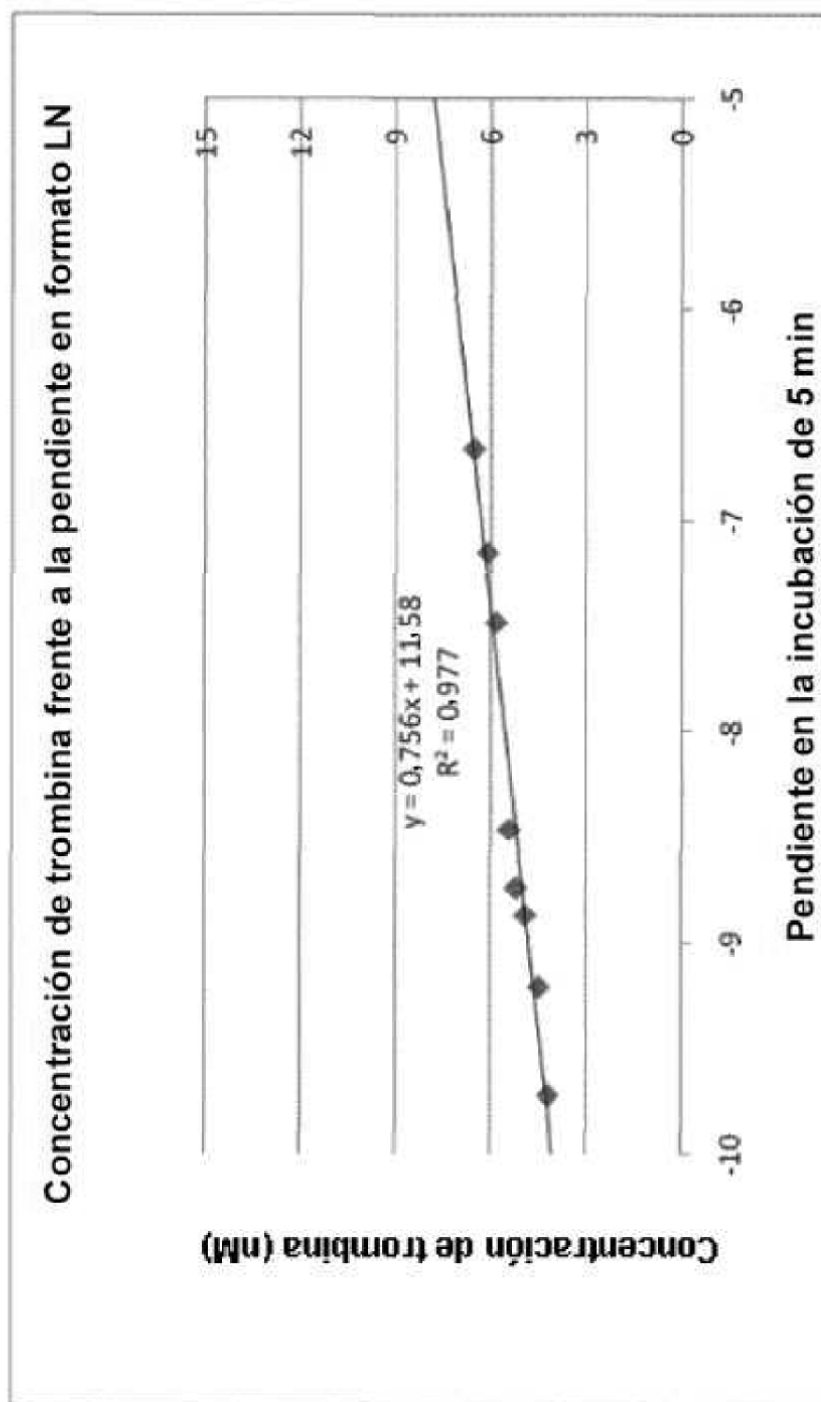


FIGURA 27

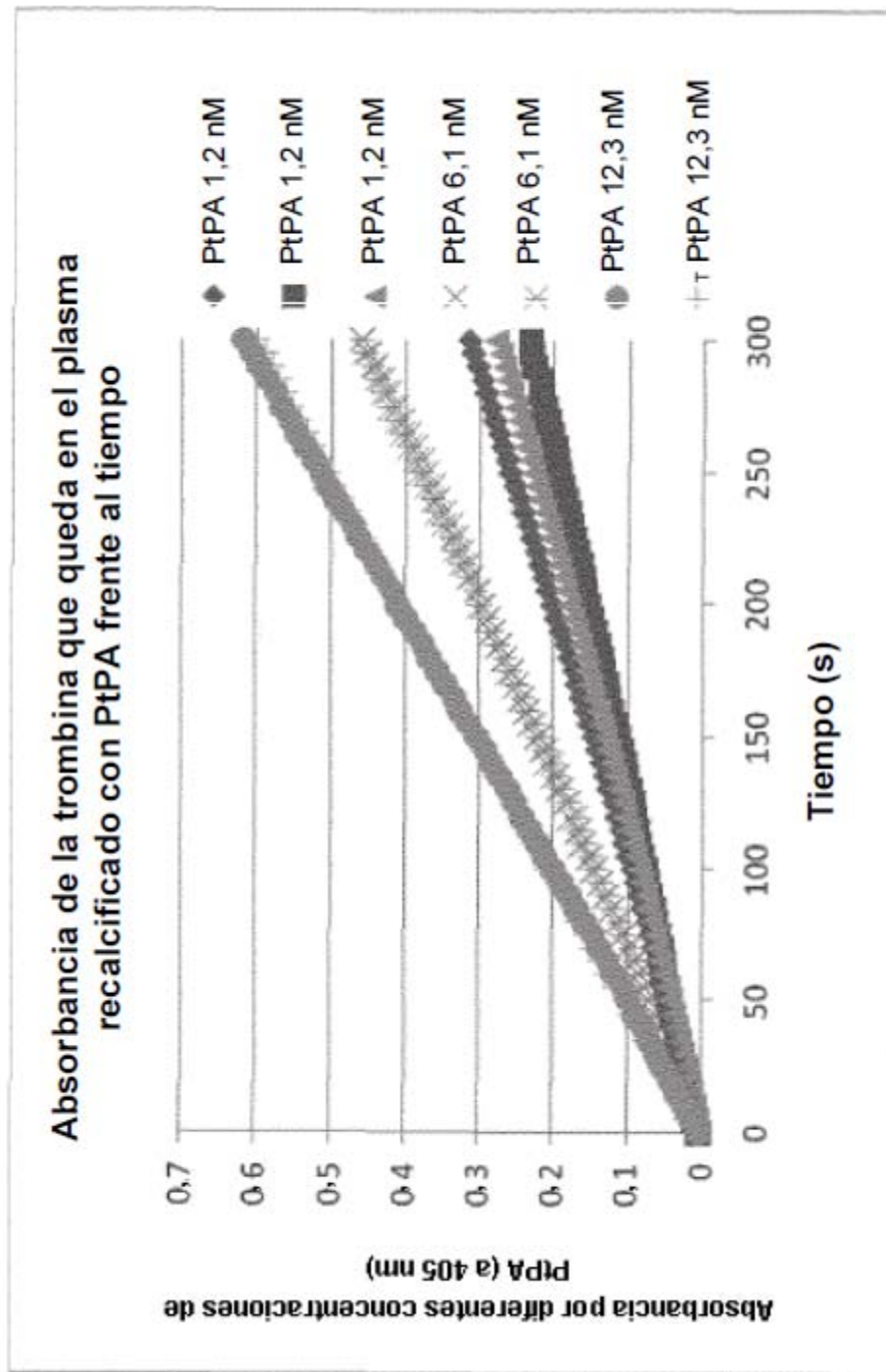


FIGURA 28

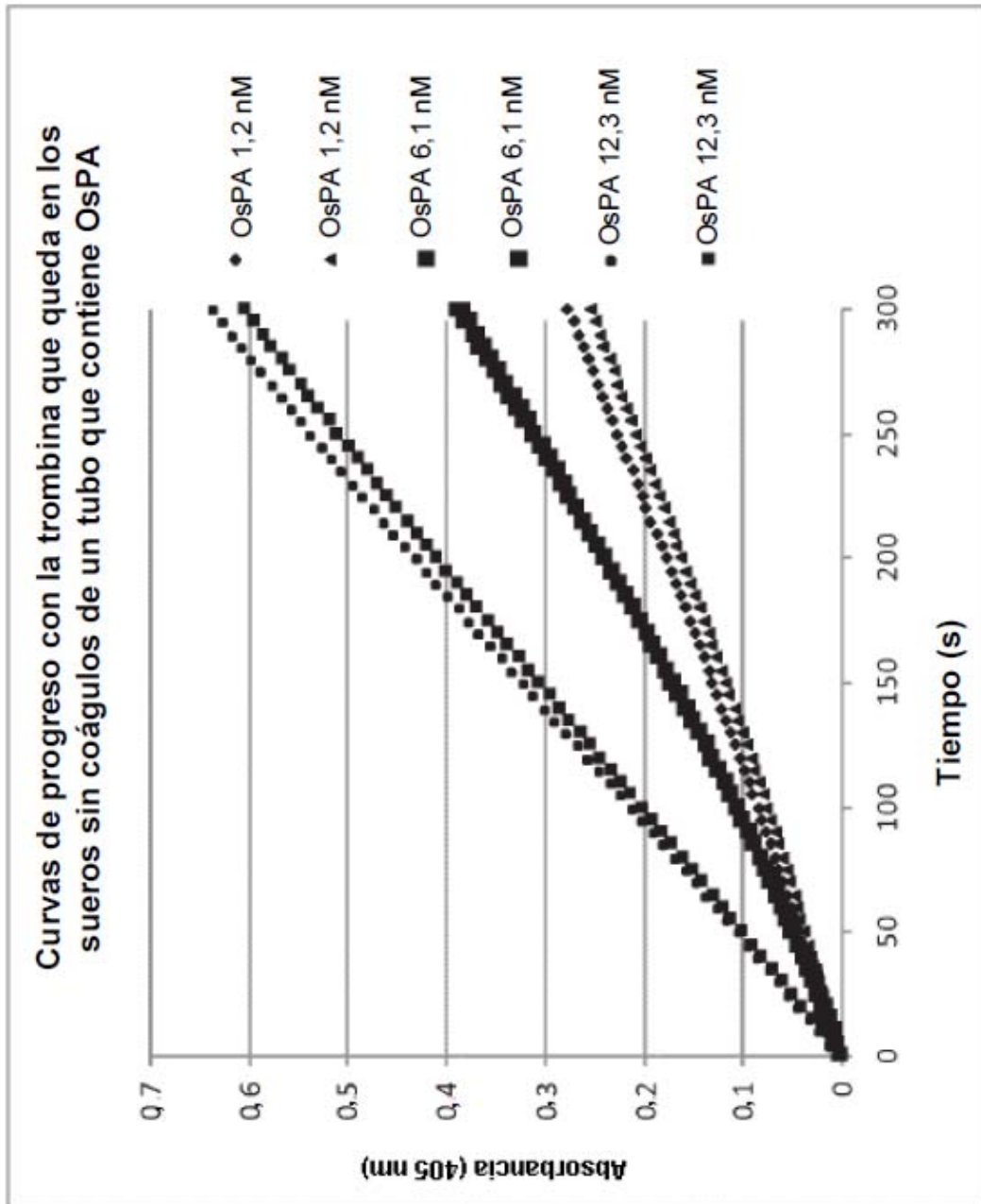


FIGURA 29

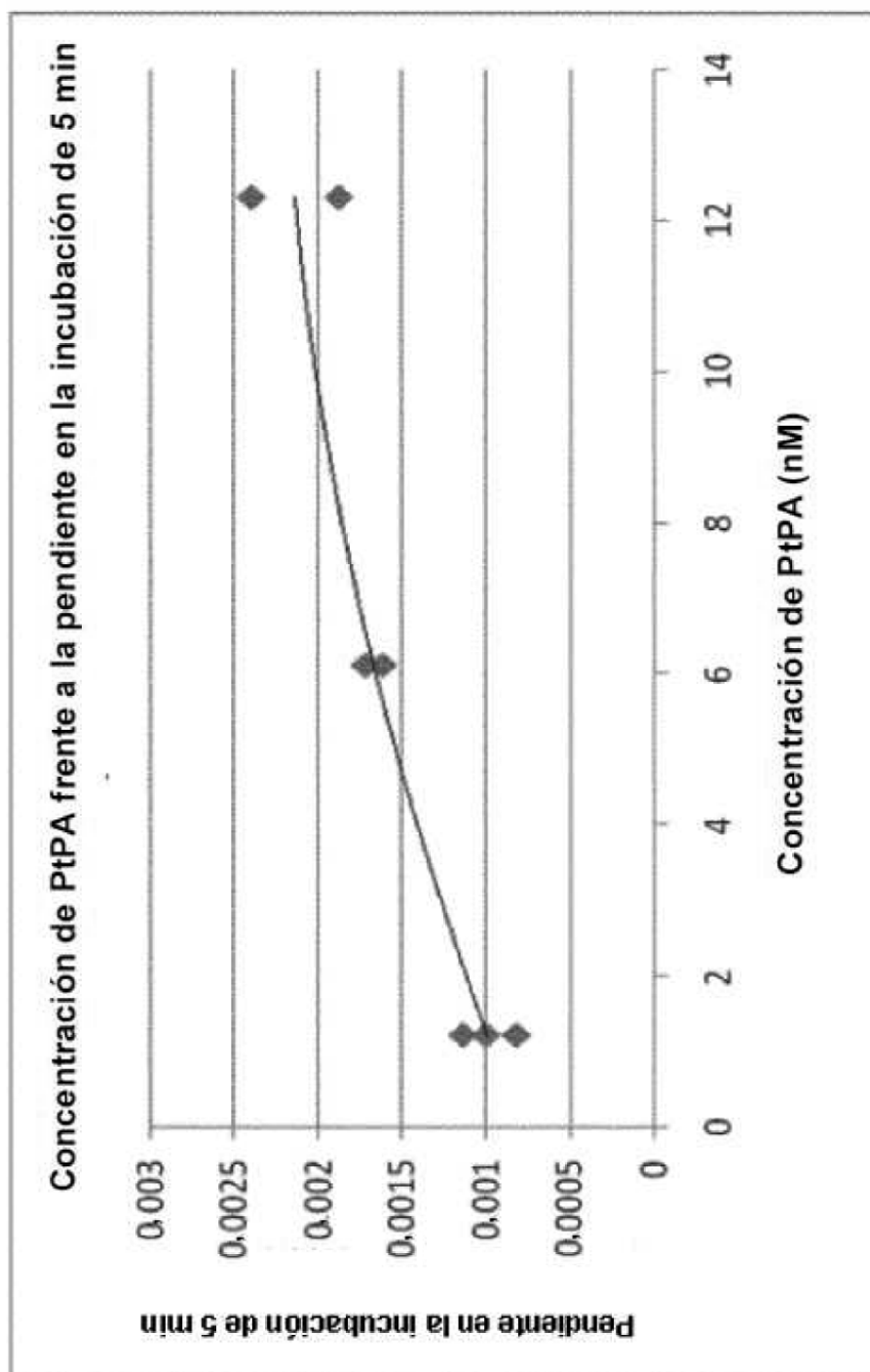


FIGURA 30

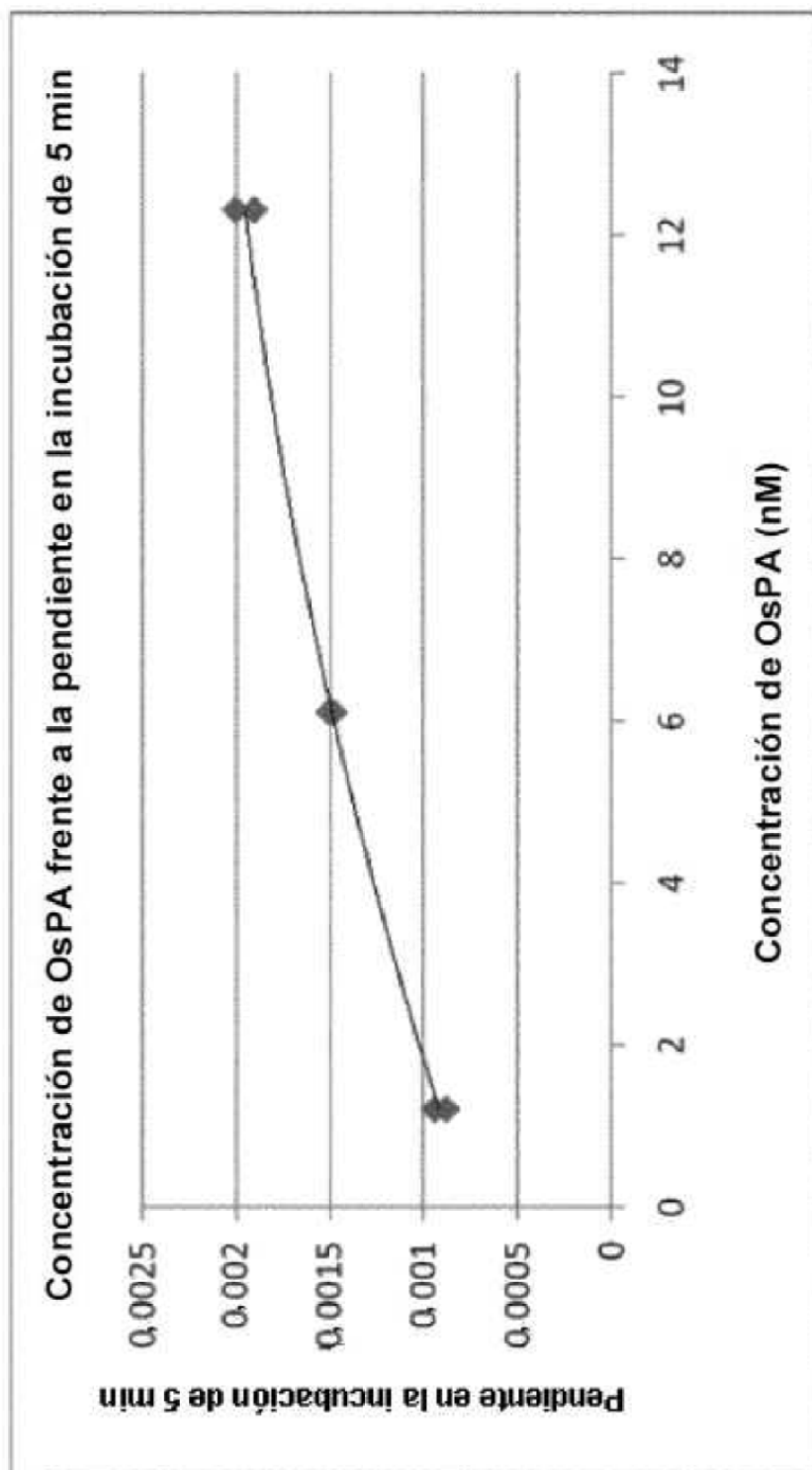


FIGURA 31

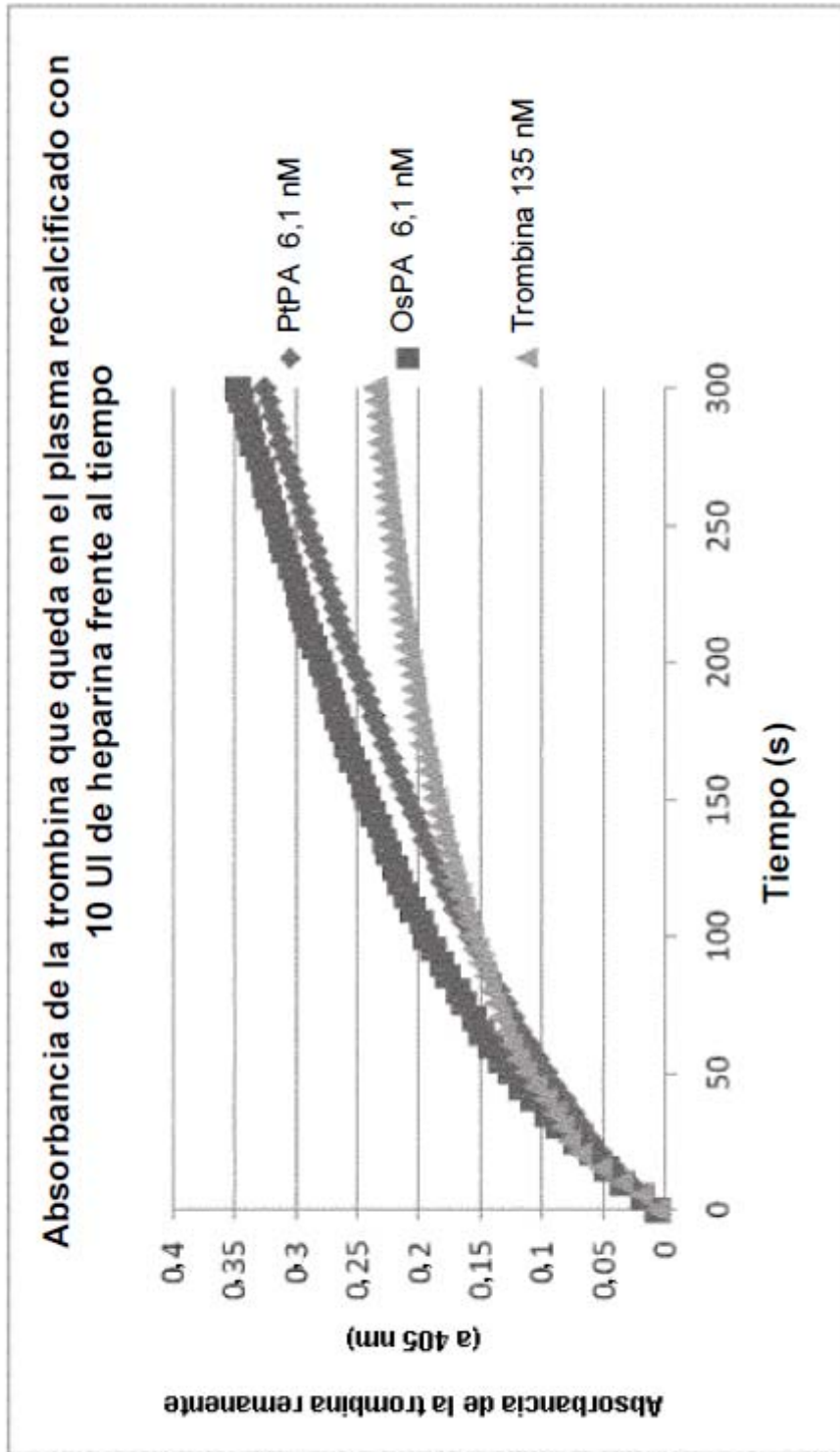


FIGURA 32

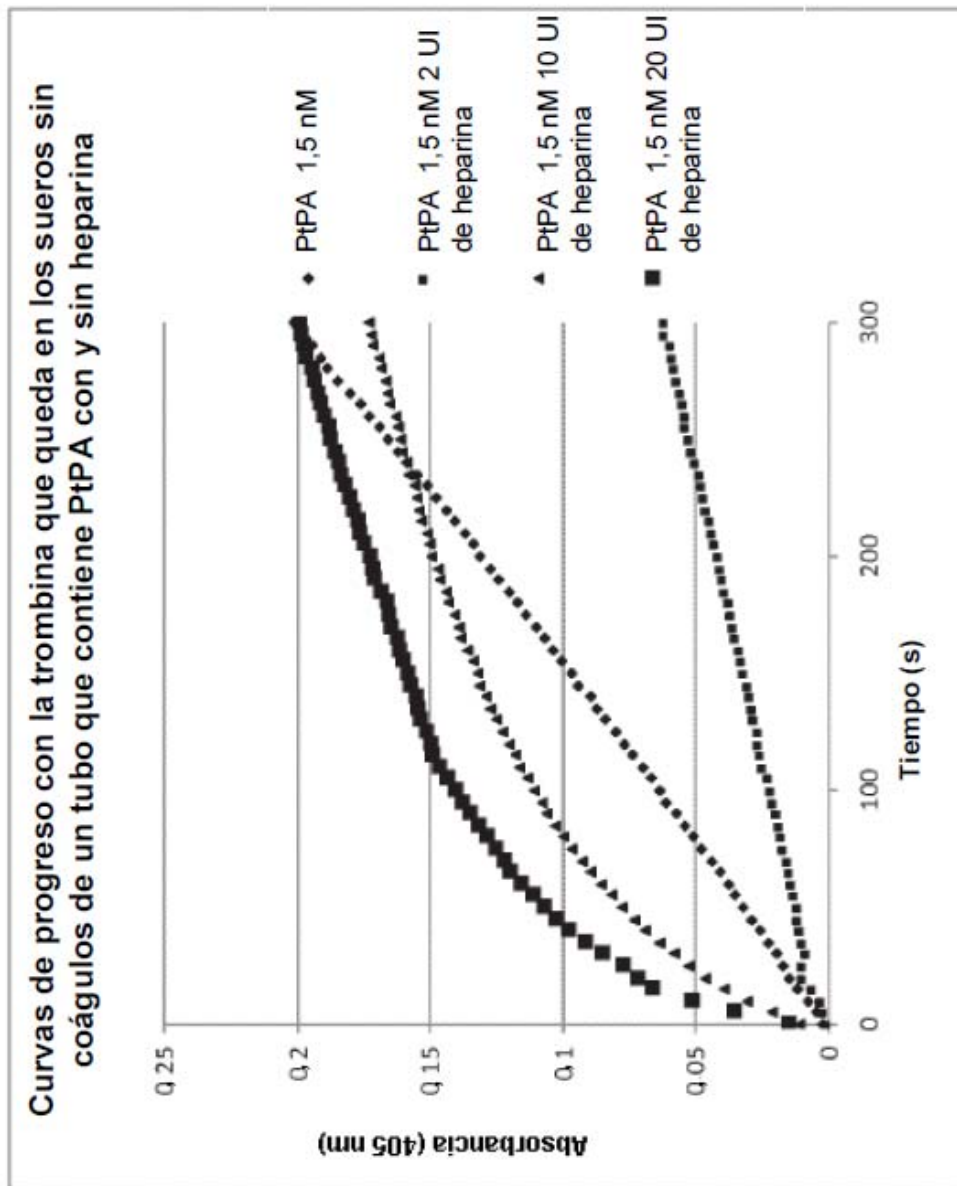


FIGURA 33

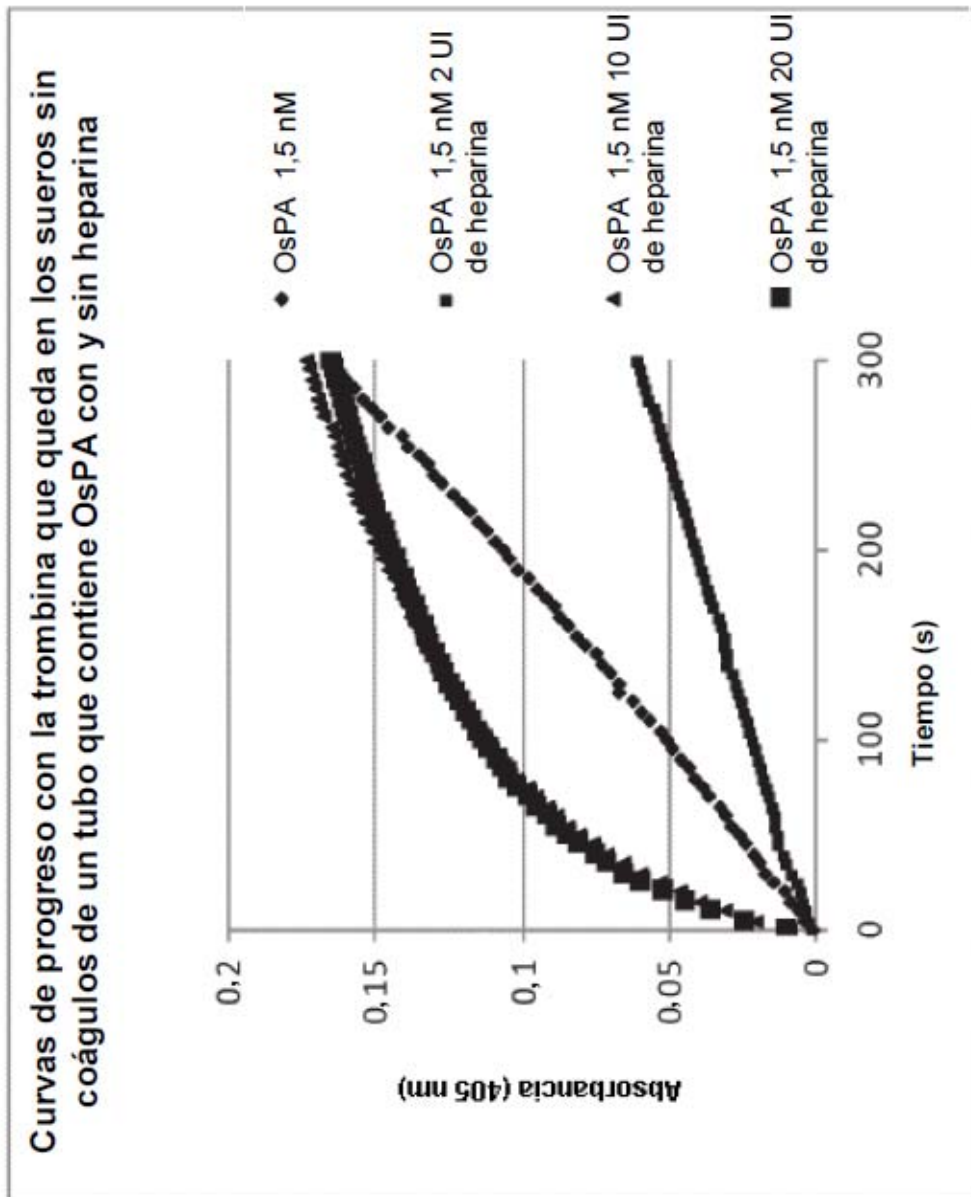


FIGURA 34

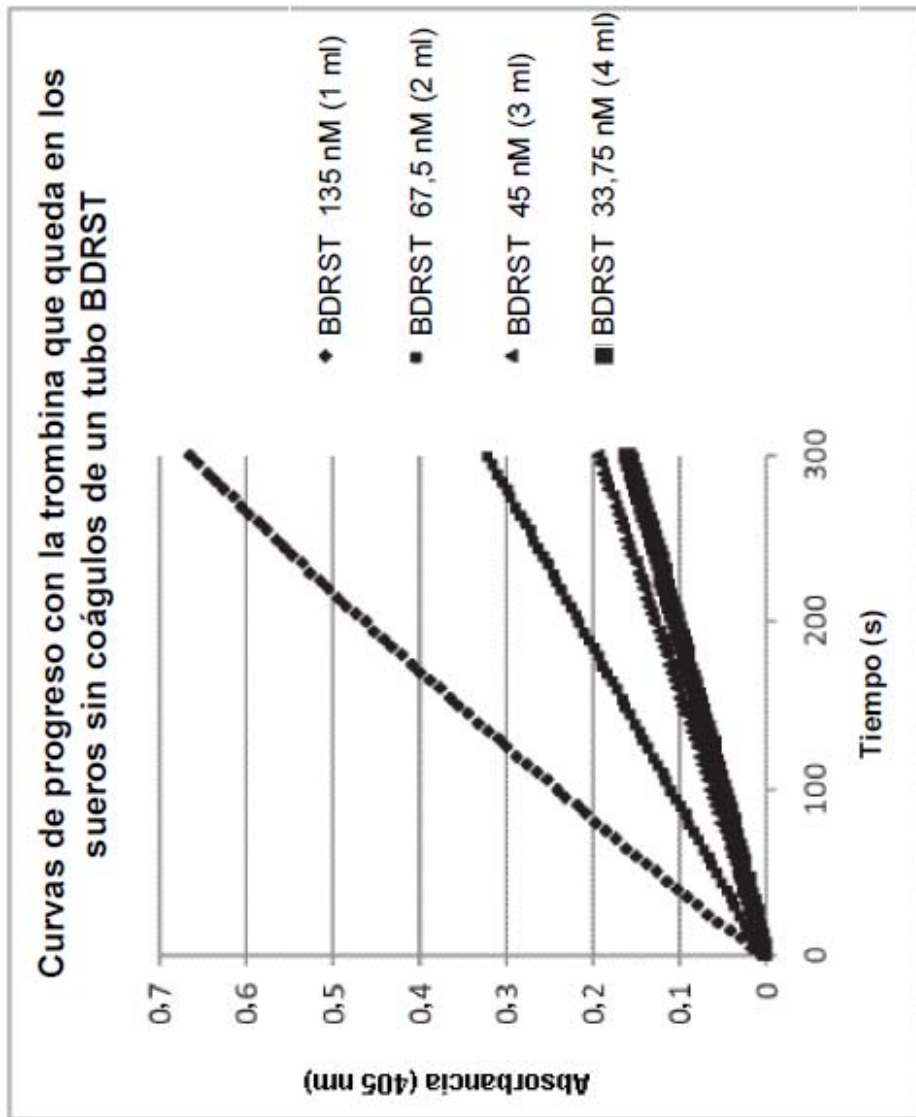


FIGURA 35

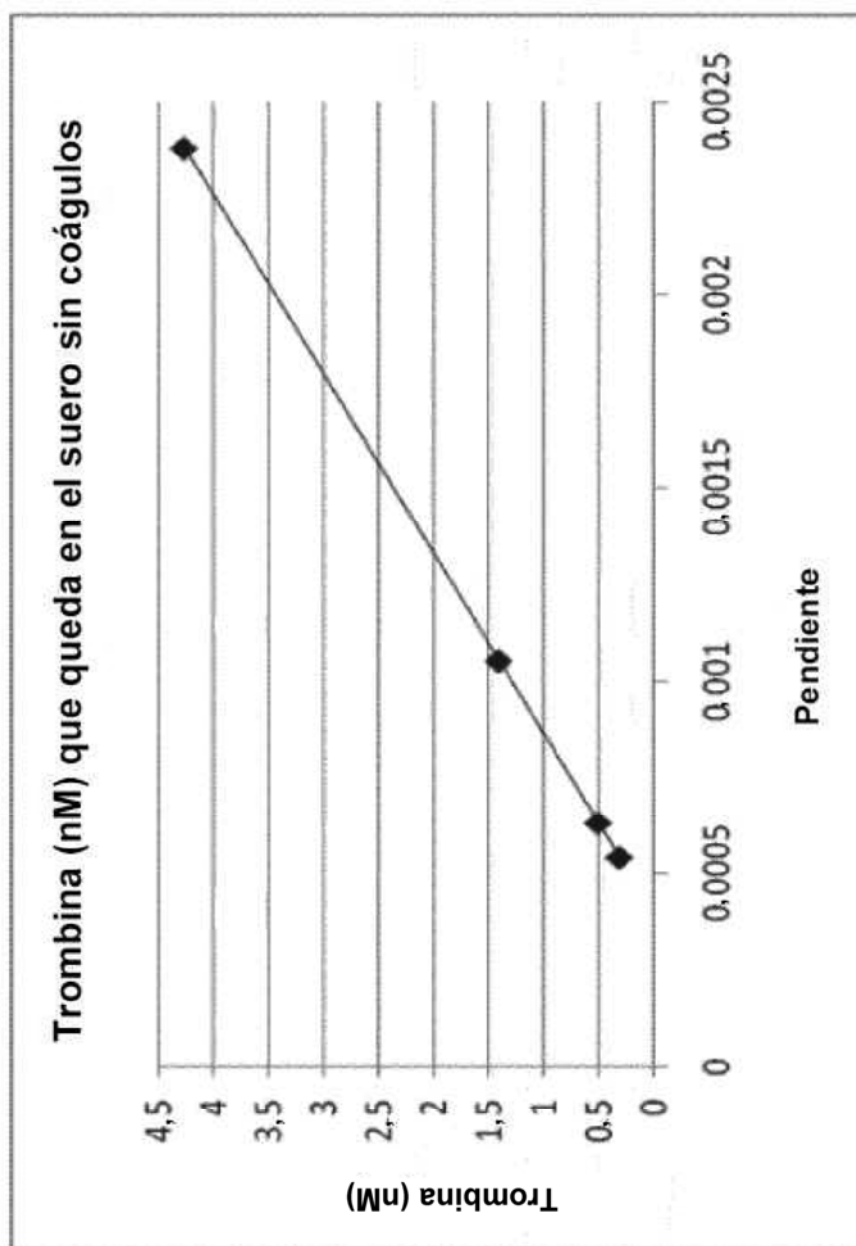


FIGURA 36

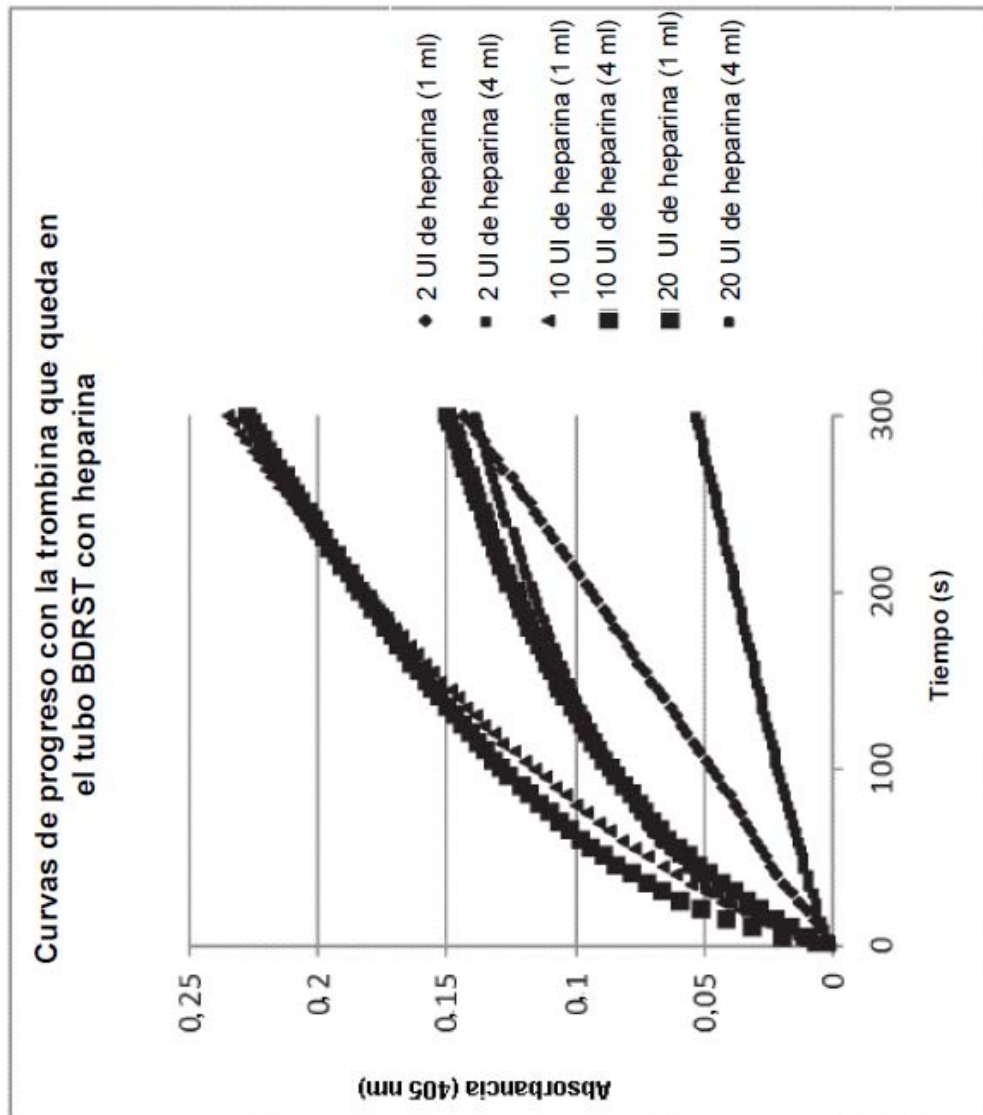


FIGURA 37

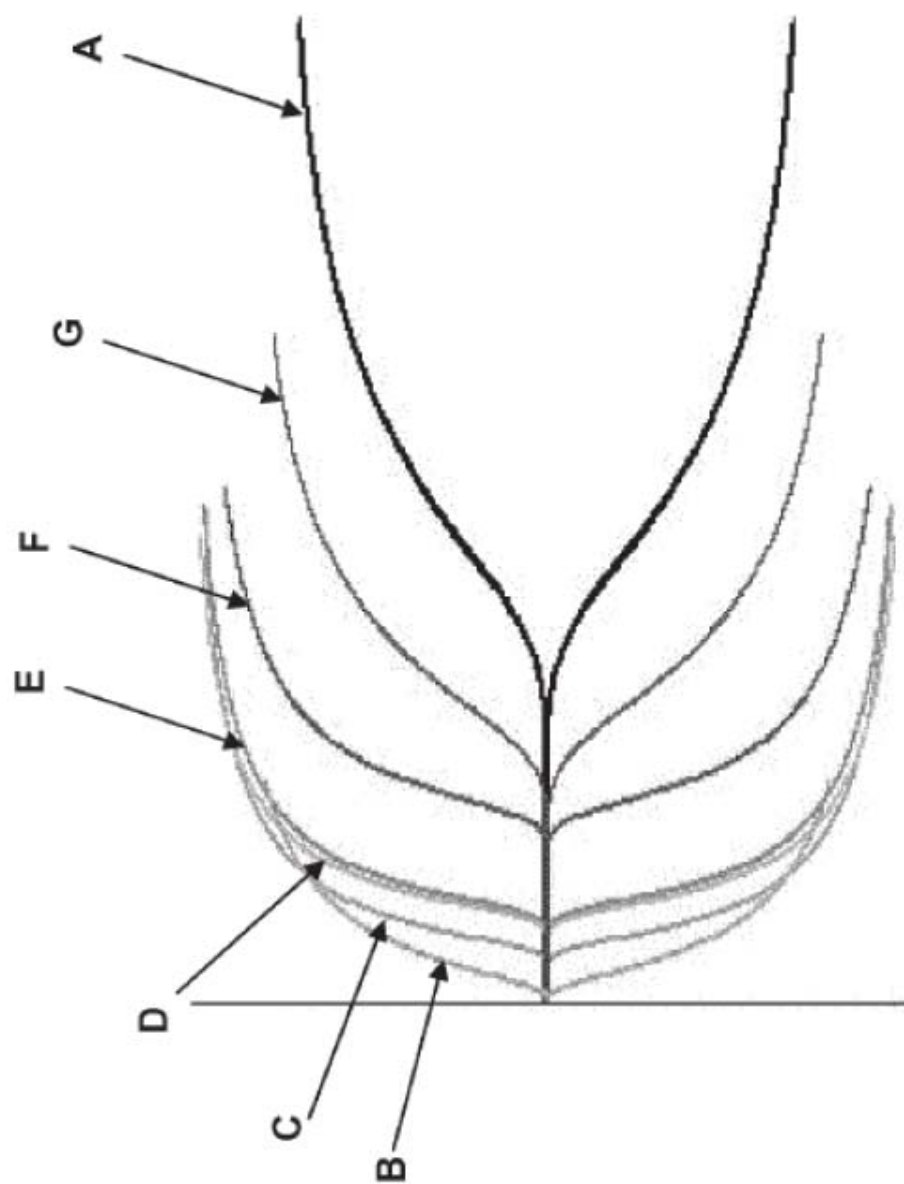


FIGURA 38

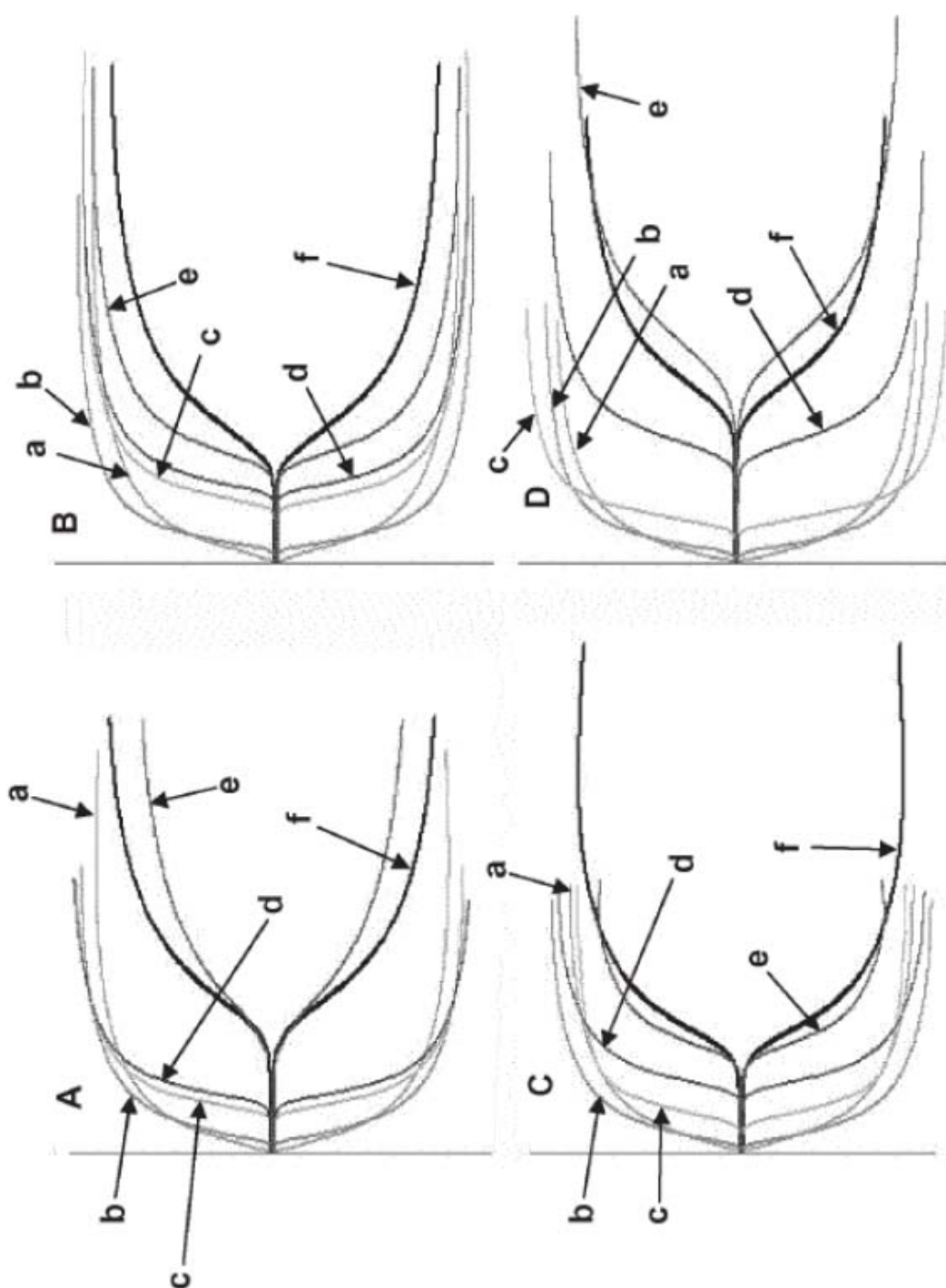


FIGURA 39

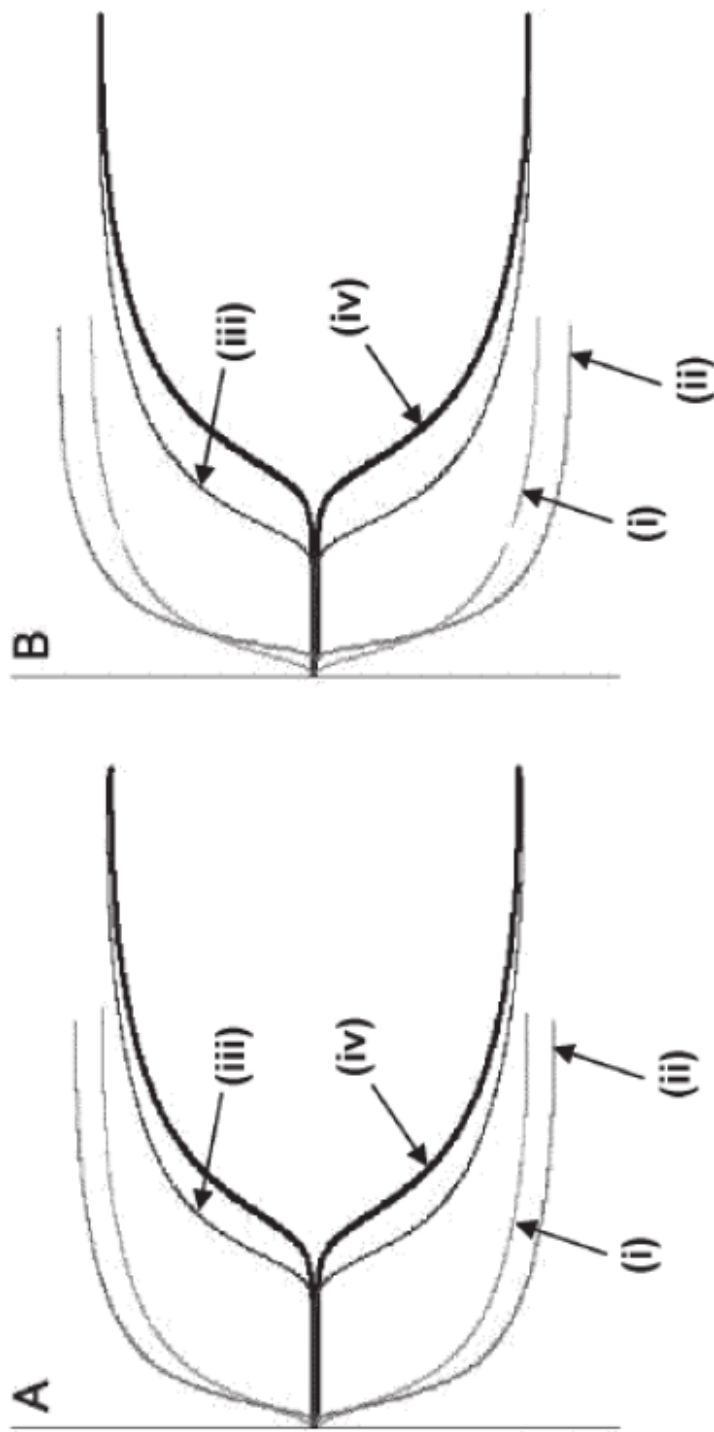


FIGURA 40

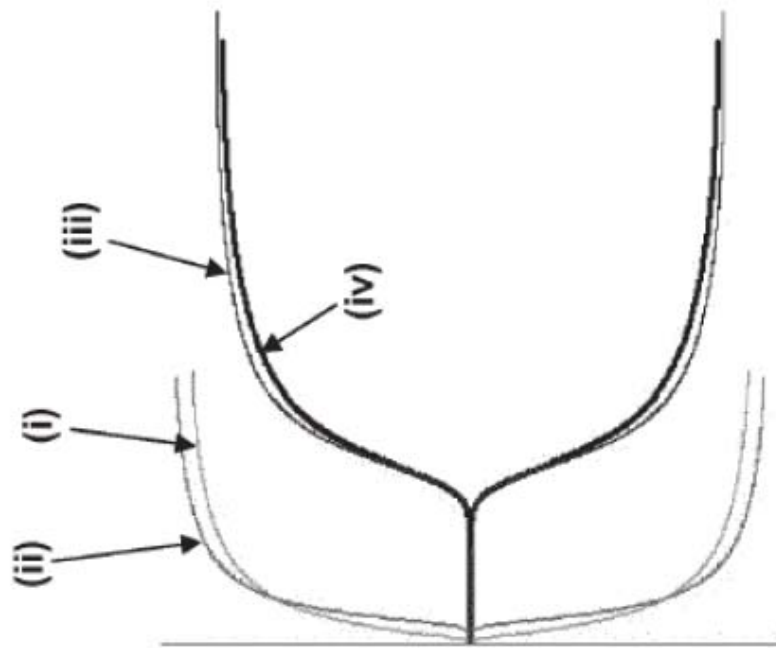


FIGURA 41

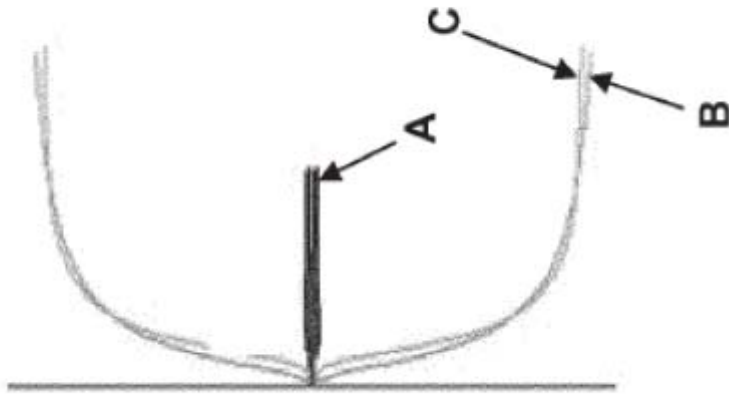


FIGURA 42

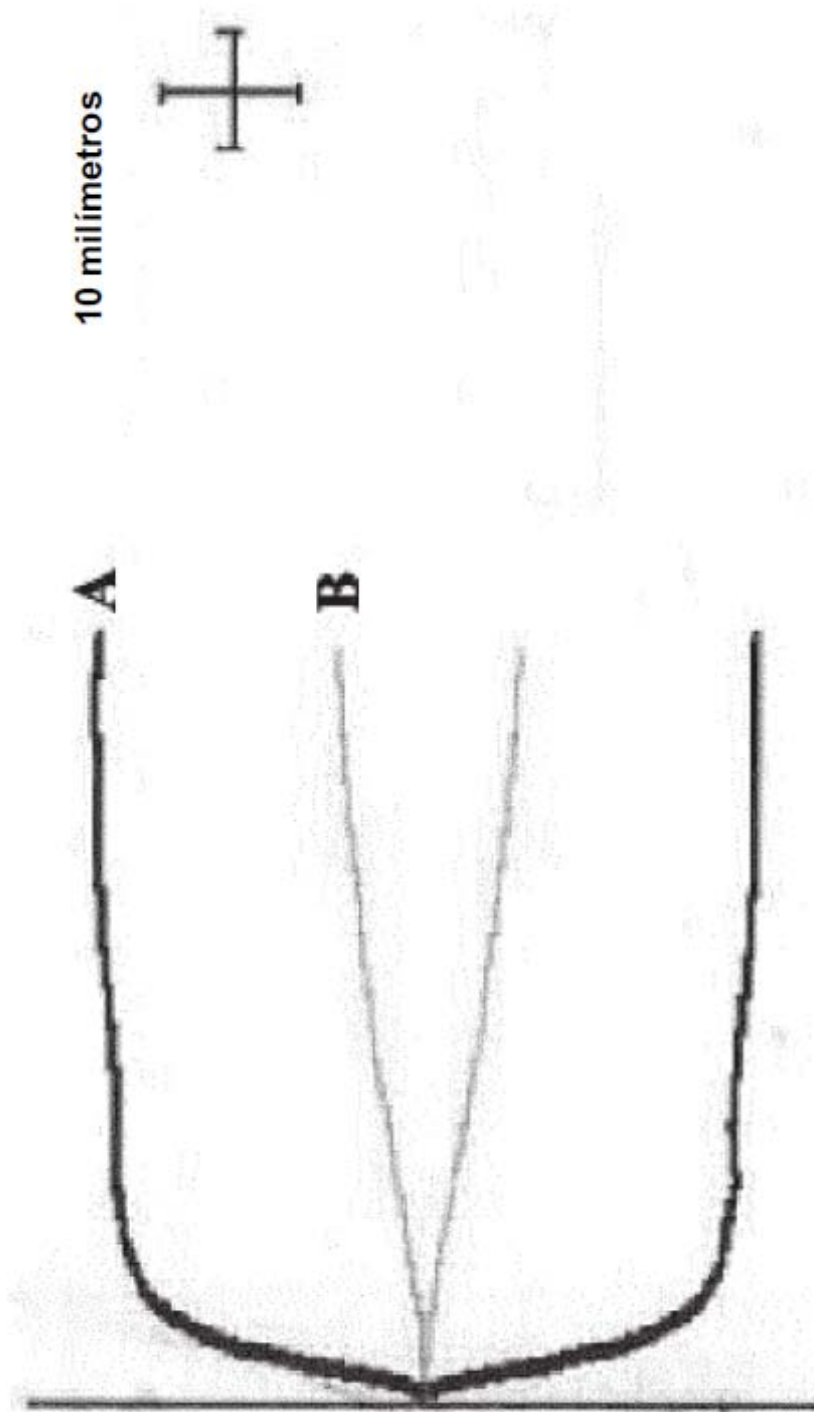


FIGURA 43

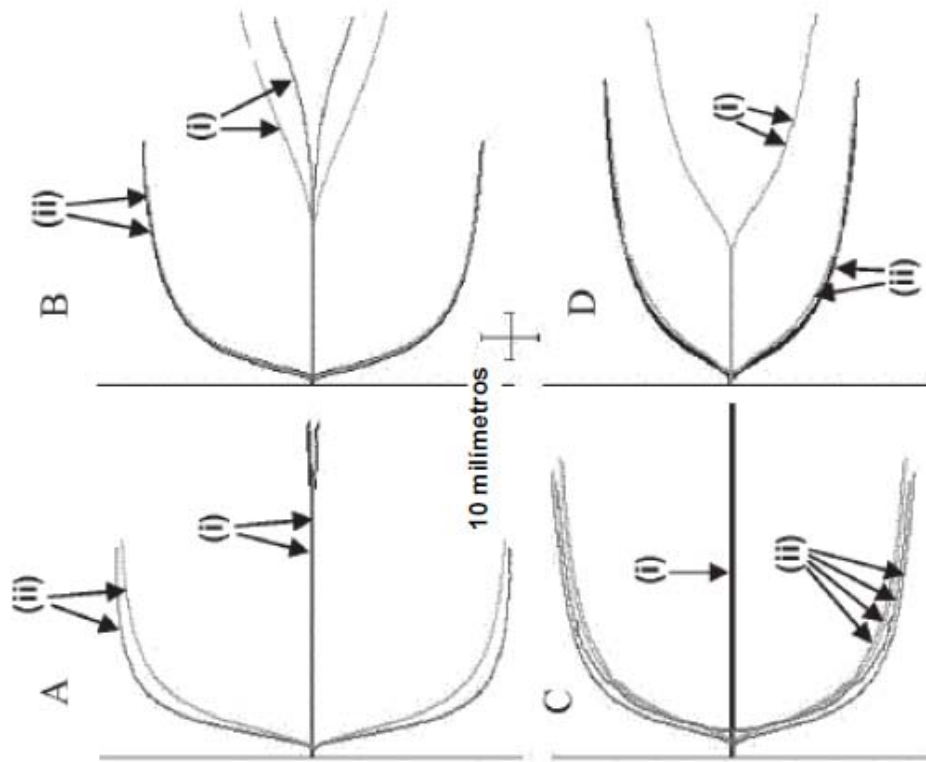


FIGURA 44

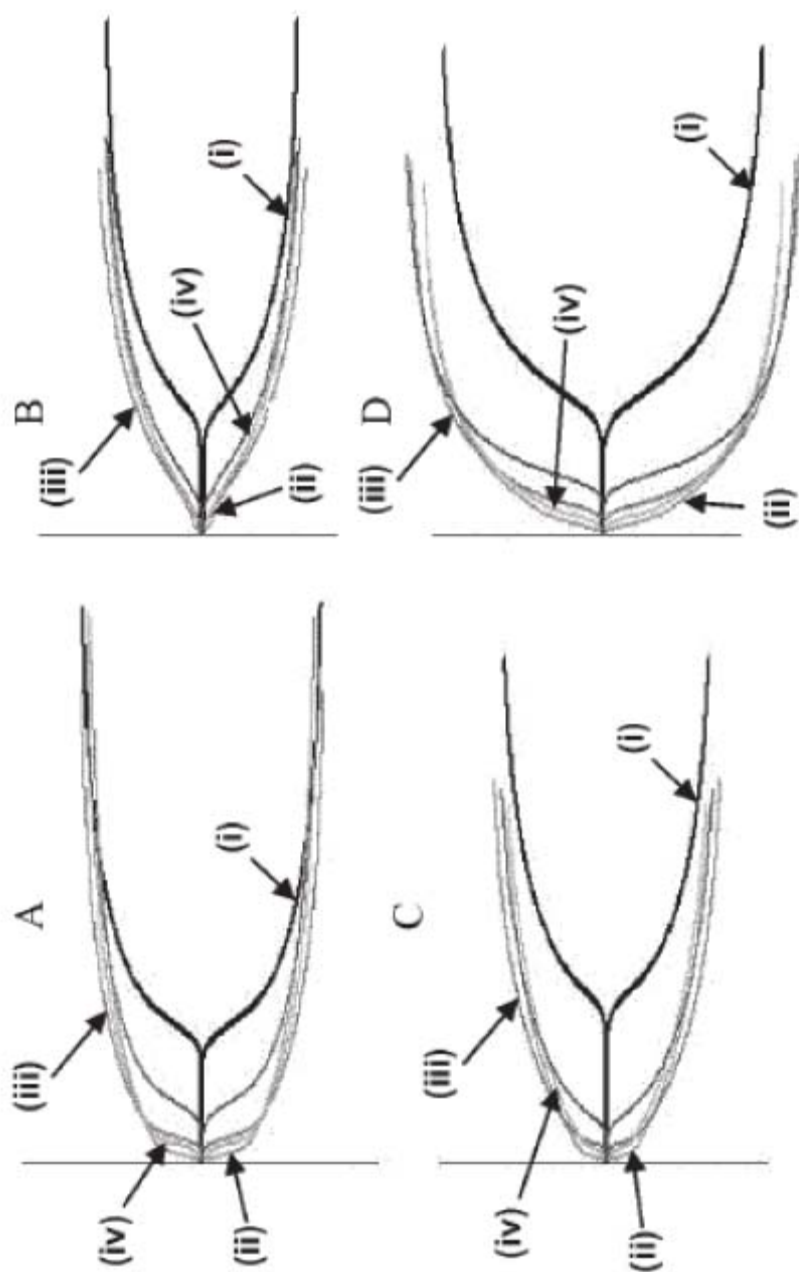


FIGURA 45

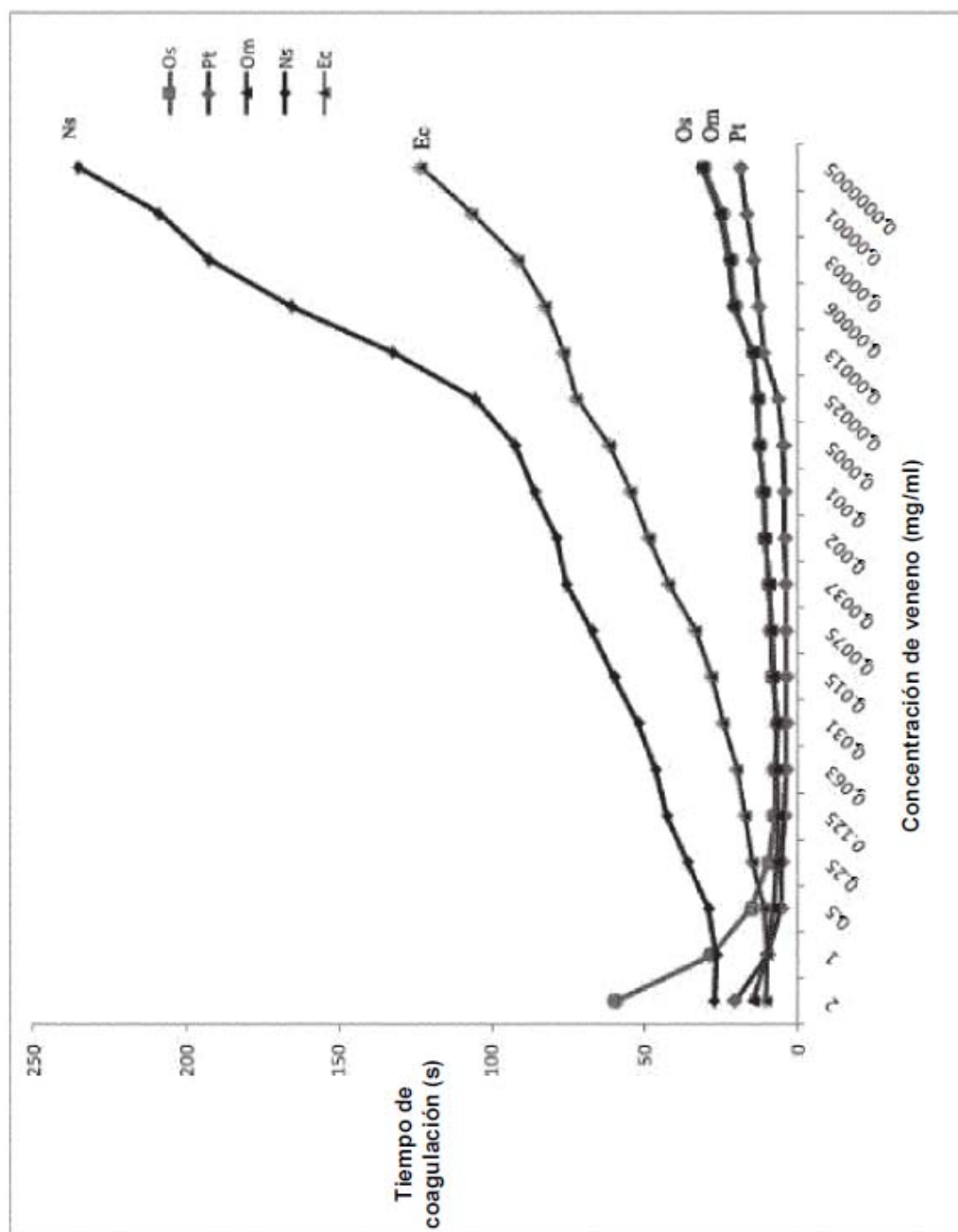
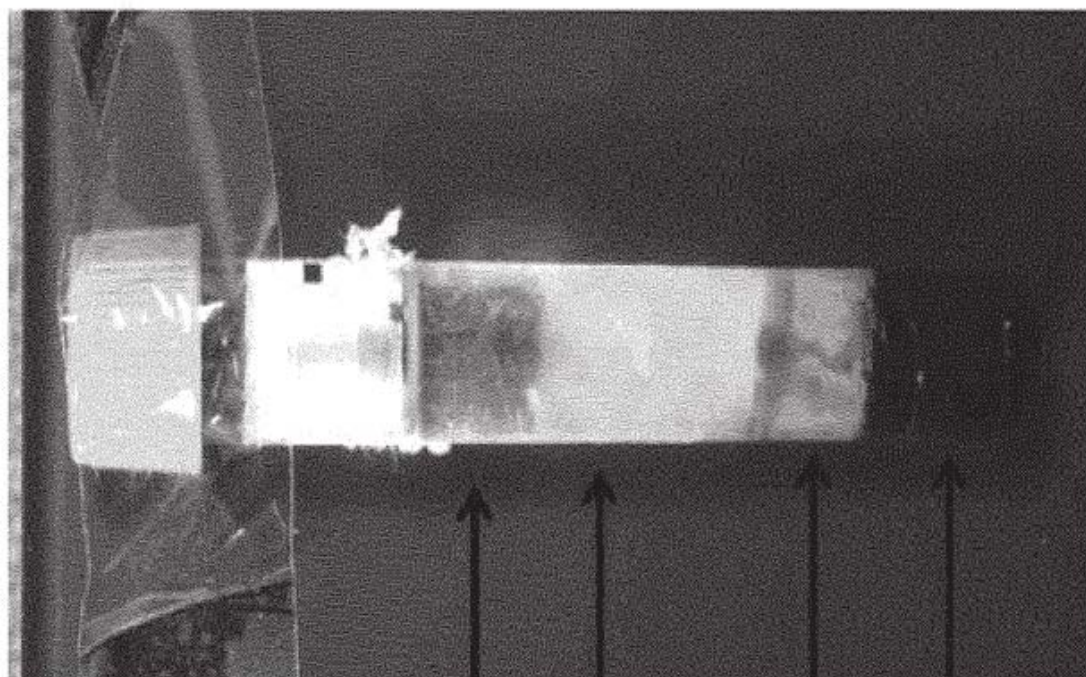


FIGURA 46



Plasma

Precipitado gelatinoso

Gel separador

Células empaquetadas por centrifugación

FIGURA 47

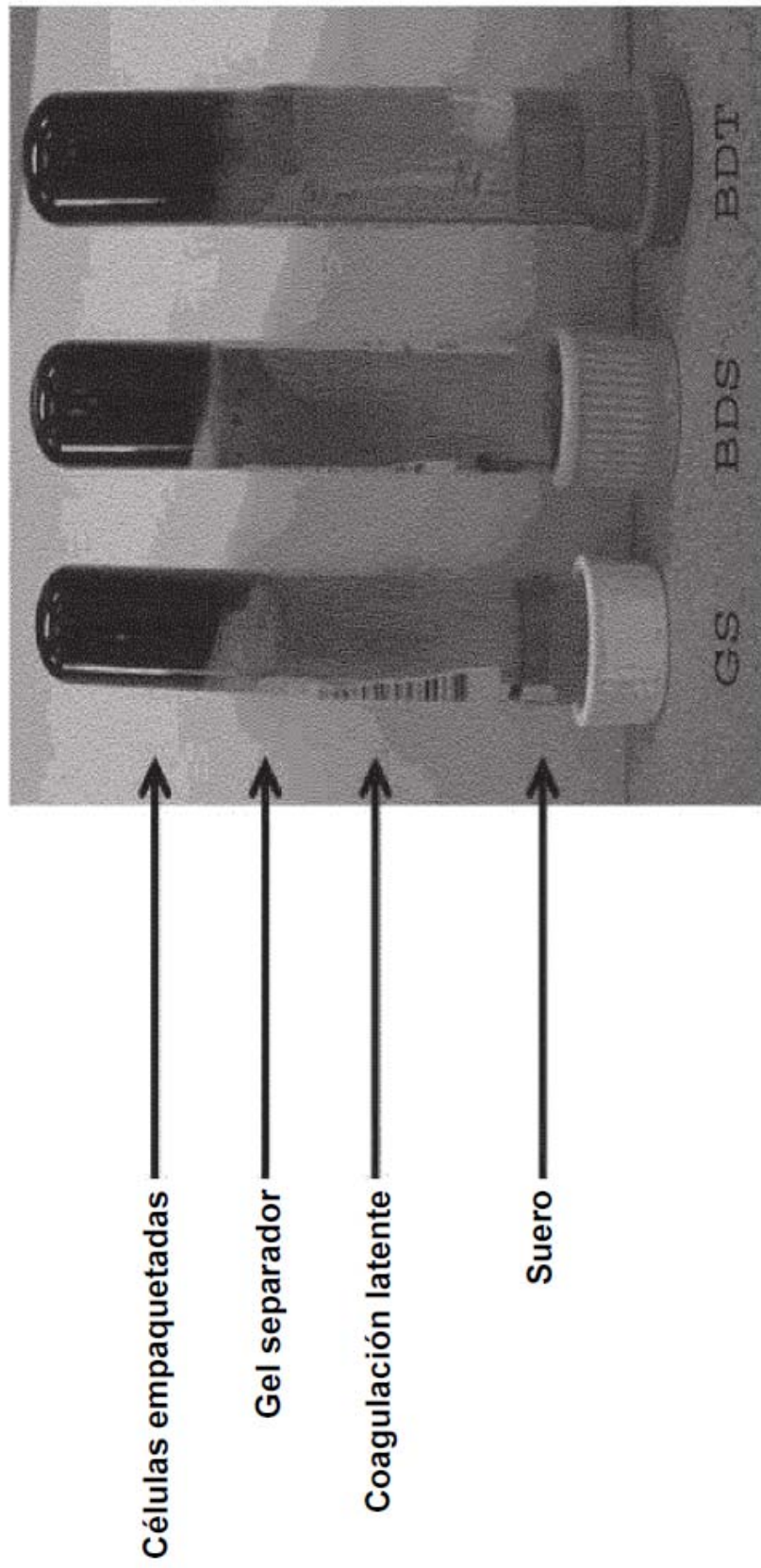


FIGURA 48

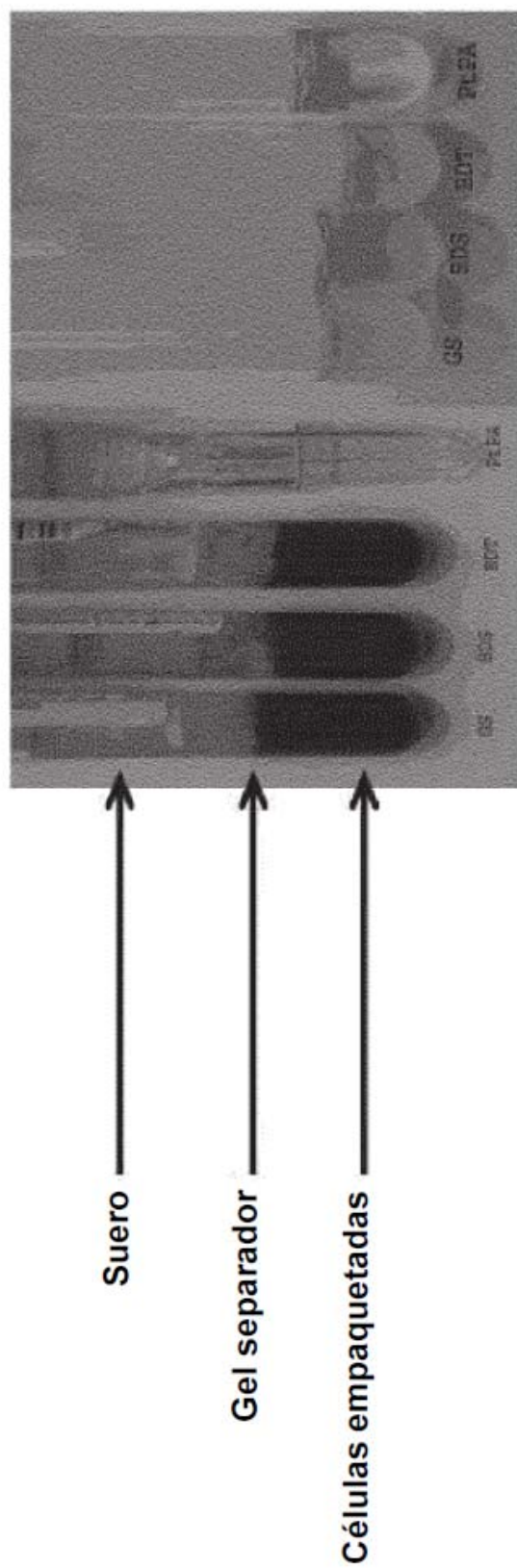


FIGURA 49

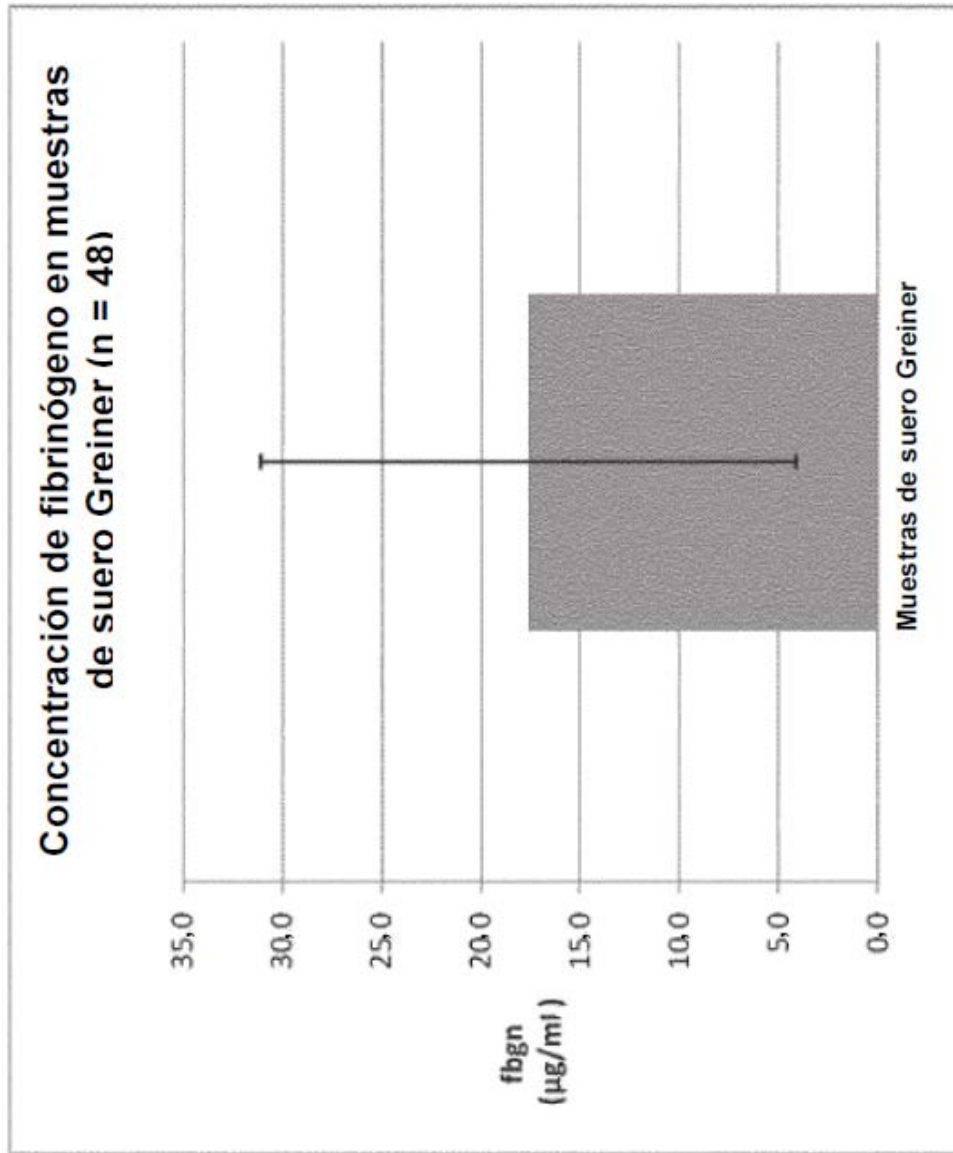
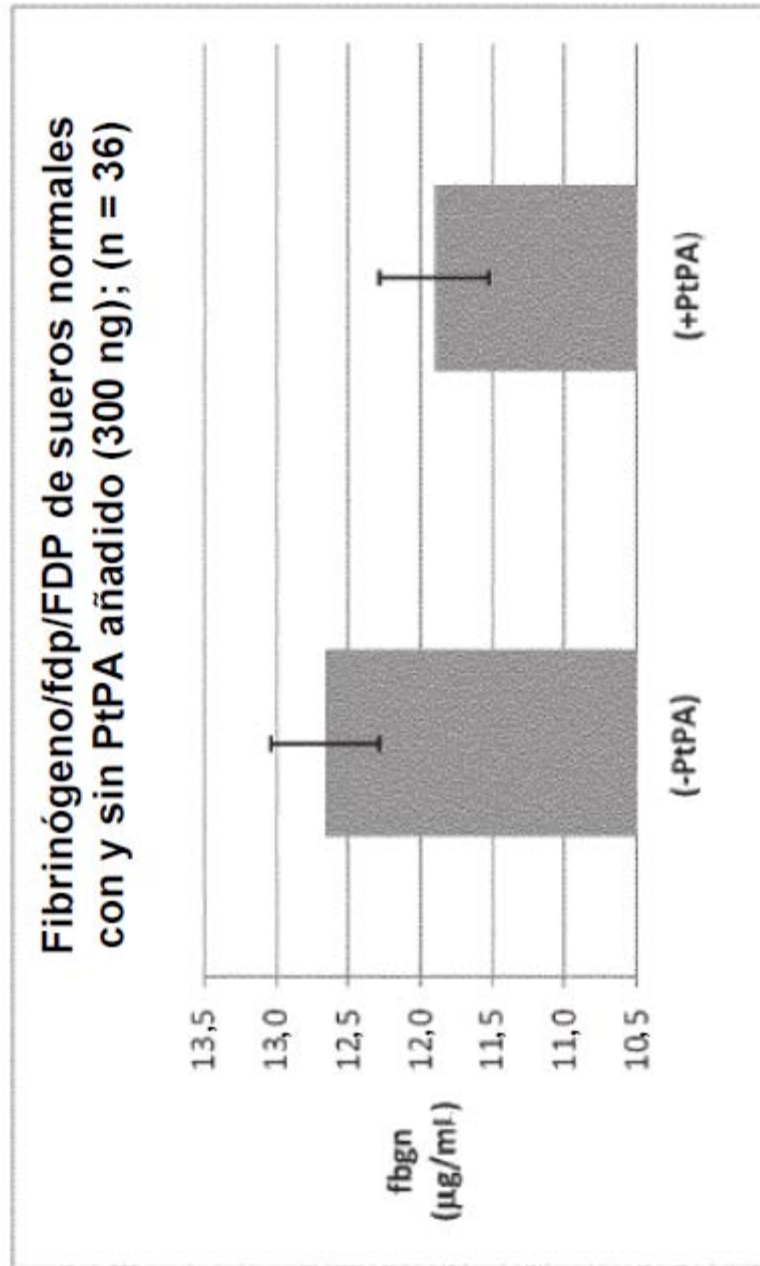


FIGURA 50

**FIGURA 51**

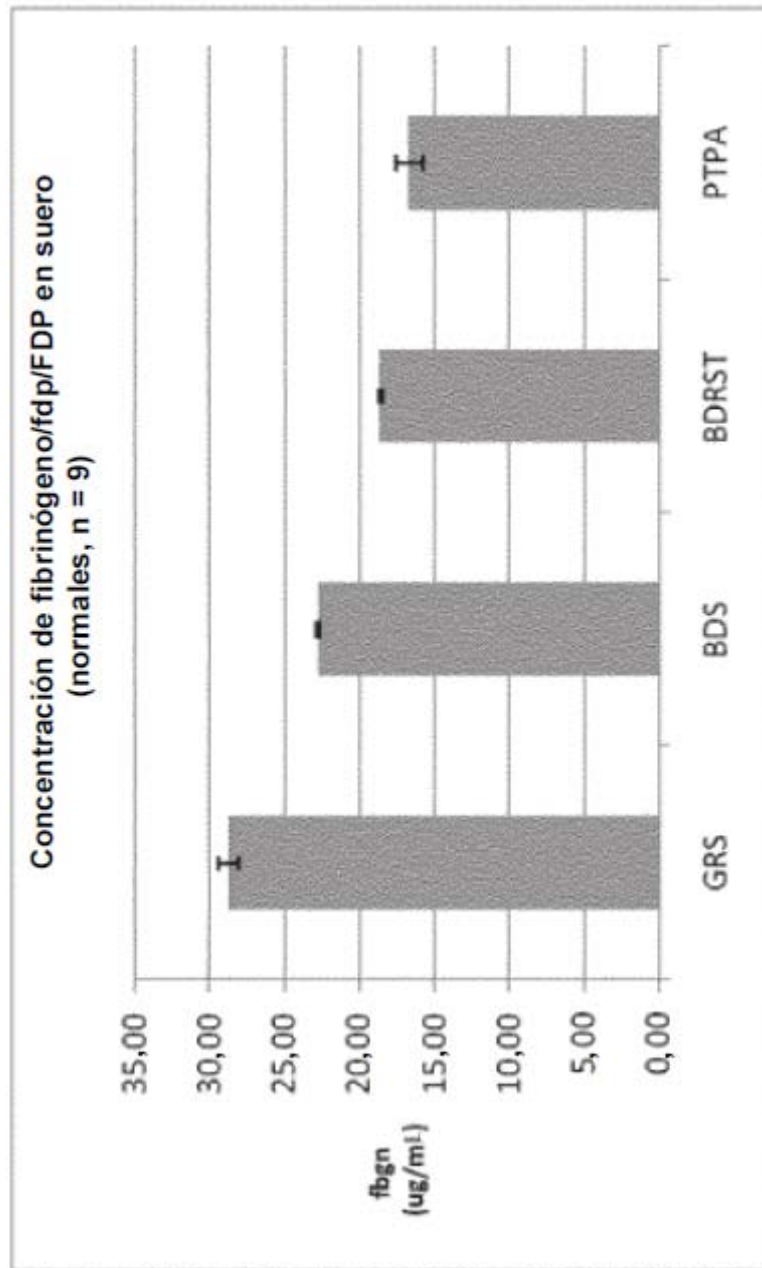


FIGURA 52

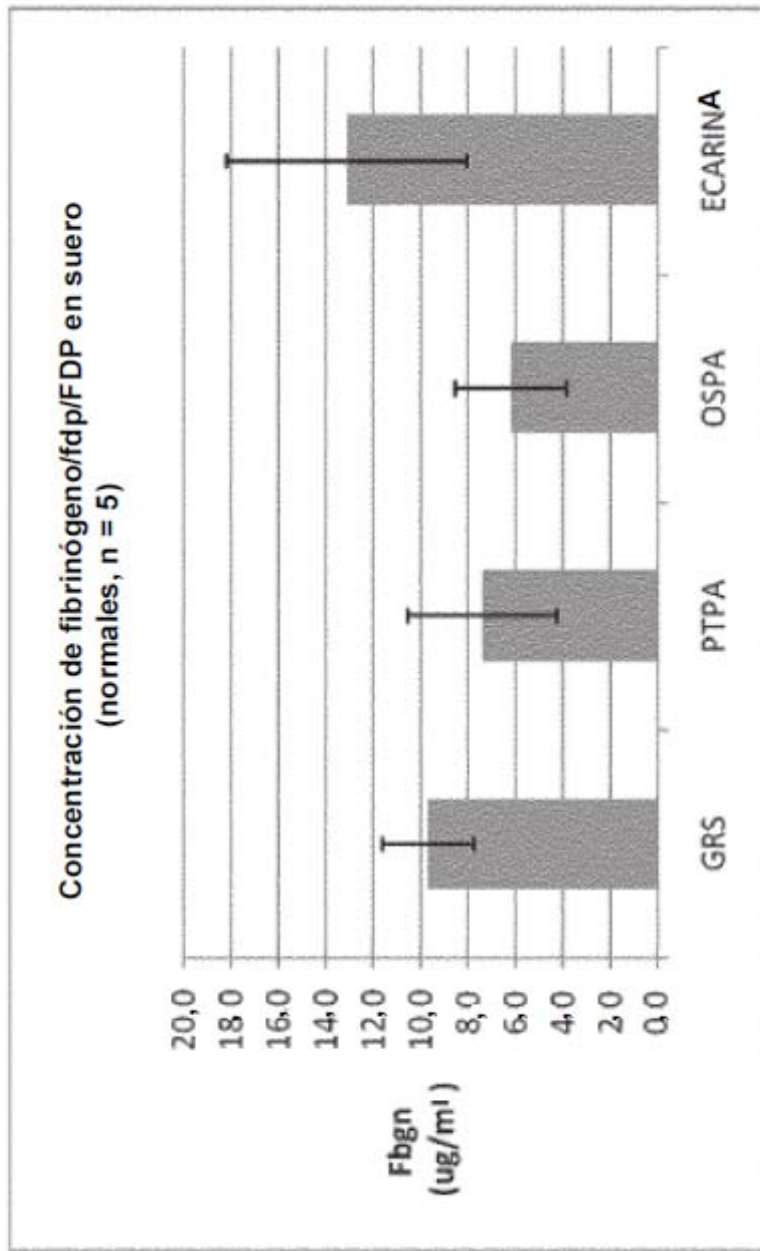


FIGURA 53

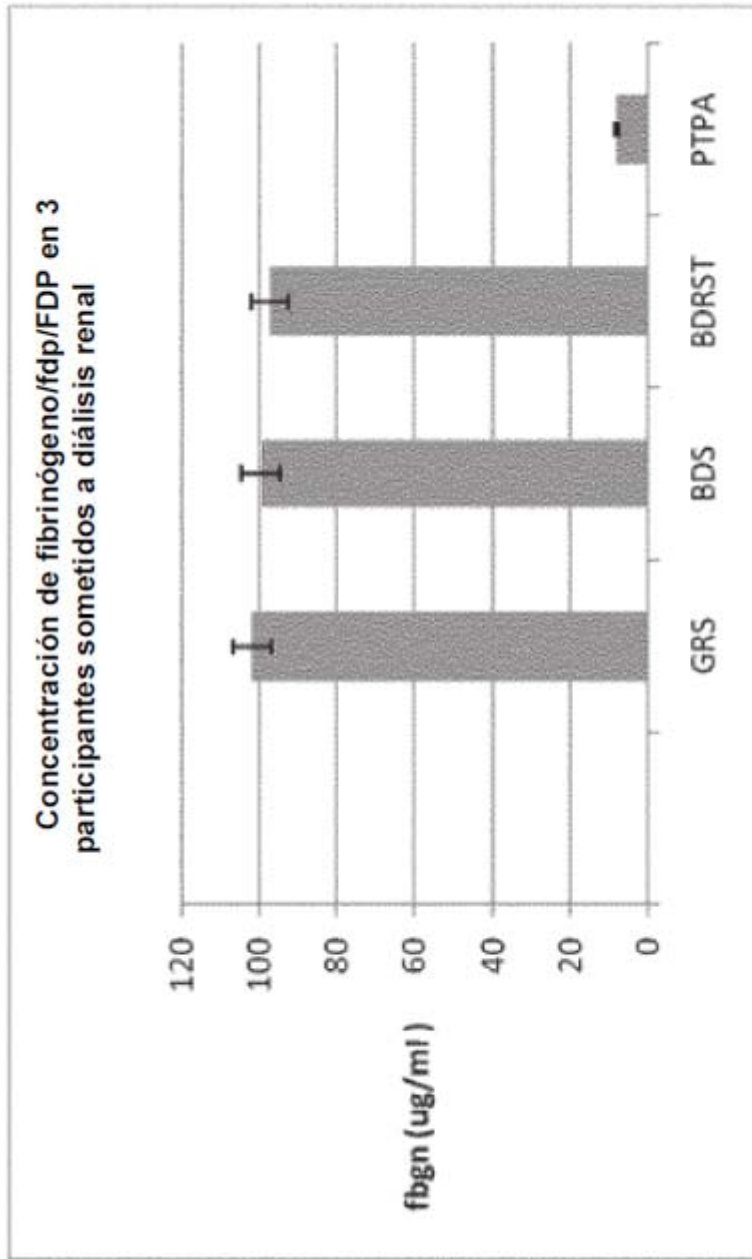


FIGURA 54

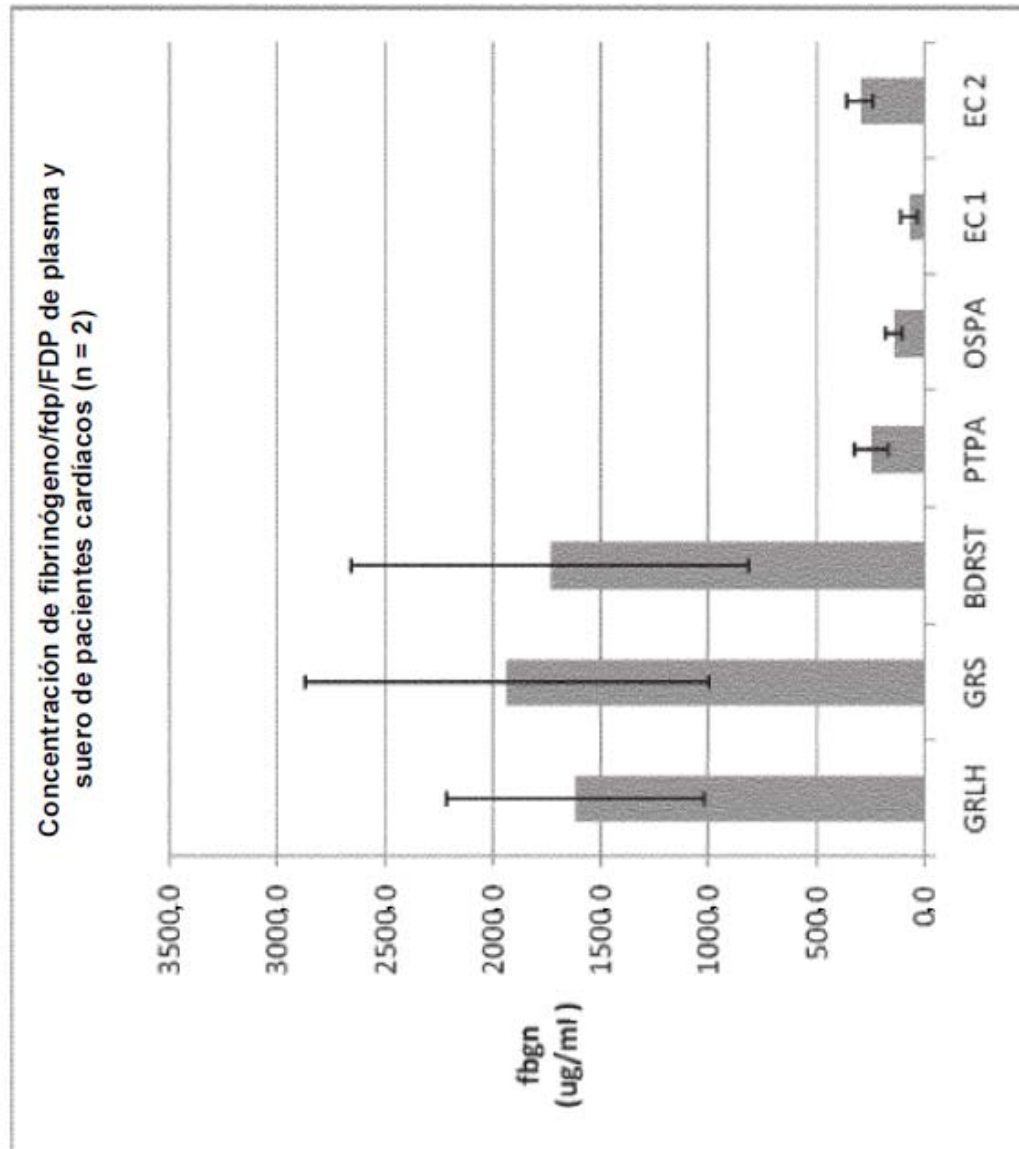


FIGURA 55



FIGURA 56

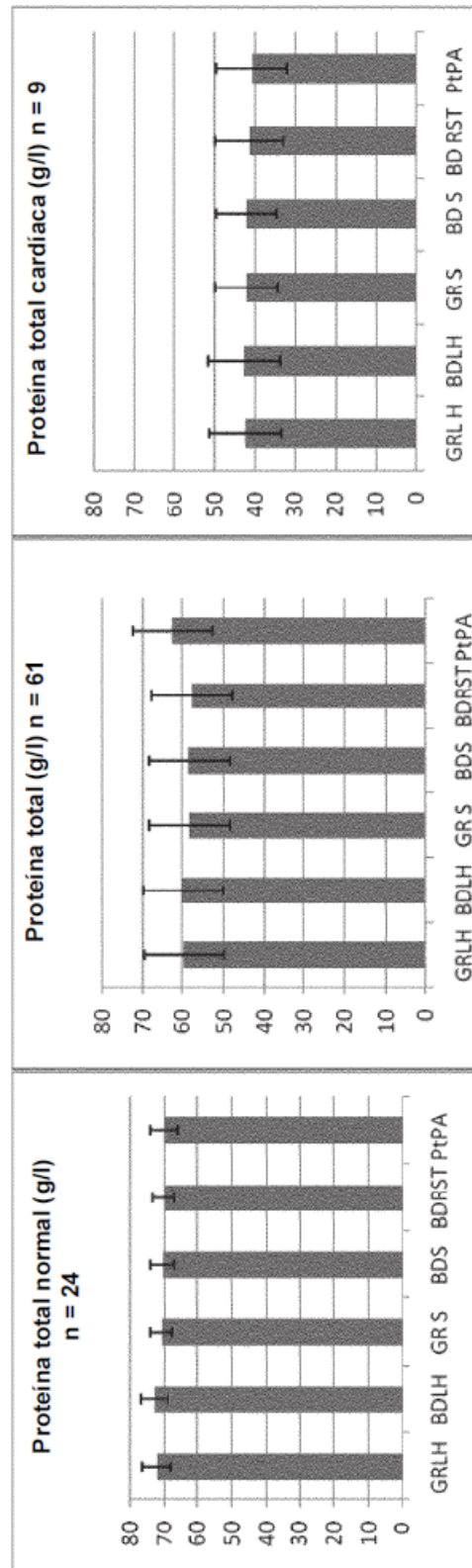


FIGURA 57

Tiempos de coagulación del plasma para estudios de estabilidad de temperatura/concentración

Coagulación del plasma (s)

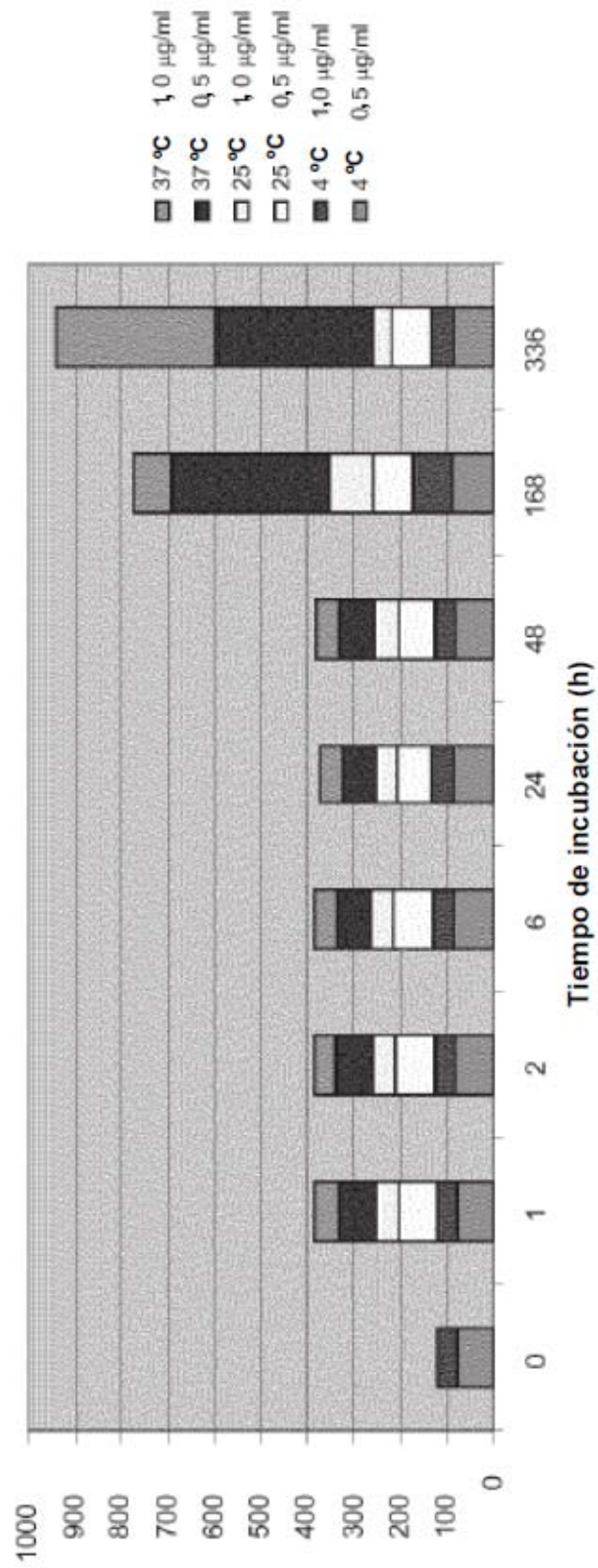


FIGURA 58

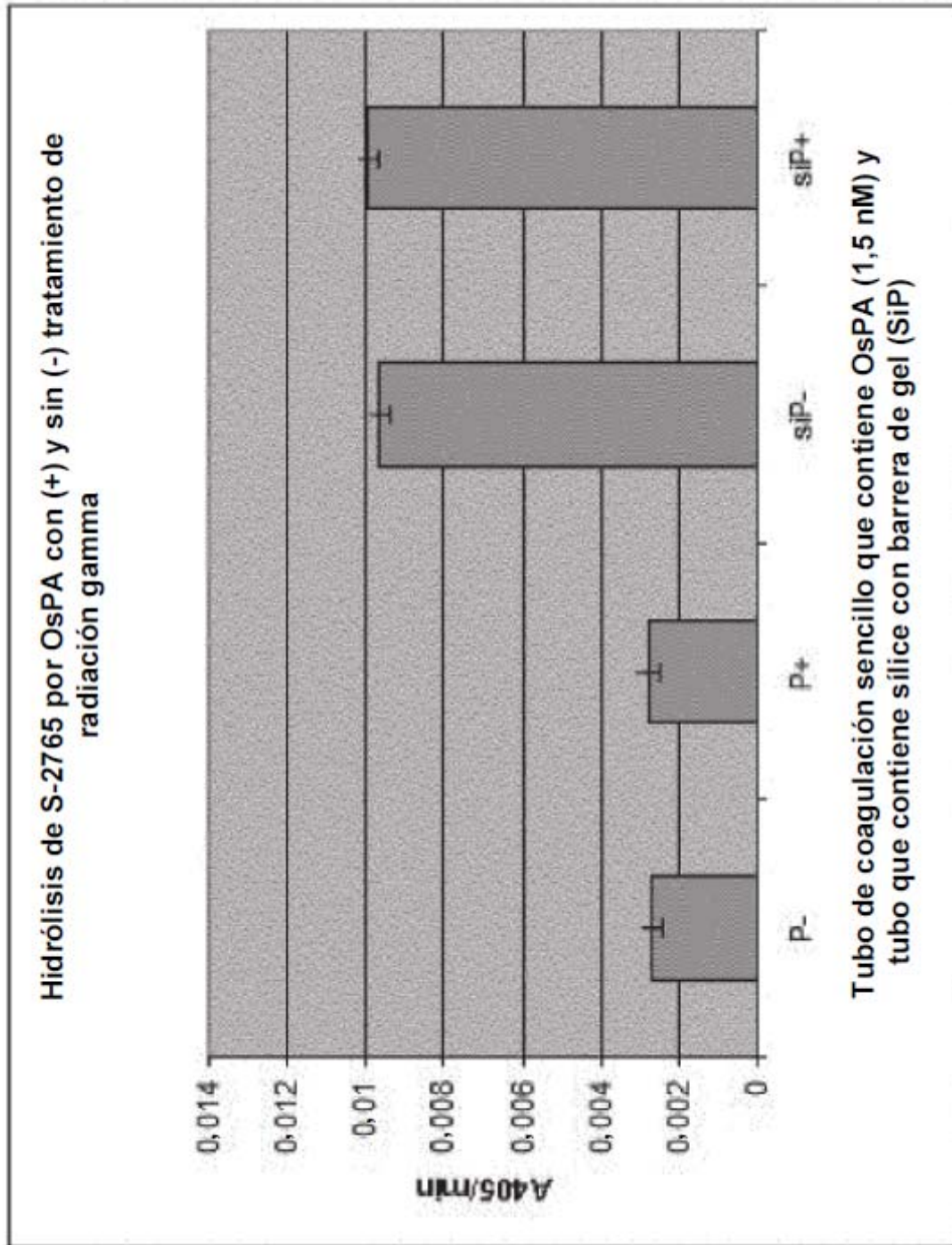


FIGURA 59

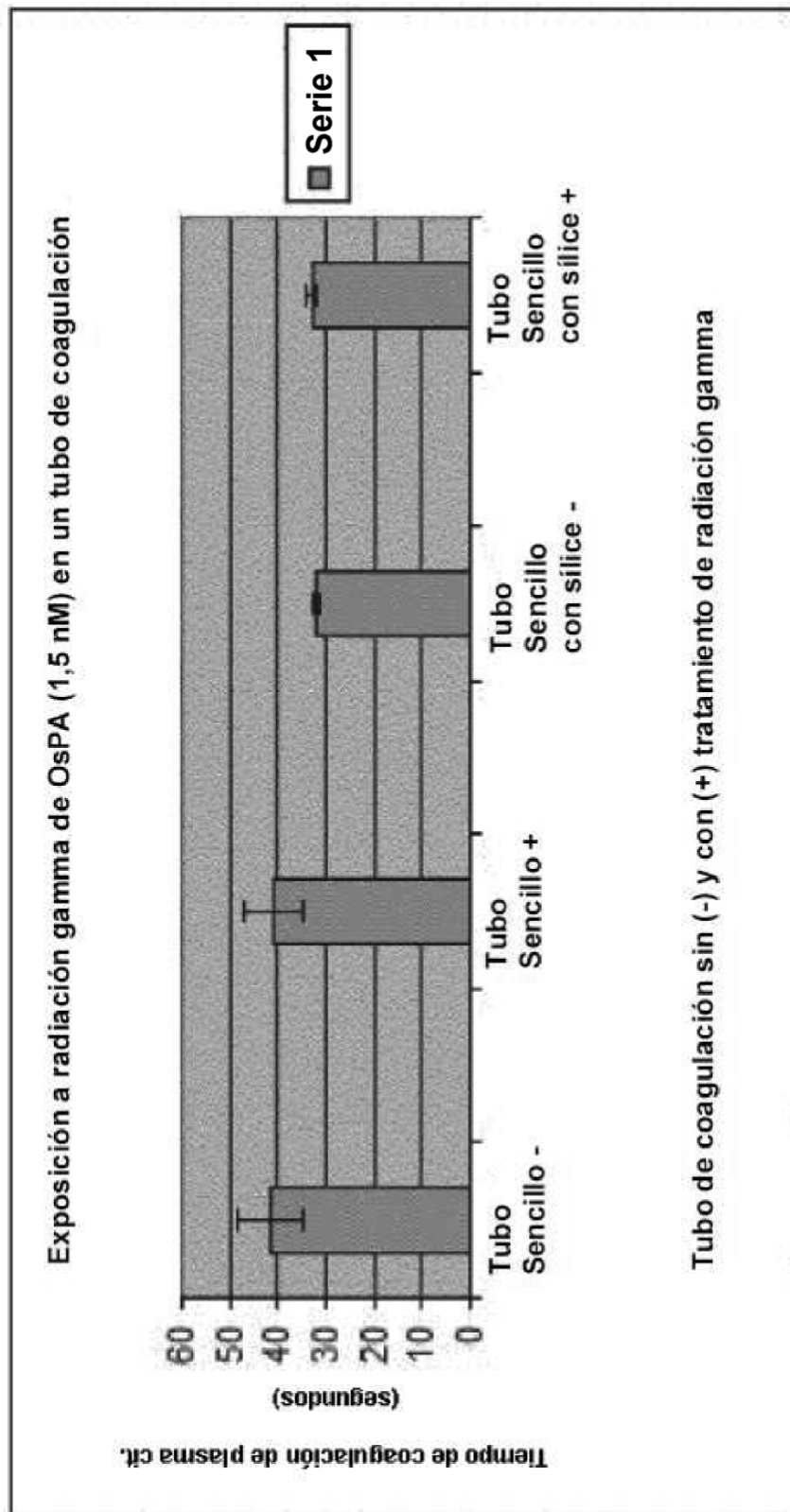


FIGURA 60

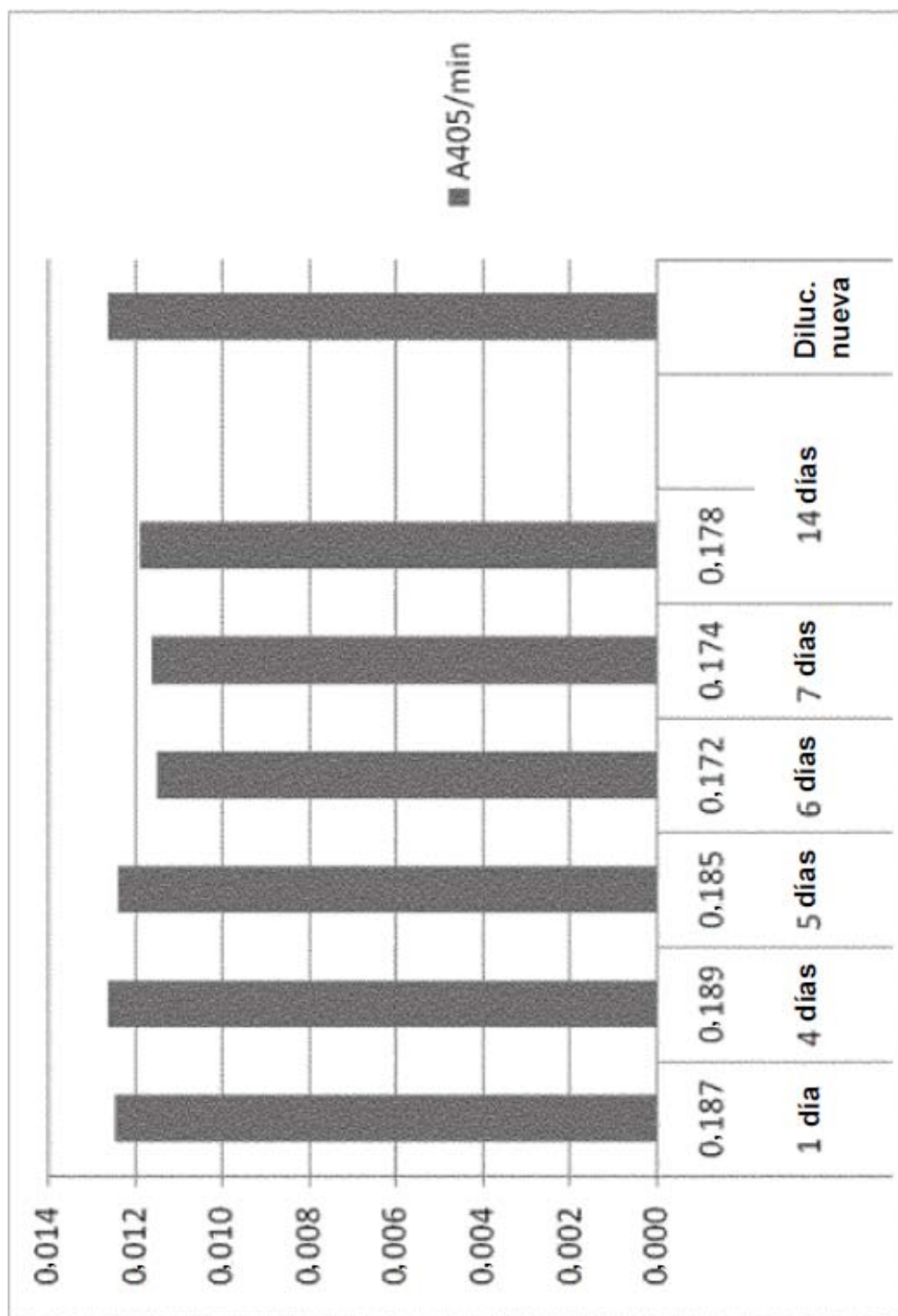


FIGURA 61

