

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICA
CLÍNICA

“EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS CONCENTRADOS PLAQUETARIOS
A LOS TRES, CINCO Y SIETE DÍAS DE SU OBTENCIÓN A PARTIR DE SANGRE
TOTAL EN EL HEMOCENTRO DE LA CRUZ ROJA ECUATORIANA EN EL
PERÍODO 2016”

CLARA ESTEFANÍA ARROYO RUBIO
EVELYN KATHERINE JARAMILLO RUALES

DIRECTORA: Máster. Rosita Chiriboga Ponce.

QUITO, 2017

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Clara Estefanía Arroyo Rubio, CI: 0503533119, autora del trabajo de graduación titulado: “Evaluación de la viabilidad de los concentrados plaquetarios a los tres, cinco y siete días de su obtención a partir de sangre total en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana en el período 2016” previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Clara Estefanía Arroyo Rubio

CI: 0503533119

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Evelyn Katherine Jaramillo Ruales, CI: 1003639844, autora del trabajo de graduación titulado: “Evaluación de la viabilidad de los concentrados plaquetarios a los tres, cinco y siete días de su obtención a partir de sangre total en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana en el período 2016” previa a la obtención del grado académico de BIOQUÍMICA CLÍNICA en la Facultad de Medicina:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.



Evelyn Katherine Jaramillo Ruales

C.I.: 1003639844

DEDICATORIA

A mis padres, Elena y Marcelo, por siempre estar presente, por ese apoyo emocional y económico que han permitido que uno de mis sueños sea cumplido a pesar de cada obstáculo que hemos pasado. Esta investigación les dedico principalmente a ustedes, por tanto esfuerzo que han hecho para que pueda terminar mi carrera profesional.

A mis hermanos, Marcela y David, por darme fuerzas, paciencia y aliento en cada momento de mi vida, gracias mis personas queridas por estar pendiente de mí y preocuparse tanto.

A mi novio David, por formar parte de mi vida, brindarme amistad y amor incondicionalmente, así como compartir cada alegría, tristeza, ira, miedo y enojo conmigo.

A mis verdaderas amigas Katherine, María José y Carlita por demostrarme lealtad, cariño, respeto y apoyarme siempre.

Clara Arroyo Rubio

DEDICATORIA

A mi madre, María Ruales, quien ha sido mujer y madre ejemplar, y a mi padre, Oswaldo Jaramillo, por darme fuerzas para nunca rendirme. Gracias papitos porque siempre me incentivaron para cumplir todas mis metas propuestas, sé que lo hicieron con toda su dedicación, gracias por llenar de amor toda mi vida, ustedes son mi mayor fortaleza y admiración.

A mi hermana, Alejandra Jaramillo, compañera de este viaje de vida, gracias por escuchar, aconsejar y alegrar los momentos más difíciles, eres mi vida ñañita, te debo todo.

A mis hermanos Mauricio, Francisco, Carlos, mi tía Lucy y toda mi querida familia, que siempre me han guiado para tomar buenas decisiones, sobretodo en cada etapa de mis estudios.

A mis amigas y amigos, quienes se convirtieron en mi segunda familia, especialmente a Clarita A. y David L. por su apoyo y paciencia incondicional.

Katherine Jaramillo

AGRADECIMIENTO

A Dios, por llenarnos de bendiciones, iluminando y protegiendo cada paso de nuestras vidas, por darnos la oportunidad de poder ingresar a una excelente universidad, en dónde encontramos personas excepcionales; agradecerle por nuestra familia, por permitirnos lograr cada meta y por brindarnos sabiduría y amor.

Un agradecimiento especial a nuestra directora de tesis Máster Rosita Chiriboga, que supo apoyar, orientar y motivarnos en la ejecución de este trabajo investigativo, con una entrega inimaginable, cubriendo todas las expectativas que depositamos en su persona. Por su gran trabajo y ayuda impartida, se ha ganado nuestra admiración y nos sentimos en deuda por todo lo recibido.

Al Dr. Marco Herdoiza y Dra. Mónica Pesántez, autoridades del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana, por darnos la apertura para poder realizar este estudio, a la Lic. Patricia Galarza por guiarnos en el área de fraccionamiento.

Al Hospital Carlos Andrade Marín, de forma especial al Dr. Hugo Romo, Director del Departamento de Investigación, quién permitió que se lleve a cabo este estudio. Así mismo, queremos agradecer a la Dra. Verónica Suárez y Lic. Patricia del laboratorio clínico quienes guiaron el procedimiento del presente trabajo; además al Dr. Fabián y Lic. Angélica, analistas en el área de Patología Molecular, que con su conocimiento supieron guiarnos en cada proceso de la medición por citometría de flujo.

Nuestro agradecimiento también va dirigido a todos nuestros profesores que formaron parte de nuestra carrera, en especial al Máster. Oscar Puente, Dra. Verónica Páez y Máster Eduardo Villacís, por habernos brindado su apoyo y conocimiento científico en la realización de esta investigación.

Como no mencionar a nuestros compañeros y amigos a la vez, ya que gracias a esa sincera amistad nos han dado aliento y fuerza para lograr culminar con éxito nuestra etapa universitaria.

Clarita y Katherine

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE TABLAS	x
TABLA DE FIGURAS	xii
LISTA DE GRÁFICOS	xiii
TABLA DE ANEXOS	xiv
LISTA DE SIGLAS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	6
1.3. OBJETIVOS	7
1.3.1. Objetivo general.....	7
1.3.2. Objetivos específicos.....	7
1.4. LIMITACIONES DE ESTUDIO	7
CAPÍTULO II.....	8
MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL	8
2.1. ANTECEDENTES	8
2.2.1. Producción de plaquetas	9
2.2.2. Características de las plaquetas.....	11
2.2.3. Principales receptores de la membrana plaquetaria	11
2.2.4. Hemostasia.....	12
2.2.5. Concentrados plaquetarios (CPQ).....	15
2.2.6. Preparación de los concentrados plaquetarios a partir de buffy coat.....	15
2.2.7. Anticoagulantes.....	16
2.2.8. Almacenamiento de CPQ	16

2.2.9. Lesión por almacenamiento.....	16
2.2.10. Transporte de concentrados plaquetarios.....	17
2.2.11. Viabilidad de los concentrados plaquetarios.....	17
2.2.12. Control de calidad de los concentrados plaquetarios.....	18
2.2.13. Mecanismo de funcionamiento de citometría de flujo.....	21
2.2.14. Citometría de flujo y activación plaquetaria.....	23
2.3. MARCO CONCEPTUAL.....	24
CAPÍTULO III.....	26
MARCO METODOLÓGICO.....	26
3.1. DISEÑO DE ESTUDIO.....	26
3.2. MUESTRA Y TAMAÑO MUESTRAL.....	26
3.3. SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	27
3.3.1. Criterios de inclusión.....	27
3.3.2. Criterios de exclusión.....	27
3.4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	27
3.4.1. Variable dependiente.....	27
3.4.2. Variable independiente.....	27
3.5. OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....	30
3.6. PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO.....	32
3.6.1. Cultivo microbiológico.....	32
3.6.2. Análisis de pH.....	33
3.6.3. Contaje plaquetario, y contaje de eritrocitos y leucocitos residuales.....	34
3.6.4. Medición de la activación plaquetaria.....	35
3.7. CONTROL DE CALIDAD.....	37
3.7.1. Gestión de calidad de equipos.....	37
3.7.2. Cultivo microbiológico.....	39
3.7.3. Medición del pH.....	41

3.7.4. Contaje plaquetario, contaje de leucocitos y eritrocitos residuales	41
3.7.5. Citometría de flujo FACS Canto II	41
3.8. MANEJO DE LA INFORMACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS	43
CAPÍTULO IV	45
RESULTADOS	45
4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	45
4.2. RELACIÓN DE LOS ASPECTOS FÍSICOS CON LOS DÍAS DE ALMACENAMIENTO	50
4.3. RELACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD ESTABLECIDOS POR LA AABB CON LOS DÍAS DE ALMACENAMIENTO	54
4.4. RELACIÓN DE LA LIBERACIÓN DEL MARCADOR CD62 P-SELECTIN CON LOS DÍAS DE ALMACENAMIENTO	56
4.5. RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES MEDIDAS CON LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA	58
DISCUSIÓN	61
CONCLUSIONES	67
RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXOS	77

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1:	Receptores de la superficie plaquetaria.....	12
Tabla N° 2:	Operacionalización de las variables.....	28
Tabla N° 3:	Gestión de Calidad de Equipos e Instrumentos.....	38
Tabla N° 4:	Gestión de Calidad de Insumos y Reactivos.....	39
Tabla N° 5:	Control de Calidad del Agar Base Sangre.....	39
Tabla N° 6:	Control de Calidad del Agar EMB.....	40
Tabla N° 7:	Control de Calidad del medio de cultivo Tioglicolato.....	40
Tabla N° 8:	Control de Calidad de la medición del pH.....	41
Tabla N° 9:	Control de Calidad de la Medición del Contaje Celular.....	41
Tabla N° 10:	Evaluación del desempeño del Citómetro de Flujo FACS Canto II.....	42
Tabla N°4.1:	Frecuencias del nivel de swirling.....	45
Tabla N°4.2:	Frecuencias de agregados plaquetarios.....	46
Tabla N°4.3:	Frecuencias del análisis de lipemia.....	46
Tabla N°4.4:	Frecuencias del análisis de presencia o ausencia de burbujas.....	47
Tabla N°4.5:	Frecuencia de CPQs que cumplen con el contaje de leucocitos residuales.....	48
Tabla N°4.6:	Frecuencia de la determinación del pH.....	49
Tabla N°4.7:	Frecuencia del análisis de activación plaquetaria.....	49
Tabla N°4.8:	Relación entre los días de almacenamiento y el nivel de swirling.....	50
Tabla N°4.9:	Relación entre los días de almacenamiento y la presencia de agregados	51
Tabla N°4.10:	Relación entre los días de almacenamiento y la presencia de lipemia.....	52
Tabla N°4. 11:	Relación entre los días de almacenamiento y la presencia de burbujas...	53
Tabla N°4. 12:	Relación entre los días de almacenamiento y el contaje de eritrocitos residuales.....	54

Tabla N°4.13:	Relación entre el pH y los días de almacenamiento.....	55
Tabla N°4.14:	Comparación del pH con los diferentes días de almacenamiento utilizando la prueba de Tukey	56
Tabla N°4.15:	Estadísticos descriptivos de la activación plaquetaria	56
Tabla N°4.16:	Relación entre la activación plaquetaria y los días de almacenamiento ..	57
Tabla N°4.17:	Comparación de la activación plaquetaria con los diferentes días de almacenamiento mediante la prueba de Tukey	57
Tabla N°4.18:	Relación entre la activación plaquetaria y el swirling	58
Tabla N°4.19:	Regresión simple entre la activación y el swirling	58
Tabla N°4.20:	Relación entre la activación plaquetaria y agregados	59
Tabla N°4.21:	Relación entre la activación plaquetaria y lipemia	59
Tabla N°4.22:	Relación entre la activación plaquetaria y burbujas.....	60
Tabla N°4.23:	Correlación de Pearson entre el pH y la activación plaquetaria	60

TABLA DE FIGURAS

Figura N°1:	Megacariopoyesis	10
Figura N°2:	Fases de la respuesta plaquetaria posterior a la lesión vascular	14
Figura N°3:	Sistema fluídico	21
Figura N°4:	Sistema óptico	22
Figura N°5:	Sistema electrónico.....	23
Figura N°6:	Estandarización de medición de P - Selectin en concentrados plaquetarios	36
Figura N° 7:	Control Negativo para Citometría de Flujo	42
Figura N° 8:	Control Positivo para citometría de flujo.....	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico N°4.1: Porcentaje de CPQs que cumplen con el contaje plaquetario	47
Gráfico N°4.2: Frecuencia de CPQs que cumplen con el contaje de eritrocitos residuales	48
Gráfico N°4.3: Frecuencia de la presencia de lipemia	52
Gráfico N°4.4: Frecuencia de la presencia de burbujas.....	53
Gráfico N°4.5: Diagrama de caja pH/almacenamiento	55
Gráfico N°4.6: Diagrama de caja activación plaquetaria/almacenamiento	57

TABLA DE ANEXOS

Anexo N° 1:	Autorización del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana.....	77
Anexo N° 2:	Autorización del Hospital Carlos Andrade Marín.....	79
Anexo N° 3:	Consentimiento informado a donantes para extracción de un tubo extra	80
Anexo N° 4:	Control de calidad de los concentrados plaquetarios del "Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana"	81
Anexo N° 5:	Registro de transporte de CPQs	83
Anexo N° 6:	Control de calidad de medios de cultivo.....	83
Anexo N° 7:	Prueba de homogeneidad de varianzas- pH/días de almacenamiento.....	84
Anexo N° 8:	Prueba de normalidad- pH/ días de almacenamiento	84
Anexo N° 9:	Prueba de homogeneidad de	84
Anexo N° 10:	Prueba de normalidad- activación plaquetaria/ días de almacenamiento.	84
Anexo N° 11:	Prueba de homogeneidad de varianzas- activación/ swirling	85
Anexo N° 12:	Prueba de normalidad- activación plaquetaria/ swirling	85
Anexo N° 13:	Prueba de homogeneidad de varianzas- activación/ lipemia	85
Anexo N° 14:	Prueba de normalidad- activación plaquetaria/ lipemia	85
Anexo N° 15:	Prueba de homogeneidad de varianzas- activación/ burbujas	85
Anexo N° 16:	Prueba de normalidad- activación plaquetaria/ burbujas.....	86
Anexo N° 17:	Equipos y reactivos	87
Anexo N° 18:	Procesamiento de las muestras	88

LISTA DE SIGLAS

- A.A.B.B.:** Asociación Americana de Bancos de Sangre
- AA:** Ácido Araquidónico
- AAS:** Ácido Acetil Salicílico
- ADP:** Adenosina 5 - Difosfato
- CD62:** Proteína P-selectin
- CPQs:** concentrados plaquetarios
- CRE:** Cruz Roja Ecuatoriana
- FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos
- fL:** Fentolitros
- mL:** mililitro
- OPS:** Organización Panamericana de la Salud
- PF4:** Factor 4
- PRP:** Plasma Rico en Plaquetas
- sCD62:** Forma soluble de la proteína P-selectin
- UFC/mL:** Unidades Formadoras de Colonias por mililitro
- vWF:** factor von Willebrand

RESUMEN

“EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS CONCENTRADOS PLAQUETARIOS A LOS TRES, CINCO Y SIETE DÍAS DE SU OBTENCIÓN A PARTIR DE SANGRE TOTAL EN EL HEMOCENTRO DE LA CRUZ ROJA ECUATORIANA EN EL PERÍODO 2016”

Introducción: Uno de los hemocomponentes de mayor demanda para su producción en bancos de sangre y Hemocentros son los concentrados plaquetarios (CPQs), ya que estos son usados como medida preventiva y terapia ante varias enfermedades hematológicas, que van desde problemas de coagulación hasta alteraciones que pueden desencadenar en la muerte del individuo, por esta razón se requiere que los CPQs cumplan con el objetivo de restablecer la hemostasia y ofrecer al paciente una terapia transfusional eficaz, por lo que el monitoreo de los parámetros de calidad en las diferentes etapas de producción es primordial en estos hemocomponentes.

Materiales y Métodos: Se realizó un estudio descriptivo transversal, que evaluó la viabilidad de los concentrados plaquetarios (CPQs) almacenados en el Hemocentro de la Cruz Roja; para ello se obtuvo un tamaño muestral de 64 CPQs evaluados a los tres, cinco y siete días de almacenamiento. Los parámetros evaluados fueron el aspecto físico: color, swirling, agregados, presencia de burbujas y lipemia; siguiendo los lineamientos de la Asociación Americana de Bancos de Sangre se determinó: volumen, conteo celular, T° de almacenamiento y pH; por último se determinó el porcentaje de la activación plaquetaria mediante la liberación en superficie de la glicoproteína P-selectin (CD62), usando citometría de flujo.

Resultados: Los análisis mostraron que todos los concentrados plaquetarios cumplen en un 100% con los parámetros físicos; sin embargo, las variables que presentaron diferencias significativas al séptimo día con relación al tercer día de almacenamiento fueron: el swirling ($p=0,000$) y agregados plaquetarios ($p=0,000$). El 54,2% de todos los CPQs, presentaron un conteo óptimo de plaquetas ($>5,5 \times 10^{10}$ cél/bolsa) mientras que el 100% cumplieron con la cantidad de leucocitos residuales ($<0,12 \times 10^9$ cél/bolsa), en contraste el 92,7% no cumplieron con el parámetro de conteo de eritrocitos residuales ($<1,2 \times 10^9$ cél/bolsa). Además la activación plaquetaria aumentó significativamente desde el quinto día hasta el séptimo día, observando una relación inversamente proporcional con el pH.

Conclusiones y Recomendaciones: La viabilidad de los concentrados plaquetarios difiere con los días de almacenamiento. Los parámetros como el swirling, agregados plaquetarios y pH indican que existe una variación significativa al séptimo día de almacenamiento, además estas variables se relacionan con el aumento de la activación plaquetaria, por lo que se recomienda evaluar el swirling y agregados a todos los concentrados plaquetarios antes de ser transfundidos, indicativo directo de la cantidad de plaquetas, así como su morfología y activación plaquetaria; no se deberían utilizar los CPQs luego del quinto día de almacenamiento.

Palabras claves: homeostasia, Asociación Americana de Bancos de Sangre, pH, P-selectin, viabilidad, citometría de flujo

ABSTRACT

“EVALUATION OF THE VIABILITY OF PLATELET CONCENTRATE STORED FROM THREE, FIVE AND SEVEN DAYS, PREPARED BY WHOLE BLOOD AT HEMOCENTRO DE LA CRUZ ROJA DE ECUADOR ON THE PERIOD 2016-2017”

Background: One of the blood components of greater demand for production in blood banks and blood centers are the platelet concentrates (PCs), since these are used as a preventive measure and therapy to a number of hematologic diseases, ranging from blood clotting problems that can lead to alterations and death of the individual. Thus, PCs are required to comply with the objective of restoring hemostasis and offer the patient an effective transfusion therapy, so that monitoring of the parameters of quality in the different stages of production is paramount in these blood components.

Materials and Methods: A descriptive cross-sectional study, which evaluated the viability of the platelet concentrates (PCs) stored at “Hemocentro de la Cruz Roja del Ecuador”, was conducted. A sample size of 64 PCs was evaluated at three, five and seven days of storage. The parameters evaluated were physical appearance: color, swirling, aggregates, presence of bubbles and lipemia. Following the guidelines of the American Association of Blood Banks: volume, cell counting, storage temperature and pH were counted. Finally, the percentage of platelet activation through the release on the surface of the glycoprotein P-selectin (CD62) was determined using flow cytometry.

Results: The analysis showed that all platelet concentrates comply in a 100% with the physical parameters. However, the variables that showed significant differences on the seventh day in relation to the third day of storage were: swirling ($p=0.000$) and platelet aggregates ($p=0.000$). The 54.2% of all PCs, presented an optimal platelet count ($>5.5 \times 10^{10}$ cel/bag) while the 100% met the amount of residual leukocytes ($<0.12 \times 10^9$ cel/bag), in contrast, the 92.7% did not comply with the parameter of residual erythrocytes count ($<1.2 \times 10^9$ cel/bag). In addition, platelet activation increased significantly from the fifth day until the seventh day, observing an inverse relationship with pH.

Conclusions and recommendations: The viability of platelet concentrates differ along the days of storage. The parameters such as the swirling, pH and platelet aggregates indicate that there is significant variation on the seventh day of storage. In addition, these variables are associated with increased platelet activation, so it is recommended to evaluate the swirling and aggregates to all platelet concentrates before being transfused. This shall be an indication of the amount of platelets, as well as its morphology and platelet activation. In order to use the PCs up to the seventh day it is recommended to add an additive solution which decreases the damage for storage.

Key words: homeostasis, American Association of Blood Banks, pH, P-selectin, viability, flow cytometry.

INTRODUCCIÓN

Los Bancos de Sangre del país, han venido instaurando procesos de control de calidad, siguiendo lineamientos de organizaciones nacionales e internacionales como El Plan Nacional de Salud y de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB), respectivamente, con el objetivo de obtener hemocomponentes seguros y eficaces para la terapia transfusional, garantizando la recuperación total o parcial de la salud y mejorar la calidad de vida de las personas que padecen de enfermedades hematológicas (Ministerio de Salud Pública, 2015) (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS), establece que para obtener componentes sanguíneos seguros y confiables, es imprescindible donantes voluntarios de sangre regulares no remunerados. En América Latina, el incremento de donantes altruistas ha sido leve de un 41% en el 2010 a un 45% en el 2014, por lo que en muchos países constituye un desafío cubrir la demanda de transfusiones y sobre todo de CPQs. Sin embargo, Ecuador logró un gran progreso de donación voluntaria de un 38% en el 2010 a un 60% en el 2014 (Organización Panamericana de la Salud, 2016), y se considera a la Cruz Roja Ecuatoriana, como la institución que ha contribuido en este alcance, registrando en ese mismo año un total de 149000 donaciones, el 91,3% de donantes fueron voluntarios, abasteciendo de esta forma al 69% de la demanda de sangre de servicios de salud públicos y privados a nivel nacional (Cruz Roja Ecuatoriana, 2017). Otro factor importante, es que todos los componentes sanguíneos cumplan con un control de calidad estricto tanto en la obtención, fraccionamiento, conservación y despacho (Organización Panamericana de la Salud OPS, 2012).

De todos los hemocomponentes, los concentrados plaquetarios son los más lábiles, su calidad se ve afectada por el método de obtención, el material de la bolsa y condiciones de almacenamiento incluyendo el tiempo de conservación, agitación y anticoagulante usado, los cuales pueden provocar cambios en la morfología y funcionalidad de las plaquetas, afectando su número e integridad, además, la temperatura es un factor que favorece el

crecimiento bacteriano, por lo que estos hemocomponentes requieren de un estricto proceso de obtención y control de calidad para garantizar su funcionabilidad postransfusional en el paciente (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012) (Nor & Huda, 2014).

Los concentrados plaquetarios han sido empleados con fines terapéuticos y profilácticos, en pacientes con alteraciones cuantitativas y cualitativas de las plaquetas, que presentan trastornos mínimos desde una alteración en el tiempo de coagulación, hasta problemas en la hemostasia, que comprometen la vida del individuo (Salazar, 2003). A pesar de su utilidad, los concentrados tienen una vida útil limitada, siendo 5 días lo recomendado por la AABB (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012), sin embargo, la FDA (Food and Drug Administration) recomienda el uso de los concentrados plaquetarios hasta los siete días de almacenamiento, previo un cultivo microbiológico, para descartar contaminación bacteriana (FDA, 2016).

A pesar de esta recomendación, es necesario validar si los concentrados plaquetarios son viables hasta el séptimo día, así como determinar si cumplen con requerimientos establecidos por estándares nacionales e internacionales (Nor & Huda, 2014), esto se detecta mediante la medición de parámetros *in vitro* como son: valoración de parámetros físicos, medición del conteo celular, pH, cultivo microbiológico y la expresión del marcador P-selectin (CD62), indicador de la activación plaquetaria *in vitro*, medido por citometría de flujo (Nagy, Debreceni, & Kappelmayer, 2011).

La Asociación Americana de Bancos de Sangre establece que independientemente del método de obtención de plaquetas, el control de calidad se debe realizar en forma periódica, debido a que la medición *in vitro* de estos parámetros son útiles para predecir su funcionalidad y viabilidad *in vivo*. Entre sus requerimientos es importante que al menos el 90% de los resultados cumplan con un conteo de plaquetas óptimo suspendidos en un volumen de 40-70 mL, así como un pH > 6.2, y el 100% no deben presentar contaminación bacteriana. Adicionalmente, se debe inspeccionar visualmente antes de ser liberados, pues concentrados que presenten agregados, o una lipemia muy marcada deben ser descartados; un parámetro que debe ser observado es el “swirling”, su presencia es indicativo del mantenimiento del pH e indicativo de la viabilidad del concentrados plaquetarios (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012).

Por lo que se recomienda que los Bancos de Sangre, deban inspeccionar parámetros que evalúen el aspecto físico a todos los CPQs antes de ser transfundidos, pues en este estudio se encontró que el swirling y agregados, están relacionadas con la activación plaquetaria. Y en caso de que se requiera utilizar hasta el séptimo día de almacenamiento, realizar un cultivo microbiológico, o evaluar todos los parámetros de calidad de los CPQs luego de añadirles una solución aditiva para su mejor conservación y disminución de la lesión plaquetaria.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los derivados sanguíneos más lábiles son los concentrados plaquetarios especialmente por los procesos seguidos para su obtención (Pineda & Chiriboga, 2015), los parámetros más sensibles son el tiempo y temperatura de almacenamiento. Tiempos prolongados pueden ocasionar contaminación bacteriana y activación plaquetaria.

En reportes mundiales la mortalidad por concentrados plaquetarios contaminados oscila entre 1 en 2000 y 1 en 12.000 transfusiones por lo que deben ser descartados a los cinco días de su obtención, los microorganismos involucrados son: *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* (Rivera, Fernández, Montes, Villegas, & Islas, 2011).

Investigadores como Carrillo y Garnica, reportan que los receptores de concentrados plaquetarios obtenidos dentro de 24-48 horas, tienen una buena recuperación, supervivencia y función plaquetaria conservada (Carrillo & Garnica, 2011). Sin embargo, las plaquetas sufren lesiones durante el almacenamiento que afectan tanto a la morfología como a la función biológica de estas (Kshitija & Ravneet, 2015) (Organización Panamericana de la Salud OPS, 2012). A pesar de ello, en algunos países utilizan las plaquetas hasta el séptimo día de almacenamiento, después de una prueba microbiológica (Hussein, 2015, FDA, 2016).

Las Buenas Prácticas Transfusionales establecen que los concentrados plaquetarios obtenidos, deben ser evaluados al final de la etapa de almacenamiento permitido, con el fin de determinar la calidad y viabilidad (Reina & Moreno, 2011). Por tanto, según el Instituto Nacional de Salud de Colombia, se exige que el 75% del total de los componentes plaquetarios cumplan los siguientes parámetros: pH (6.4-7.4), volumen (50-70mL), recuento de plaquetas ($>6.0 \cdot 10^{10}$ /Unidad) (Organización Panamericana de la Salud OPS, 2012), recuento de leucocitos ($<0.12 \cdot 10^9$ /Unidad), recuento de eritrocitos ($<1.2 \cdot 10^9$ /Unidad) y cultivo microbiológico (negativo) (Instituto Nacional de Salud de Colombia, 2011).

Además de estos parámetros se recomienda medir la activación de las plaquetas mediante la liberación de P-selectin (CD62), la cual, es una glicoproteína presente en la membrana de los gránulos alfa de las plaquetas, que se expresa en la superficie de las mismas al ser activadas (Nagy, Debreceni, & Kappelmayer, 2011), constituyendo un buen indicador de la función plaquetaria.

En la etapa del almacenamiento existe una mayor expresión de CD62, aunque se desconoce la importancia de este aumento durante la transfusión. Sin embargo, afirman que durante la ruptura proteolítica de CD62, se libera la forma soluble de la proteína (sCD62), que constituye una posible causa de tromboembolismo venoso (Plaza, Lozano, Sánchez, & Egea, 2012).

En Ecuador, los Servicios de Sangre utilizan la Guía para Donaciones de Sangre y la Guía de Práctica Clínica de Transfusión de Sangre y sus Componentes; sin embargo, no se ha desarrollado programas de gestión de calidad para los servicios de sangre a nivel nacional, debido a la falta de un sistema unificado de aseguramiento, con el fin de garantizar el cumplimiento de estándares de seguridad, calidad, procesamientos y tecnologías, evaluadas, validadas y estandarizadas (Ministerio de Salud Pública, 2013).

Por esta razón, en este estudio se ha planteado realizar un seguimiento a los parámetros que evalúan la viabilidad de los concentrados plaquetarios, con el propósito de garantizar que provean un número adecuado de plaquetas con funcionamiento normal, para prevenir o detener un sangrado activo (Ministerio de Salud Pública, 2013).

Frente a esto se plantea la siguiente interrogante: ¿Los concentrados plaquetarios demuestran su viabilidad hasta el séptimo día de almacenamiento?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Los concentrados plaquetarios (CPQs) son derivados sanguíneos que se utilizan para la prevención o tratamiento de hemorragias sean estas ocasionadas por una disminución o defecto en la estructura y funcionalidad de las plaquetas (Bendezú, 2015). Uno de los objetivos del uso de concentrados plaquetarios alogénicos es que estos reestablezcan las funciones perdidas en las plaquetas del paciente.

La recuperación del nivel funcional y cantidad de plaquetas en el paciente depende no solo de la dosis utilizada sino de la viabilidad de las plaquetas trasfundidas por lo que los concentrados plaquetarios elegidos para ser trasfundidos, deben ser de buena calidad (Zumbado-Salas, Ramírez-Acosta, & Rodríguez-Pineda, 2015). Se ha determinado que la vida útil recomendada de los concentrados plaquetarios disponibles en la actualidad es de 5 días a 20-24°C con agitación continua (Mallhi, Kumar, & Philip, 2015), sin embargo y de acuerdo al estudio realizado por *Bashir* en 2016, se demuestra que la función plaquetaria se mantiene dentro de los niveles óptimos hasta el día 14 de almacenamiento, pero los parámetros *in vitro* se preservan mejor en concentrados plaquetarios almacenados en solución aditiva que en plasma (Bashir, Aftab, & Akbar, 2016).

El estudio de *Bendezú* estableció que en los servicios de medicina transfusional un 26,8% de concentrados plaquetarios del total de hemocomponentes son utilizados y del 100% de pacientes que recibieron transfusiones plaquetarias únicamente dos pacientes presentaron valores normales de plaquetas, esto debido a varias causas, unas inherentes al paciente y otras en errores en la obtención de los CPQs (Bendezú, 2015).

Es por esta razón que en este estudio se evaluó la viabilidad de los CPQs desde el día de su producción hasta el séptimo día de almacenamiento, para determinar el tiempo de viabilidad de las plaquetas, así como, identificar si los procesos de obtención de las plaquetas introducen variables que ocasionan disminución en el conteo de plaquetas y su viabilidad, esto se realizó con el fin de satisfacer la gran demanda clínica, preservando al mismo tiempo los recursos limitados y mejorar la relación costo-beneficio.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

- Determinar la viabilidad de los concentrados plaquetarios en sus diferentes etapas de almacenamiento en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana en el período de Noviembre a Marzo del año 2016 al 2017.

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar los parámetros relacionados con el mantenimiento del aspecto físico de los concentrados plaquetarios almacenados a los tres, cinco y siete días de su obtención.
- Evaluar los parámetros de la calidad considerados en la AABB de los concentrados plaquetarios obtenidos a los tres, cinco y siete días de su almacenamiento.
- Evaluar la funcionalidad de los concentrados plaquetarios mediante la liberación en superficie de la glicoproteína CD62, usando citometría de flujo a los tres, cinco y siete días de su obtención.
- Relacionar el tiempo de almacenamiento y activación de los concentrados plaquetarios y los diferentes parámetros que determinan la viabilidad de los mismos.

1.4. LIMITACIONES DE ESTUDIO

Una de las limitaciones del estudio es que no existe un manual a nivel nacional estandarizando los parámetros de medición para la evaluación de la viabilidad de los concentrados plaquetarios de los bancos de sangre públicos ni privados del Ecuador.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1. ANTECEDENTES

En 1881, se identificó por primera vez las plaquetas, a partir de este descubrimiento se han realizado estudios del funcionamiento plaquetario y su utilidad en pacientes con hemorragias. Duke en 1910, detectó que la transfusión de sangre total en pacientes trombocitopénicos aumentó el recuento de plaquetas (Coller, 2012).

Reyna y Moreno en su estudio realizado en el año 2011, evaluaron los concentrados plaquetarios obtenidos de sangre total al quinto día de su almacenamiento, midiendo los siguientes parámetros de control de calidad: conteo plaquetario, medición del volumen, pH y control bacteriológico. Los resultados del estudio mostraron que el pH fue >6.2 , el volumen fue de 50-70mL y el cultivo negativo, valores que cumplen con los Estándares Nacionales para Servicios de Transfusión y Bancos de Sangre de Venezuela. Sin embargo, el recuento de plaquetas fue menor del rango establecido ($\geq 5,5 \cdot 10^{10}$); por lo que se procedió a realizar algunos cambios en el tiempo y velocidad de centrifugación, y se estandarizó los procedimientos operativos (Reina & Moreno, 2011).

La Revista *Blood Transfusion*, en julio del 2013 presentó un estudio en el que se investiga los efectos que ocasionan la interrupción de la agitación de los CPQs durante 6 horas vs los concentrados plaquetarios con agitación continua almacenados por 48 horas. Se evaluaron las siguientes variables: swirling, pH, agregación plaquetaria, concentración de LDH, el Factor 4 (PF4) y la expresión de marcadores de activación como el P-selectin. Se concluyó que no existen diferencias estadísticamente significativas en las variables medidas como el pH y LDH, a excepción de una diferencia en el Factor 4 y en la expresión de P-selectin (Naghadeh, Badlou, Ferizhandy, Mohammadreza, & Shahram, 2013). Otro estudio realizado un año después con 24 horas de interrupción de agitación y comparado con grupo control de 72 horas de almacenamiento con agitación, corroboran que no hay diferencias significativas de las variables medidas (Naghadeh & Farhad, 2014).

En marzo del 2015, un estudio publicado por la revista *Transfusion Medicine*, evaluó la calidad de los concentrados plaquetarios almacenados por 7 días, comparando los preparados por aféresis y por múltiples donadores. Los parámetros medidos en el día 1, 3, 5 y 7, fueron: la agregación, conteo plaquetario y pH. Los resultados mostraron que existe una disminución en el conteo de plaquetas al séptimo día, sin embargo, los componentes preparados por aféresis conservan mayor cantidad de plaquetas; además se mostró que la agregación plaquetaria disminuyó después del tercer día de almacenamiento en los dos métodos y el único parámetro que se conservó dentro de los rangos establecidos fue el pH. Además este estudio cita que en Estados Unidos el uso de concentrados plaquetarios se limita a 5 días de su obtención, por posible contaminación bacteriana (Hussein, 2015); pero en otros países, el tiempo de almacenamiento de las plaquetas puede extenderse hasta los 7 días (Thomas, 2016), después de un cultivo microbiológico, esto debido a que la demanda de transfusiones excede a la oferta de donantes, y por una economía restringida como sucede en Egipto, lo cual resulta potencialmente beneficioso. (Hussein, 2015).

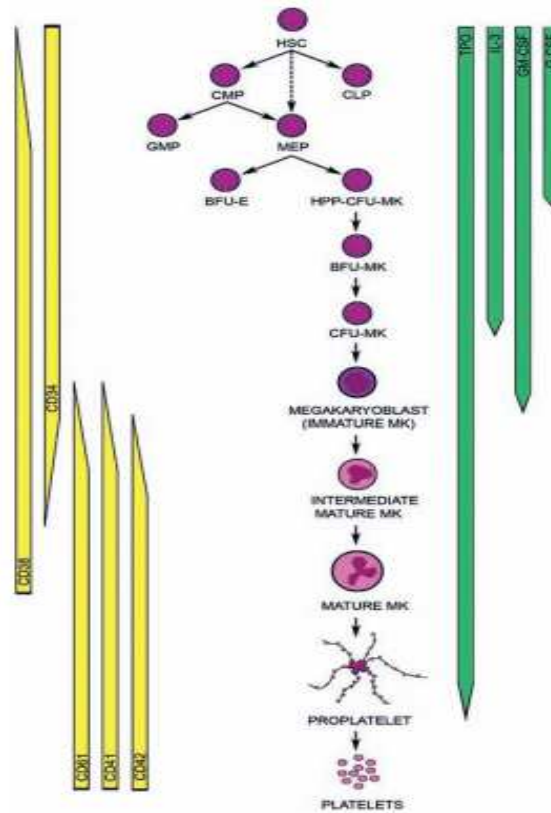
Es así, que a raíz de estos estudios se ve la necesidad de evaluar la viabilidad de los concentrados plaquetarios hasta los siete días de almacenamiento, ya que nuestro país presenta limitaciones económicas en el área de salud y no existe un gran número de donantes voluntarios que cubran la demanda de transfusiones.

2.2.MARCO TEÓRICO

2.2.1. Producción de plaquetas

La megacariopoyesis es el proceso de diferenciación de la serie megacariocítica-plaquetaria (González & cols, 2010), este mecanismo se origina en la médula ósea a partir de una célula hematopoyética pluripotente (HSC), la cual da lugar a dos linajes celulares: el progenitor linfoide común (CLP) y el progenitor mieloide común (CMP). El CLP origina los linfocitos (NK, T y células B) y el CMP produce tanto al progenitor granulocito / macrófago (GMP) y al progenitor megacariocito / eritroide (MEP) (Szalai, LaRue, & Watson, 2006). Sin embargo, como se muestra en la Figura N°1, nuevas investigaciones sugieren que el MEP puede formarse directamente de la célula hematopoyética pluripotente (HSC), sin necesidad del intermediario (CMP) (Szalai et al., 2006).

Figura N°1. Megacariopoyesis



Autor: Szalai, G

Fuente: Molecular mechanisms of megakaryopoiesis

La diferenciación de progenitores a células precursoras depende de la activación de genes específicos para cada linaje celular, así como de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas. Los factores de transcripción PU1, GATA 1, GATA 2 y FOG son importantes para la maduración y diferenciación eritroide y megacariocítica (González & cols, 2010).

La célula progenitora megacariocítica / eritroide (MEP) da lugar a la unidad formadora de colonias de megacariocitos o CFU-Meg, éste representa el primer progenitor específico de la línea megacariocítica (González & cols, 2010). A partir de este se forma un progenitor megacariocítico más diferenciado, la unidad formadora de brotes megacariocíticas o BFU-Meg, el cual puede ser identificado por un fenotipo de superficie distintivo (Szalai et al., 2006). Los marcadores de las CFU-Meg y BFU-Meg que indican que ya se diferenció a

línea megacariocítica son CD34, CD33 y CD41, el más importante es el CD41 (glicoproteína IIb), un marcador específico de este linaje (González & cols, 2010).

2.2.2. Características de las plaquetas

Las plaquetas o trombocitos no son estrictamente células, son fragmentos citoplasmáticos de forma discoidal. Son anucleadas, es decir, carentes de núcleo, por lo tanto no tienen capacidad de reproducirse ni de sintetizar nuevas proteínas (Ruiz, 2006). El diámetro de una plaqueta madura oscila entre 2-3 μm , con un volumen medio de 7–11 fL y presentan un tiempo de vida de 5-9 días en sangre periférica. Aproximadamente 2/3 de las plaquetas circulan en la sangre y 1/3 se almacenan en el bazo, una vez que las plaquetas cumplen su ciclo son fagocitadas en el bazo e hígado (Ghoshal & Bhattacharyya, 2014).

El recuento normal de plaquetas es de $(150-400) \times 10^3$ por microlitro de sangre. Cada megacariocito puede producir 5000-10000 plaquetas y un adulto sano produce cada día una media de alrededor de 1×10^{11} plaquetas (Ghoshal & Bhattacharyya, 2014).

En condiciones fisiológicas, las plaquetas circulan en forma inactiva y expresan en su superficie un número pequeño de muchas moléculas (López & Macaya, 2013). Cuando existe una lesión en el endotelio vascular, las plaquetas sufren cambios en su morfología y bioquímica, activándose (Gal, López, Martín, & Prieto, 2013). Una vez activadas, las plaquetas se adhieren a la superficie lesionada, interactúan con otras plaquetas y se acumulan en el endotelio disfuncional, formando el denominado trombo blanco o plaquetario con el fin de prevenir la pérdida de sangre (Ruiz, 2006).

2.2.3. Principales receptores de la membrana plaquetaria

Las plaquetas presentan receptores en su membrana, que son glicoproteínas y permiten que las plaquetas interactúen tanto con la pared del endotelio vascular, como con otras plaquetas y leucocitos, en la Tabla N°1 se presenta las principales glicoproteínas:

Tabla N° 1. Receptores de la superficie plaquetaria

Glicoproteínas	Ligando	Función plaquetaria
GP IIb/IIIa	Fibrinógeno, FVW, fibronectina, vitronectina y trombospondina	Agregación
GP Ia/IIa	Colágeno	Adhesión: interactúa con el colágeno de la matriz subendotelial
GP Ib/IX/V	Factor von Willebrand	Facilita la adhesión
GP VI	Colágeno	Adhesión y la secreción de sustancias procoagulantes y proinflamatorias
GP Ic/IIa	Fibronectina	Adhesión
PAR-1 y PAR-4	Trombina	Activación

Autor: Ruiz, E

Fuente: Antiagregantes plaquetarios

2.2.4. Hemostasia

La hemostasia es un proceso fisiológico que detiene la hemorragia en el sitio de una lesión, esto se logra mediante la formación de un tapón hemostático, compuesto principalmente de plaquetas y fibrina. Este proceso se realiza simultáneamente y está regulado por dos mecanismos. La hemostasia primaria se refiere a la activación y agregación de las plaquetas para formar el tapón plaquetario y la hemostasia secundaria se caracteriza por la activación de la cascada de la coagulación proteolítica con el objetivo de formar fibrina insoluble (Gale, 2011).

A) Hemostasia primaria

Normalmente, las plaquetas circulan sin adherirse a los vasos sanguíneos. Sin embargo, cuando existe alguna lesión en el endotelio vascular y se expresa colágeno en el subendotelio, se producen cambios en su morfología y bioquímica para activarse, con el único fin de formar el tapón plaquetario y cesar el sangrado (Flores, Meza, Nava, & Ramírez, 2014). En la hemostasia primaria existen varias fases que permiten producir este tapón (Figura N°2), tales como: 1) adhesión, 2) extensión y 3) agregación (Simon, Kunicki, & Nugent, 2008).

- **Adhesión**

Ante una lesión vascular, las plaquetas entran en contacto con el subendotelio y el tejido perivascular, este proceso inicial se conoce como adhesión (Flores et al., 2014). La primera proteína en interactuar es la GPIb/IX/V, expresada en la superficie plaquetaria, la cual se unirá al dominio A1 del factor von Willebrand (vWF), secretado por las células endoteliales y los megacariocitos; a su vez el colágeno, presente en la matriz subendotelial se adherirá al receptor GPVI de las plaquetas. La GPVI y la GPIb-IX-V son críticas para la adhesión de las plaquetas a la matriz subendotelial en el sitio de la lesión y para su activación posterior (Simon et al., 2008).

Existe un enfermedad genética de herencia autosómica recesiva, denominada Síndrome de Bernard Soulier (SBS), ésta se caracteriza por la ausencia del complejo GPIb/IX, este defecto impide la unión al vWF, como consecuencia las plaquetas no se pueden adherir a la lesión endotelial y se altera la hemostasia primaria (Simon et al., 2008).

- **Extensión**

Durante esta fase, las plaquetas adherentes se activan y secretan los compuestos almacenados en sus gránulos alfa y gránulos densos (Simon et al., 2008).

Existen varios estímulos para la activación plaquetaria como son la trombina, serotonina, ADP, colágeno, etc.; muchos de estos estímulos actúan a través de una vía común, el de la Fosfolipasa C. Esta vía se caracteriza por la unión de los agonistas liberados por las propias plaquetas activadas a los receptores acoplados a la proteína G, lo que estimula al sistema enzimático de Fosfolipasa C a generar dos mensajeros: el Trifosfato Inositol (IP3) y el Diacilglicerol (DAG), cuyas funciones son movilizar el calcio de las membranas del sistema tubular denso hacia el citoplasma, aumentando su concentración, y activar a la Proteinkinasa (PK-C), respectivamente (Ruiz, 2006).

Una vez que la plaqueta se ha activado, suceden varios fenómenos:

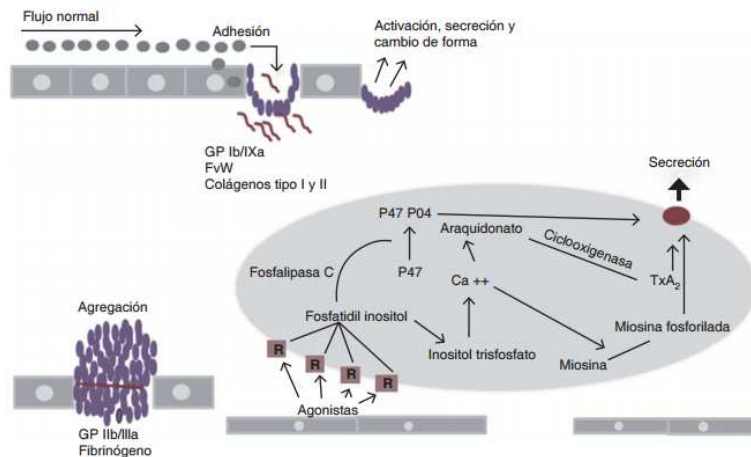
- ✓ Contracción de plaquetas: el incremento de Calcio citosólico en presencia de calmodulina, activa la quinasa de la miosina, fosforilándola, ésta es la única forma en que se puede unir a la actina, lo que se denomina actomiosina plaquetaria o “Trombostenina”. Esta unión permite que la plaqueta se contraiga y cambie de forma discoidea (plaqueta inactiva) a una con presencia de protrusiones citoplasmáticas o pseudópodos (plaqueta activa) (Ruiz, 2006).

- ✓ Mediante la sinergia entre el Calcio y la Proteinkinasa C (PK-C), se produce la liberación del contenido de los gránulos plaquetarios. Los gránulos densos presentan Adenosín Difosfato (ADP), que ejerce un efecto de activación de otras plaquetas promoviendo el reclutamiento; además, estimula a que el calcio facilite la activación de los receptores de fibrinógeno (GP IIb/IIIa), lo que conduce a la agregación plaquetaria (Gale, 2011).
- ✓ La activación de la Fosfolipasa A2 de la membrana, promueve la cascada del ácido araquidónico, que mediante la ciclooxigenasa se forma Tromboxano A2 (TX A2), el cual es un potente inductor de la agregación plaquetaria y la vasoconstricción (Ruiz, 2006).

- **Agregación**

La agregación plaquetaria comprende una de las últimas etapas, involucrando en mayor medida al receptor plaquetario GPIIb/IIIa, la activación de este receptor, pretende realizar un cambio conformacional del mismo, para así presentar un dominio RGD, el cual va a permitir que el fibrinógeno se una a la plaqueta; además GPIIb/IIIa al ser una proteína dimérica va a permitir la interacción de dos plaquetas simultáneamente, dándose así la agregación (Moliner & Marco, 2013).

Figura N°2. Fases de la respuesta plaquetaria posterior a la lesión vascular



Autores: Flores, Meza, Nava, & Ramírez

Fuente: Fisiología de la coagulación

B) Hemostasia secundaria

La hemostasia secundaria consiste en la generación de la cascada de la coagulación de serín proteasas, que termina con la escisión de fibrinógeno soluble en fibrina insoluble mediante la trombina. La fibrina forma una malla reticulada en el sitio de lesión, la cual se produce simultáneamente a la agregación plaquetaria. Es importante mencionar que en condiciones fisiológicas, esta cascada no se activa y existen varios anticoagulantes que previenen su activación, tales como la trombomodulina y heparán sulfato (Gale, 2011).

2.2.5. Concentrados plaquetarios (CPQ)

En medicina transfusional se utiliza los concentrados plaquetarios, como primera terapia en pacientes trombocitopénicos, dado que permite la infusión de grandes cantidades de plaquetas en pequeños volúmenes de fluido; La principal función de los concentrados plaquetarios es regular la hemostasia primaria, recuperando la adhesión, agregación, secreción plaquetaria y retracción del coágulo en el receptor (Dantas et al., 2011).

2.2.6. Preparación de los concentrados plaquetarios a partir de buffy coat

En este procedimiento se realizan dos fases, en la primera fase se realiza una centrifugación pesada, para la separación de tres capas: en el sobrenadante el plasma exento de células, la capa intermedia es leucoplaquetaria (Buffy-Coat), y hematíes en la capa inferior. Para el fraccionamiento de estas capas se utiliza un equipo automatizado obteniendo el plasma en la bolsa superior satélite y el concentrado de hematíes en la bolsa inferior satélite. (Fundación Hemominas, 2016)

En la segunda etapa la bolsa matriz de Buffy-Coat debe permanecer en reposo durante 3 horas, para realizar una centrifugación leve, obteniendo así el concentrado plaquetario del Buffy-Coat. Para la obtención de un pool de Buffy-Coat se realizará la unión de 4 o 5 unidades por conexión estéril, en el pool se obtendrán los CPQs de un número superior a $2,2 \cdot 10^{11}$ (pool de 4) y de $2,8 \cdot 10^{11}$ (pool de 5), con un volumen de 160-280mL (pool de 4) y de 200-350mL (pool de 5) (Fundación Hemominas, 2016)

2.2.7. Anticoagulantes

Los tipos de anticoagulantes utilizados pueden ser: ACD (ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa), CPD (citrato de sodio, fosfato de sodio y dextrosa) y CPDA-1 (citrato de sodio, fosfato de sodio, dextrosa y adenina) (AABB, 2012).

Para plaquetoféresis se utiliza ACD y para la extracción de sangre total humana se utiliza CPD o CPDA-1, estas soluciones se encuentran en la bolsa primaria que es la que recibe la sangre del humano antes de ser fraccionada en sus diferentes componentes. (Fundación Hemominas, 2016). Estas soluciones mantienen la viabilidad de los hematíes y evitan la formación de coágulos al inhibir cationes divalentes de Ca^{2+} , ya que, para la activación de las plaquetas se requiere, en primer lugar, que aumente la concentración de Ca^{2+} de sus depósitos intracelulares y para la degranulación se requiere altas concentraciones de Ca^{2+} extracelular, por lo tanto al ser inhibidos los cationes de Ca^{2+} se evitará la agregación plaquetaria en el componente sanguíneo.

Otros factores que evitan que la plaqueta se agregue, son el pH del anticoagulante y la temperatura en la que se va a almacenar el componente sanguíneo (Carmona, Ríos, Vilar, Giraldo, & López, 2014).

2.2.8. Almacenamiento de CPQ

El almacenamiento de los CPQ obtenidos por Buffy-Coat y por aféresis es de 20-24 °C en agitación continua, un máximo de 5 días, de acuerdo al tipo de anticoagulante utilizado y sin agitación un máximo de 6 horas (Ravindra, Nealman, Pankaj, & Sumitra, 2009). El límite de tiempo está definido por el riesgo de contaminación bacteriana y por la pérdida de funcionalidad plaquetaria, por lo que mantener las condiciones óptimas de almacenamiento es esencial (American Association of Blood Banks, 2012).

2.2.9. Lesión por almacenamiento

La lesión por almacenamiento de las plaquetas se define como los cambios globales generados desde la extracción hasta la trasfusión de concentrados plaquetarios, se establece que es un proceso multifactorial y no se conoce claramente, sin embargo, se atribuye a los

métodos de obtención, almacenamiento y manipulación de componentes (Kshitija & Ravneet, 2015). Estas lesiones resultan en la pérdida de función de las plaquetas, posibilidad de crecimiento bacteriano, transformación de morfología de discoidales a esféricas, producción de lactato a partir de la glicólisis y disminución de pH, activación de plaquetas y liberación de contenido citoplasmático, además, se relacionan con una reducción *in vivo* en la recuperación de plaquetas y sobrevivencia en el receptor (Kshitija & Ravneet, 2015) (Plaza et al., 2012) (AABB, 2012).

Se han reconocido varias pruebas *in vitro* que evalúan diferentes aspectos de la fisiología de las plaquetas, y proporcionan información acerca de la calidad de las plaquetas. Todas las pruebas se deben hacer en conjunto, dado que no existe una sola prueba que se correlacione con la actividad hemostática *in vivo*; entre los ensayos figuran el recuento celular, swirling, pruebas metabólicas como pH y lactato. Además, el número de plaquetas activas ha sido recomendado como un buen predictor de la calidad de las plaquetas (Plaza et al., 2012). Por lo que los concentrados plaquetarios necesitan un control periódico para evaluar la viabilidad y funcionalidad de las plaquetas en cada componente.

2.2.10. Transporte de concentrados plaquetarios

El transporte de todos los hemocomponentes debe realizarse bajo condiciones controladas de temperatura. Los concentrados plaquetarios deben ser transportados a una temperatura máxima de 24°C y temperatura mínima de 20°C. El mantenimiento de la temperatura de transporte es esencial para conservar la viabilidad de las plaquetas y asegurar la terapia transfusional; si al momento del transporte el concentrado plaquetario sobrepasa el límite máximo de temperatura puede desencadenar el cambio del pH y la proliferación bacteriana; por el contrario si la temperatura disminuye del límite mínimo aceptable, puede darse la agregación plaquetaria (Quinteros, Atea, & Ruiz, 2014).

2.2.11. Viabilidad de los concentrados plaquetarios

Es importante confirmar que los concentrados plaquetarios cumplan con los requerimientos definidos por estándares nacionales e internacionales, de tal forma que los elegidos para ser trasfundidos sean de buena calidad, Tynngård (como se citó en Mokhtar, 2016).

Es importante que los concentrados plaquetarios sean viables y funcionales, ya que de esto depende la recuperación y supervivencia de las plaquetas después de la transfusión.

Para que los concentrados plaquetarios cumplan con las condiciones de viabilidad y funcionalidad es importante evaluar los diferentes parámetros de control de calidad y medir la activación plaquetaria, una forma certera es evaluando marcadores de superficie, como el marcador P-selectin CD62 (Torres, Benito, & Gayá, 2007).

2.2.12. Control de calidad de los concentrados plaquetarios

Para el control la calidad de los concentrados de plaqueta, se miden diferentes parámetros (Ravindra, Nealman, Pankaj, & Sumitra, 2009) como:

A) Presencia de Swirling

Este parámetro describe visualmente la forma discoidea de la plaqueta, esto se observa cuando el CPQ es agitado en contra de la luz y las plaquetas tienen la capacidad de refractar la luz de forma heterogénea, mientras mayor número de plaquetas conserven su forma discoidea mayor intensidad del swirling es observado; a pesar de que es considerado un método de medición subjetivo es sencillo y económico (Fundación Hemominas, 2016), además que presenta gran utilidad cuando se realiza un correcto entrenamiento y validación intraoperador. A su vez, como lo afirma *Bashir y Chandra* en 2014, el swirling es una buena prueba para la determinación del cambio de forma y su ausencia puede ser indicativo de una disminución en la recuperación postransfusional (Bashir, Mohsin, & Amin, 2014), (Chandra & Gupta, 2014).

B) Contaje plaquetario óptimo

De cada unidad de sangre total donada se puede obtener un concentrado plaquetario. El número de plaquetas por unidad varía, pero se recomienda que contenga $>6 \times 10^{10}$ células, en un volumen de 50-70 mL. La dosis adecuada de transfusión de concentrados plaquetarios procedentes de unidades de sangre total estándar en un adulto es de una unidad por cada kilogramo de peso, con un promedio de 6 a 10 unidades. La transfusión de

componentes plaquetarios tiene el propósito de corregir o prevenir la hemorragia asociado a alteraciones cuantitativas o funcionales de las plaquetas (Carrillo & Garnica, 2011).

C) Contaje de leucocitos y eritrocitos residuales

Se ha establecido que en cada concentrado plaquetario debe existir un recuento de leucocitos $<0.12 \cdot 10^9$ /Unidad y recuento de eritrocitos $<1.2 \cdot 10^9$ /Unidad (AABB, 2012). Estudios indican que los glóbulos blancos poseen un efecto perjudicial durante el almacenamiento de los concentrados plaquetarios, lo que resulta en una disminución significativa en el pH, aumento en el consumo de glucosa, producción de ácido láctico y liberación de LDH (Ravindra, Nealman, Pankaj, & Sumitra, 2009). En cuanto a los glóbulos rojos residuales en los preparados plaquetarios al poseer un grupo sanguíneo, pueden desarrollar en el receptor anticuerpos anti-D hasta en un 6% de casos. (Rubio-García, 2013).

D) Cambios de pH

El pH de los concentrados plaquetarios debe estar entre 6.4-7.4 (Organización Panamericana de la Salud OPS, 2012), siendo un buen marcador para la viabilidad de los concentrados plaquetarios, ya que niveles inferiores determinan si existe contaminación bacteriana o bien si hay un exceso de glucólisis de las plaquetas Tynngård (como se citó en Mokhtar, 2016).

E) Cultivo microbiológico

Al momento de la extracción de sangre total o mediante plaquetoféresis, la contaminación bacteriana puede provenir de la microbiota normal o de una bacteremia asintomática del donador. El microorganismo aerobio más frecuente aislado en concentrados plaquetarios es *Staphylococcus epidermidis* (Kou, Y., y otros, 2015), seguido de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*, en esta etapa la contaminación es relativamente baja de 1 a 10 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), sin embargo, al momento del fraccionamiento y almacenamiento se requiere de una temperatura de 20-24°C, esto incrementa el riesgo de desarrollo bacteriano, por lo que la bacteria puede proliferar hasta alcanzar niveles de 10^6 UFC/mL o mayor (Instituto Nacional de Salud de Colombia, 2011).

F) Medición de marcadores de la activación plaquetaria

Para evaluar la activación plaquetaria se han desarrollado técnicas avanzadas como la detección de glicoproteínas de la membrana plaquetaria (Plaza et al., 2012), P-selectin o también llamado CD62P, marcador que se mide utilizando citometría de flujo (Middelburg et al., 2013).

- **Marcador P-Selectin CD62**

El CD62 es una glicoproteína que se encuentra en los gránulos alfa de las plaquetas en reposo, esta glicoproteína se va a expresar en la membrana segundos después de que las plaquetas se activan, por lo que será posible su medición al presentarle un anticuerpo monoclonal para P-selectin detectando las plaquetas degranuladas (activadas). La detección de P-selectin mediante citometría de flujo permite el control de la función plaquetaria. Es importante la medición de la cantidad de estas plaquetas activadas, ya que mientras más activas se presenten in vitro, al ser transfundidas tendrán una vida corta y no serán beneficiosas para el receptor (Nagy, Beke, & Kappelmayer, 2011).

- **Marcador CD41/CD61**

La membrana plaquetaria está compuesta por receptores transmembrana heterodiméricas (a/b), que sirven como mediadores de los efectos en la organización del citoesqueleto, la motilidad y supervivencia celular. La integrina IIb (itga2b, CD41, GPIIb) forma un heterodímero con la integrina b3 (itgb3, CD61, GPIIIa) y funciona como receptor de fibronectin, fibrinógeno y el Factor de Von Willebrand, por ello, el complejo CD41/CD61 es esencial para la función de agregación plaquetaria y la coagulación, y una mutación en cualquiera de las dos proteínas causa defecto en la función plaquetaria (Gekas & Graf, 2013) (Periyah et al., 2014).

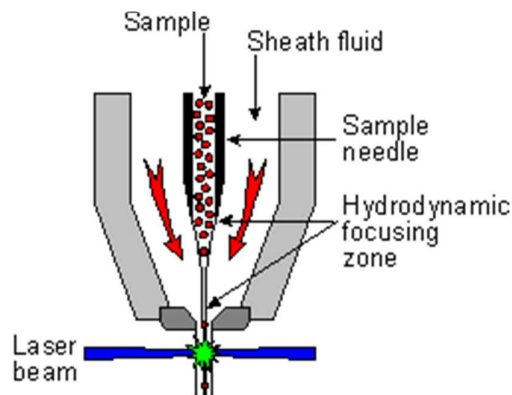
2.2.13. Mecanismo de funcionamiento de citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico, cuantitativo, rápido, que tiene la capacidad de medir diferentes parámetros celulares como: el tamaño, forma, complejidad o cualquier componente celular como: núcleos, cromosomas, superficies celulares, mitocondrias u otras partículas en suspensión que puedan ser marcados por un fluorocromo. Para que todo esto ocurra en primer lugar hay que preparar la muestra realizando la tinción de superficie celular, de inmunoglobulina o tinción intracelular (Leach, Drummond, & Doig, 2015). Una vez lista el citómetro utiliza tres componentes principales:

A) Sistema fluídico

El sistema fluídico se basa en una focalización hidrodinámica, que consiste en hacer pasar la suspensión de la muestra por una cámara de flujo que contiene un fluido más rápido denominado fluido envolvente: PBS (buffer fosfato salino). Las diferencias de presión, velocidad y densidad de ambos fluidos evitan que se mezclen y permiten que la solución con la muestra pase por el centro del fluido envolvente, forzando a las células a colocarse en una sola fila para atravesar el haz de láser (Figura N°3) (Leach, Drummond, & Doig, 2015).

Figura N°3. Sistema fluídico



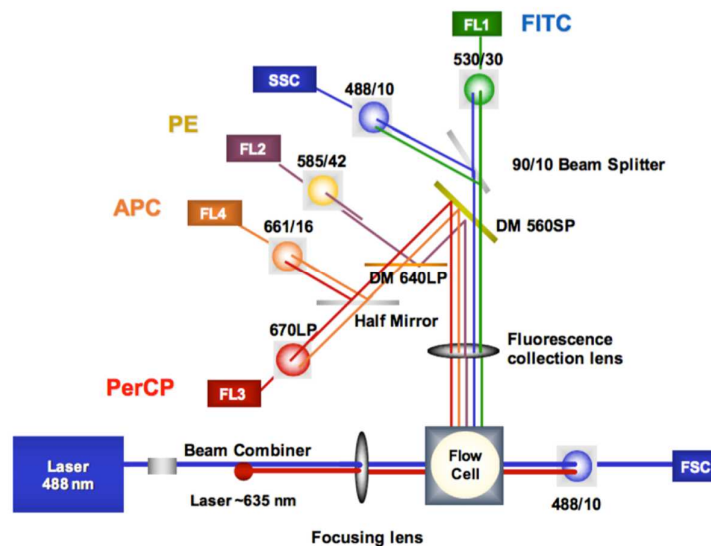
Autor: Leach, Drummond, & Doig, 2015

Fuente: Sistema fluídico

B) Sistema óptico

El sistema óptico está compuesto por el láser y diferentes lentes de enfoque y prismas y para la recolección de la óptica está compuesta por lentes, espejos y filtros que concentran la luz dispersa y la dirigen a sensores ópticos específicos (Figura N°4). (Leach, Drummond, & Doig, 2015) La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso (Barrera Ramírez et al., 2004).

Figura N°4. Sistema óptico



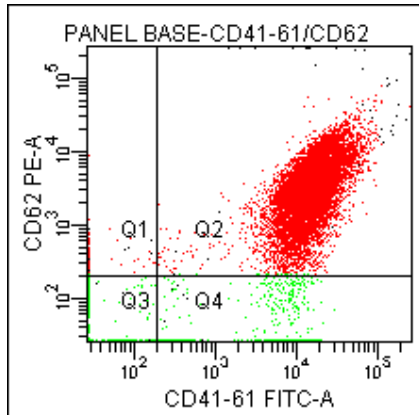
Autor: LABNALCIT

Fuente: ¿Qué es la Citometría de Flujo?

C) El sistema electrónico/computarizado

Este sistema se encarga de convertir las señales de luz en datos numéricos para ser analizados. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora. (Barrera Ramírez et al., 2004). La visualización de datos se realiza en histogramas o gráficos de puntos (Figura N°5) (Leach, Drummond, & Doig, 2015)

Figura N°5. Sistema electrónico



Autor: Katherine Jaramillo y Clarita Arroyo
Fuente: Base de datos_Citometría de flujo

2.2.14. Citometría de flujo y activación plaquetaria

Esta herramienta consiste en el marcaje con anticuerpos específicos a moléculas de superficie como CD61 y CD41, los cuales permiten definir la población plaquetaria y CD62 (P-selectin), siendo el marcador que determina la activación plaquetaria. Para la lectura en el citómetro de flujo es necesario utilizar una señal de amplificación logarítmica, por el tamaño y granularidad de las plaquetas, una vez definida la población gracias al marcador CD61/CD41, se puede evaluar la activación plaquetaria (Torres, Benito, & Gayá, 2007).

2.3. MARCO CONCEPTUAL

SANGRE TOTAL: Es la bolsa de recolección que contiene todos los elementos de la sangre junto con el anticoagulante conservante, utilizada como fuente para preparar componentes sanguíneos (American Association of Blood Banks, 2012).

CONCENTRADOS PLAQUETARIOS: son unidades que se obtienen a partir de sangre total, en las 4 horas siguientes a la extracción o dentro del tiempo estipulado en las recomendaciones para el uso de sistemas de obtención, preparación y almacenamiento de sangre (American Association of Blood Banks, 2012).

VIABILIDAD DE CONCENTRADOS PLAQUETARIOS: Es el término utilizado para determinar si el concentrado plaquetario cumple los parámetros de calidad, funcionalidad in vitro, eficacia y seguridad, para que estos puedan ser transfundidos (Lozano, Rivera, & Vicente, 2012) .

SWIRLING: término que se utiliza para describir visualmente la forma discoidea de la plaqueta, esto se observa cuando el CPQ es agitado en contra de la luz y las plaquetas tienen la capacidad de refractar la luz de forma heterogénea (Fundación Hemominas, 2016).

pH: medida cuantitativa de la acidez o basicidad de soluciones líquidas. Se determina por la cantidad de iones de hidrógeno (H^+) presentes en el medio, que normalmente oscila entre 1 y 10^{-14} equivalentes-gramo por litro o en números entre 0 y 14. En agua pura, el pH es neutro, la concentración del ion hidrógeno es 10^{-7} equivalentes-gramo por litro, lo que corresponde a un pH de 7. Una solución con un pH menor que 7 se considera ácida; una solución con un pH mayor que 7 se considera básica, o alcalina (Editores de la Enciclopedia Británica, 2016).

CONTAMINACIÓN BACTERIANA: Es el crecimiento de bacterias Gram positivas o Gram negativas en los concentrados plaquetarios, en cualquier etapa de su almacenamiento (Rivera, Fernández, Montes, Villegas, & Islas, 2011).

CD62 (P-SELECTIN): es una de las proteínas más abundantes en los gránulos α de las plaquetas, la cual se expresa en la superficie plaquetaria segundos después de la activación (Nagy, Debreceeni, & Kappelmayer, 2011).

CD41-CD61: Es la glicoproteína más abundante de la membrana plaquetaria, la cual está compuesta por dos unidades IIb (CD41) y el IIIa (CD61), actúa como receptor plaquetario en el proceso de la agregación (Moliner & Marco, 2013).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1.DISEÑO DE ESTUDIO

Es un estudio descriptivo transversal, llevado a cabo en un período determinado de tiempo y sin modificar variables, únicamente se dio seguimiento a los parámetros de calidad, realizado en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana en el período de Noviembre a Marzo del año 2016 al 2017.

3.2.MUESTRA Y TAMAÑO MUESTRAL

Tipo de muestreo: Se empleó un muestreo aleatorio simple, evaluando los concentrados plaquetarios al tercer, quinto y séptimo día de su obtención.

Tamaño muestral: Para calcular el tamaño muestral se basó en los lineamientos de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB), la cual establece que: para un control de calidad efectivo se debe elegir el 1% del total de hemocomponentes producidos mensualmente; por lo que se tomó en cuenta el promedio del tamaño de la población de los concentrados plaquetarios obtenidos en los últimos cuatro meses, es decir de julio a octubre, en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana, siendo:

Meses 2016	Producción
Julio	3220
Agosto	3449
Septiembre	2985
Octubre	2984

Calculamos que el promedio mensual es de $\bar{x} = \frac{12638}{4} = 3159,5$

Y el 1% de la población en un mes es $31,59 \cong 32$

El tiempo en que se desarrolló la parte práctica fue de acuerdo a los lineamientos del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana, siendo dos meses elegidos al azar, por lo que se evaluaron un total de 64 CPQs.

Se obtuvo así un tamaño muestral de 64 CPQs, los cuales fueron evaluados al tercer, quinto y séptimo día de almacenamiento, analizando en total 192 muestras, de las cuales se midieron 7 parámetros de estudio a cada una.

3.3. SELECCIÓN DE LA MUESTRA

3.3.1. Criterios de inclusión

Todos los componentes plaquetarios obtenidos del fraccionamiento rutinario de unidades de sangre total del Hemocentro.

3.3.2. Criterios de exclusión

Concentrados plaquetarios obtenidos por aféresis.

3.4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.4.1. Variable dependiente

Viabilidad de los concentrados plaquetarios en los diferentes días de almacenamiento.

3.4.2. Variable independiente

Contaje celular (Contaje plaquetario, Contaje de leucocitos y eritrocitos residuales), aspectos físicos (swirling, agregados, sueldas, color, burbujas y lipemia), volumen, pH, temperatura de almacenamiento, contaminación bacteriana, activación plaquetaria (Marcador CD62 P-selectin, Marcador CD41/CD61).

Tabla N° 2. Operacionalización de las variables

OBJETIVO GENERAL	Evaluar los parámetros que determinan la viabilidad de los concentrados plaquetarios en sus diferentes etapas de almacenamiento en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana en el período de noviembre a marzo del año 2016 al 2017.				
VARIABLES DEPENDIENTES	DEFINICIÓN	DIMENSIONES	VALORES DE REFERENCIA	ESCALA	INSTRUMENTOS DE MEDIDA
Viabilidad de concentrados plaquetarios	Son concentrados plaquetarios que cumplen con los requerimientos definidos por estándares nacionales e internacionales.	Cualitativo	Total de concentrados plaquetarios viables	Nominal	Informe de parámetros cumplidos
VARIABLES INDEPENDIENTES	DEFINICIÓN	DIMENSIONES	VALORES DE REFERENCIA	ESCALA	INSTRUMENTOS DE MEDIDA
Swirling	Describe visualmente la forma discoidea, al observar a través de la luz la refractariedad plaquetaria.	Cualitativo	0 = Sin swirling (+) = pobre (++) = buena (+++)= excelente	Nominal	Examen visual
Agregados	Son masas de plaquetas con color blanco u opaco, que no se disipan con la agitación.	Cualitativo	Ausencia Escaso (+) = poco (++) = intermedio (+++)= Exceso	Nominal	Examen visual
Burbujas	Describe visualmente la presencia de aire en las bolsas	Cualitativo	Ausencia Presencia	Nominal	Examen visual
Sueldas	Describe visualmente el estado de las selladuras por calentamiento realizadas en la tirilla.	Cualitativo	Sí=Estado óptimo No= Roturas	Nominal	Examen visual

Color	Describe la tonalidad del concentrado	Cualitativo	Amarillo Verde, rojo, café	Nominal	Examen visual
Contaje plaquetario	Número de plaquetas por unidad de concentrados plaquetarios	Cuantitativo	$>5,5 \cdot 10^{10}$ /Unidad	Continua	Analizador hematológico Sysmex XT 1800i
Contaje de leucocitos residuales	Cantidad de glóbulos blancos presentes en el concentrado plaquetario	Cuantitativo	$<0.12 \cdot 10^9$ /Unidad	Continua	Analizador hematológico Sysmex XT 1800i
Contaje de eritrocitos residuales	Cantidad de eritrocitos presentes en el concentrado plaquetario	Cuantitativo	$<1.2 \cdot 10^9$ /Unidad	Continua	Analizador hematológico Sysmex XT 1800i
Volumen	Volumen total de plasma rico en plaquetas después de la separación de una unidad de sangre total	Cuantitativo	40 - 70 mL	Discreta	Balanza
pH	Cantidad de iones de hidrógeno (H ⁺) presente en el medio	Cuantitativo	$\geq 6,2$	Continua	pHmetro 213 Marca: HANNA
Temperatura de almacenamiento	Grado o nivel térmico del ambiente	Cuantitativo	22 - 24°C	Continua	Termómetro de cámara de almacenamiento de CPQs
Contaminación bacteriana	Crecimiento de bacterias Gram positivas o Gram negativas en los concentrados plaquetarios	Cualitativo	Si= Positivo No= Negativo	Nominal	Cultivo microbiológico manual en Agar
Marcador P-selectin CD62.	Proteína ubicada en la membrana de las plaquetas activadas	Cualitativo	Óptimo:20-30% Regular: 31-50% Malo: $>51\%$	Nominal	Citómetro de Flujo FACS Canto II
Marcador CD41/CD61	Complejo de membrana que sirve como receptor en la agregación plaquetaria	Cualitativo	Presente o Ausente	Nominal	Citómetro de Flujo FACS Canto II

3.5. OBTENCIÓN DE INFORMACIÓN Y RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Autorización: se tramitó mediante oficio a las autoridades del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana y del Hospital Carlos Andrade Marín para la realización de este estudio, firmándose un convenio de investigación (Anexo N°1 y 2).

Obtención de muestras: se extrajo sangre al donante voluntario en un tubo con EDTA para determinar el conteo plaquetario pre-donación (Anexo N°3); seguidamente el personal del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana fraccionó la unidad de sangre total dentro de las 6 horas posteriores a la extracción, la unidad fue separada mediante centrifugación en sus diferentes componentes: concentrado eritrocitario, componente plasmático (plasma fresco congelado) y concentrados plaquetarios. Los concentrados plaquetarios, fueron ubicados en la cámara de almacenamiento (Serie: 977358) en constante agitación a una temperatura de 20-24°C.

Evaluación de parámetros físicos: en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana se evaluó el volumen, aspecto físico y temperatura de almacenamiento mediante el uso de equipos calibrados y certificados:

3.5.1. Medición del volumen

1. Obtener el concentrado plaquetario.
2. Se utilizó una balanza de precisión/Serie: 1126473252.
3. Programar la balanza para medidas de peso (gramos).
4. Encerar la balanza con una bolsa vacía igual a la del concentrado plaquetario a pesar.
5. Pesar el concentrado plaquetario.
6. Calcular el volumen utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Peso componente (g)} - \text{peso de la bolsa vacía(g)}}{\text{Densidad del componente } \left(\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right)} = \text{Volumen (mL)}$$

NOTA: La densidad de componentes con plasma es 1.026 g/mL.

(Fundación Hemominas, 2016)

7. Registrar el volumen de cada unidad en el (Anexo N°4).

3.5.2. Aspectos Físicos

1. Colocar la bolsa contra la luz de una lámpara de laboratorio.
2. Homogenizar la bolsa a través de movimientos leves.
3. Sostener la bolsa, de modo que esta quede entre la luz y el ojo del observador.
4. Hacer movimientos de la bolsa por inversión.
5. Observar la presencia de color, swirling, agregados, lipemia, burbujas, estado de sueldas, contaminación por hematíes u otra alteración visual.
6. Registrar en el (Anexo N°4).

3.5.3. Temperatura

1. Controlar los registros de temperatura del Hemocentro por la mañana y por la tarde.
2. Estas temperaturas serán las registradas por la cámara de almacenamiento de los concentrados plaquetarios (Serie: 977358).
3. Registrar en el (Anexo N°4).

3.5.4. Preparación de alícuotas

Posterior a la medición de los parámetros mencionados se prepararon alícuotas por sistema cerrado, mediante el siguiente procedimiento:

1. Los 64 concentrados plaquetarios utilizados, se fraccionaron en 2 bolsas de transferencia, mediante el equipo de conexión estéril GENESIS-TCD B40, recolectando una alícuota de 15mL en cada bolsa.
2. Se obtuvo así 2 bolsas de transferencia TERUFLEX, alicuotando aproximadamente 15mL cada una, para el análisis al tercer y quinto día respectivamente; y la bolsa matriz del concentrado plaquetario de aproximadamente 20mL para la medición al séptimo día de almacenamiento.
3. Todas las bolsas permanecieron en agitación constante y bajo las mismas condiciones de almacenamiento hasta el momento del análisis de los diferentes parámetros.

3.5.5. Transporte de muestras

Las muestras fueron transportadas al Hospital Carlos Andrade Marín siguiendo el protocolo de la Asociación Americana de Bancos de Sangre, tal como se indica a continuación:

1. Identificar las bolsas y la caja en la que serán transportados los CPQs.
2. Colocar las bolsas en la caja termoaislante.
3. Medir la temperatura de envío, con el termómetro digital (SN)
4. Cerrar adecuadamente la caja y transportar en menos de 4 horas.
5. Llenar el Registro de transporte de CPQs (Anexo N°5).

Realizar el análisis inmediatamente al ser extraídas de la caja termoaislante, controlando la temperatura de llegada (American Association of Blood Banks, 2012), (Quinteros, Atea, & Ruiz, 2014).

3.6. PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO

En el Hospital Carlos Andrade Marín se procedió a realizar el análisis del cultivo, pH, conteo celular y la activación plaquetaria. A continuación se describe el procedimiento de los parámetros que fueron medidos al tercer, quinto y séptimo día de su extracción:

3.6.1. Cultivo microbiológico

Los sistemas automatizados para la identificación microbiana poseen varias ventajas en relación a los métodos manuales, la principal es que mejoran la sensibilidad analítica de los métodos, además de disminuir el tiempo de respuesta (García & Castillo, 2012); sin embargo, no han logrado resolver toda la problemática que el estudio microbiológico plantea, debido a que lleva costos elevados en el sector de la salud, por lo que aún es necesario complementar su uso con pruebas manuales (Hervé, 2015). En este estudio se utilizó la técnica de cultivo manual.

A) Materiales, reactivos y equipo

- Alcohol
- Algodón

- Jeringuillas de 3mL
- Agar sangre, Becton Dickinson
- Agar EMB, Becton Dickinson
- Agar tioglicolato, Becton Dickinson
- Cajas petri
- Asa estéril de plástico
- Incubadora Precision Scientific PS

B) Procedimiento

1. Limpiar el área de trabajo
2. Con la ayuda de un algodón con alcohol, desinfectar el área de la manguera para realizar la punción.
3. Mediante una jeringuilla, extraer una alícuota de cada bolsa.
4. Realizar un inóculo en agar Sangre, EMB y tioglicolato.
5. Incubar por 48 horas.
6. Determinar la presencia o ausencia de la contaminación bacteriana en el CPQ.
7. Registrar en el (Anexo N°4).

3.6.2. Análisis de pH

A) Materiales, reactivos y equipo

- Gradilla y Tubos de vidrio de 10 mL
- Bolsa de la alícuota de los concentrados plaquetarios
- Agua destilada
- pHmetro 213 Marca: HANNA

B) Procedimiento

1. Encender el pH-metro.
2. Una vez pasado los controles, colocar aproximadamente 3 mL del CPQ en el tubo de vidrio.
3. Lavar cuidadosamente el electrodo con agua destilada.
4. Secar el electrodo con papel absorbente.
5. Introducir el electrodo del pH-metro en el tubo que contiene la muestra.
6. Esperar que se estabilice el pH.
7. Registrar la lectura del pH.

3.6.3. Contaje plaquetario, y contaje de eritrocitos y leucocitos residuales.

A) Materiales, reactivos y equipos

- Tubos de plástico sin anticoagulante con tapa
- Pipeta de volumen fijo (200uL) verificada.
- Diluyente cellpack
- Analizador hematológico SYSMEX XT1800i

B) Procedimiento

1. Identificar un tubo de plástico sin anticoagulante con el código de tesis.
2. Colocar una alícuota aproximada de 2 mL en el tubo.
3. Para la dilución de la muestra, pipetear 200uL de cellpack con 200uL del CPQ.
4. NOTA: En caso de que sobrepase los límites de detección del equipo realizar una dilución 1:3.
5. Ingresar el código del CPQ en el programa manual del analizador.
6. Homogenizar la muestra de 20 veces por inversión manual.
7. Determinar el contaje en el analizador automatizado de hematología SYSMEX XT1800i.
8. Realizar el cálculo de plaquetas, leucocitos y eritrocitos por bolsa, utilizando la siguiente fórmula:

Células/bolsa=células/ μ l * 1000 * volumen del hemocomponente.

9. Registrar el resultado en la (Anexo N°4).

3.6.4. Medición de la activación plaquetaria

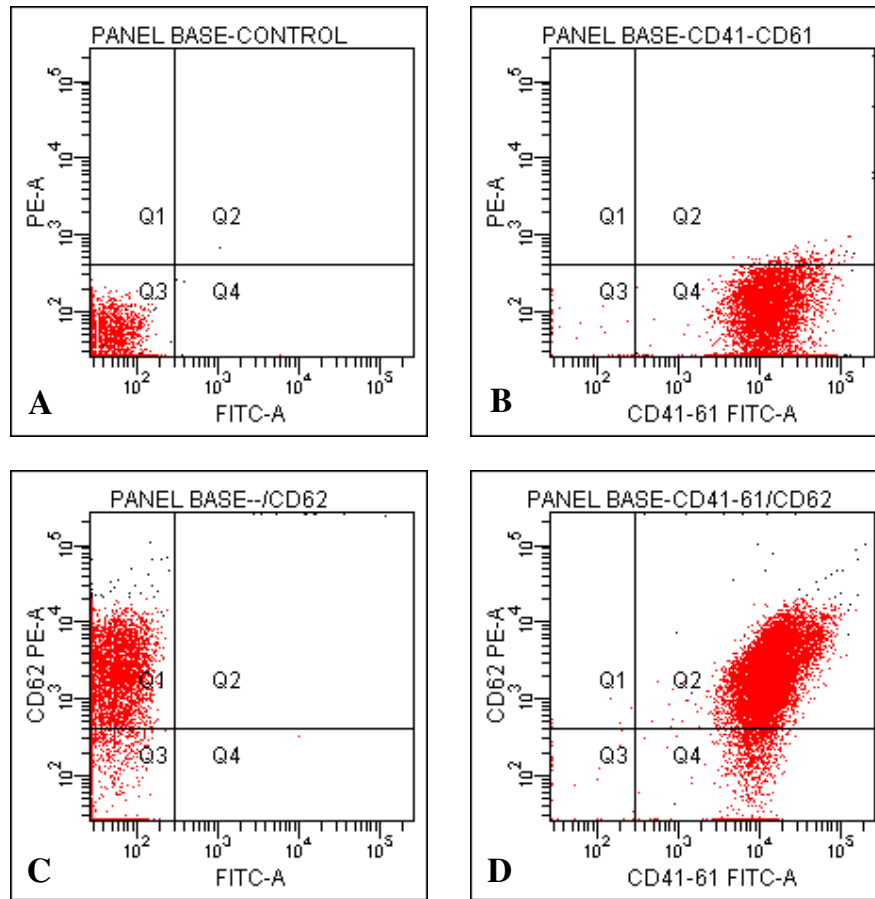
A) Materiales, reactivos y equipo

- Tubos Falcon para citometría, (BD Falcon, 5mL polystyrene round-bottom tube)
- Marcador FITC anti-Human CD41/CD61 / Lot no.5160916025 / Exp. date: 17/sep/ 2017
- Marcador PE anti-Human CD62 Lot no.5160916023 / Exp. date: 17/sep/ 2017
- Buffer
- Citómetro de Flujo FACS Canto II.

B) Estandarización de medición de P-Selectin en concentrados plaquetarios

1. Una vez determinado el conteo plaquetario, se verificó que este sea menor o igual a 10^7 células, en los casos que se obtuvo un conteo mayor, se diluyó la muestra utilizando 490uL de buffer y 10uL del concentrado plaquetario (la dilución depende del recuento de plaquetas que se obtiene).
2. Rotular tres tubos el primero con CD41-CD61, el segundo con CD62 y el tercero con CD41-CD61/CD62.
3. Agregar a cada tubo 100uL de la dilución y 5uL del anticuerpo correspondiente.
4. Incubar en la oscuridad durante 15min.
5. Agregar 200uL de buffer de dilución.
6. Iniciar la lectura en el citómetro de flujo FACS Canto II, con un tubo que no tiene marcaje de anticuerpos para fijar la población negativa. (Figura N°6.A)
7. Luego capturar un total de 10000 eventos que corresponden a CD41-CD61, correspondiente a plaquetas; así se selecciona la población de interés. (Figura N°6.B)
8. Posteriormente pasar el tubo marcado con CD62 para determinar la población que expresa P-selectin; con los dos tubos se define límites para la medición del tubo muestra. (Figura N°6.C)
9. Por último realizar la lectura de la muestra de interés, analizando la presencia de CD41-CD61 como de CD62 en un gráfico DopPlot (FiguraN°6.D).(Quintero, 2014)

Figura N°6. Estandarización de medición de P-Selectin en concentrados plaquetarios



Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo

Se determinaron las herramientas de voltaje y *threshold* con células sin marcaje (A), luego se selecciona la población de interés con células marcadas con CD41-CD61, el cual es específico para plaquetas (B), las plaquetas marcadas sólo con CD62 (P-selectin), sirven para determinar la población de plaquetas que están activadas (C), y por último, se analiza las plaquetas, marcadas con CD41-CD61 y CD62, para determinar el porcentaje de plaquetas activas en la población elegida (D).

A) Medición de P-Selectin

1. Determinar el conteo de plaquetas.
2. Centrifugar la suspensión celular a 300 G por 10min. Aspirar el sobrenadante completamente.
3. Resuspender hasta 10⁷ células por cada 100uL de buffer.

4. Añadir 5uL de CD62 y 5uL de CD41-CD61.
5. Mezclar bien y dejar en reposo dentro del refrigerador (2-8°C) durante 10 minutos en la oscuridad. NOTA: las temperaturas altas y/o tiempos de incubación más largos pueden llevar a uniones no específicas del marcador con la célula.
6. Lavar las células con 1-2mL de buffer.
7. Centrifugar a 300 G por 10 minutos.
8. Aspirar el sobrenadante por completo.
9. Resuspender el sedimento celular en una cantidad adecuada de tampón (2-4 mL) para el análisis por citometría de flujo.
10. Interpretar los resultados arrojados por el citómetro de flujo FACS Canto II.
11. Registrar el resultado en el (Anexo N°4). (Miltenyi Biotec, 2014)

3.7. CONTROL DE CALIDAD

3.7.1. Gestión de calidad de equipos

Los instrumentos, elementos de medición y sistemas de computación, son considerados equipos críticos, debido a que estos aseguran la calidad de la sangre y sus componentes; por lo que se debe realizar el control adecuado asegurando que estos equipos cumplan con la calificación, calibración, el mantenimiento y monitoreo (Tabla N° 3-4). La calibración, debe ser realizada según las recomendaciones del fabricante.

Tabla N° 3. Gestión de Calidad de Equipos e Instrumentos

Equipos e instrumentos	Serie	Ubicación	Control de calidad	Frecuencia	Responsable
Termómetro Datrón	1523-1846029	Área de almacenamiento de plaquetas	Calibrado: 29/04/2016	Anual	Laboratorio de calibración y ensayo Colmetrick acreditada bajo la Norma ISO/EC 17025:2005
Termómetro de aire acondicionado	90KAYR00002	Área de almacenamiento de plaquetas	Verificado: 07/11/2016	Semestral	Central de calidad de la Cruz Roja
Termómetro Digital FLUKE	3014875WS	Despacho de plaquetas	Calibrado: 15/11/2016	Semestral	Centro de Metrología del Ejército Ecuatoriano
Balanza de Precisión	D516202773	Área de Fraccionamiento de plaquetas	Mantenimiento preventivo: 13/02/2017. Verificado: 20/02/2017	Cuatrimestre	Central de calidad y Mantenimiento de la Cruz Roja
Cámara de agitación de concentrados plaquetarios	977358	Área de almacenamiento de plaquetas	Mantenimiento preventivo: 24/02/2017. Verificado: 01/03/2017	Semestral	Central de calidad y mantenimiento de la Cruz Roja
Centrífuga de fraccionamiento 9	23355	Área de Fraccionamiento de plaquetas	Mantenimiento preventivo: 07/03/2017. Verificado: 23/03/2017	Semestral	Central de calidad y mantenimiento de la Cruz Roja
pH metro 213Marca: HANNA	736769	Laboratorio de Patología-HCAM	Verificado: 23/01/2017	Semestral	Compañía Power Plus
Contador Hematológico Sysmex XT 1800i	70891	Laboratorio clínico HCAM	Verificación: 01/2017	Semestral	Control de Calidad del Laboratorio Clínico
Pipeta de Hematología SUMEDIX 200uL	HD401430	Área de Hematología de Laboratorio Clínico HCAM	Verificación: 16/09/2017	Semestral	Control de Calidad de Laboratorio Clínico

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

Tabla N° 4. Gestión de Calidad de Insumos y Reactivos

Insumos y Reactivos		Lote	Fecha de caducidad	Observaciones
Tubos BD Vacutainer K2 EDTA		367844	02-2018	Ninguna
Equipo de extracción- bolsa cuádruple	FENWALL	FM14H11038	02-2017	Ninguna
	TERUMO	(000)25F16X3	24-06-2019	Ninguna
Bolsa de Transferencia TERUFLEX		150115F4	12-2017	Sistema estéril óptimo
Marcador FITC anti-Human CD41/CD61		5160916025	17-09-2017	Almacenar en la oscuridad de 2-8°C
Marcador PE anti-Human CD62		5160916023	17-09-2017	Almacenar en la oscuridad de 2-8°C

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

3.7.2. Cultivo microbiológico

Se realizó el control de calidad de los medios de cultivo utilizados en el presente estudio, midiendo características físicas y el control de desempeño con cepas ATCC, según indicaba el fabricante (Tabla N° 5-6-7) (Anexo N°6).

A) Agar Sangre

Tabla N° 5. Control de Calidad del Agar Base Sangre

Parámetros	Aspectos Físicos del medio
Apariencia	Medio sólido de color rojo brillante envasado en placa Petri.
pH	6.98 – 7.3
Consistencia	La consistencia del medio debe ser ligeramente dura, para que permita la siembra de muestras sin romperse
Volumen del medio	23cc que resulta en una capa de 4-5mm de agar en placa Petri
Tesura	El medio debe ser completamente liso, no debe presentar rugosidad ni burbujas que dificulten la siembra.
Esterilidad	El medio antes de usarse debe encontrarse libre de cualquier crecimiento microbiano.

Adaptado de Cedeño, J
Fuente: Control de Calidad de Medios de Cultivo

B) E.M.B.

Tabla N° 6. Control de Calidad del Agar EMB

Parámetros	Aspectos Físicos del medio
Apariencia	Medio sólido de color café anaranjado, envasado en caja Petri
pH	6,0-7,0
Consistencia	La consistencia del medio debe ser ligeramente dura, para que permita la siembra de muestras sin romperse.
Volumen del medio Tesura	18cc que resulta en una capa de 4-5mm de agar en placa Petri. El medio debe ser completamente liso, no debe presentar rugosidad ni burbujas que dificulten la siembra.
Esterilidad	El medio antes de usarse debe encontrarse libre de cualquier crecimiento microbiano.

Adaptado de Cedeño, J

Fuente: Control de Calidad de Medios de Cultivo

C) Medio de cultivo caldo Tioglicolato

Tabla N° 7. Control de Calidad del medio de cultivo Tioglicolato

Parámetros	Aspectos Físicos del medio
Apariencia	Medio líquido de color ámbar pálido ligeramente opalescente.
pH	6,98-7,2
Consistencia	El medio debe ser límpido y puede presentar algunas partículas pequeñas en suspensión de color rojo oscuro, propio de la presencia de resazurina en el medio. La transparencia no es total debido a la presencia de agar.
Volumen del medio	5mL de caldo en tubo de ensayo
Características del tubo	Tubo de vidrio borosilicato 16*100mm (9mL) Sin aditivo, con tapa de polipropileno.
Cierre hermético del tubo	El tubo debe estar sellado con banda termoencogible y completamente cerrado.

Adaptado de Cedeño, J

Fuente: Control de Calidad de Medios de Cultivo

3.7.3. Medición del pH

Equipo: pHmetro 213 Marca: HANNA

Tabla N° 8. Control de Calidad de la medición del pH

Controles	pH	Desviación	Temperatura
Solución ácida	4,00	0,02	25°C
Solución neutra	7,00	0,02	25°C
Solución básica	10,00	0,02	25°C

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo

Fuente: Base de datos control de calidad

3.7.4. Contaje plaquetario, contaje de leucocitos y eritrocitos residuales

Equipo: SISMEX XT 1800i

Controles Internos:

Se utilizó tres niveles de control de calidad (alto, normal y bajo), según el manual del equipo Sysmex XT 1800i, los resultados de los parámetros de contaje celular se encontraron dentro del rango esperado.

Tabla N° 9. Control de Calidad de la Medición del Contaje Celular

Parámetros	Nivel 1		Nivel 2		Nivel 3	
	Media observada	Rango esperado	Media observada	Rango esperado	Media Observada	Rango esperado
Plaquetas($10^3/uL$)	64,059	41-65	226,941	201-245	504,471	465-545
Glóbulos Rojos ($10^4/uL$)	2,325	2.21-2.39	4,448	4.25-5.41	5,260	5.06-5.38
Glóbulos Blancos ($10^3/uL$)	3,035	2.66-3.38	7,028	6.12-7.34	17,535	16.64-19.66

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo

Fuente: Base de datos control de calidad

3.7.5. Citometría de flujo FACS Canto II

A) El desempeño del equipo

Es evaluado cada mes, última fecha: 28/11/2016

Reporte del último control realizado en el equipo FACS Canto II, únicamente de los canales de detección que se usó en esta investigación.

Tabla N° 10. Evaluación del desempeño del Citómetro de Flujo FACS Canto II

Laser	Detector	Parameter	Target Value	Actual Target Value	% Difference Target Value	Bright Bead % Robust CV	Mid Bead Median Channel	Mid Bead % Robust CV
Blue	E	FITC	25916	25126	-4	2,78	1224	10,01
Blue	D	PE	32539	32119	-2	2,25	1278	8,32

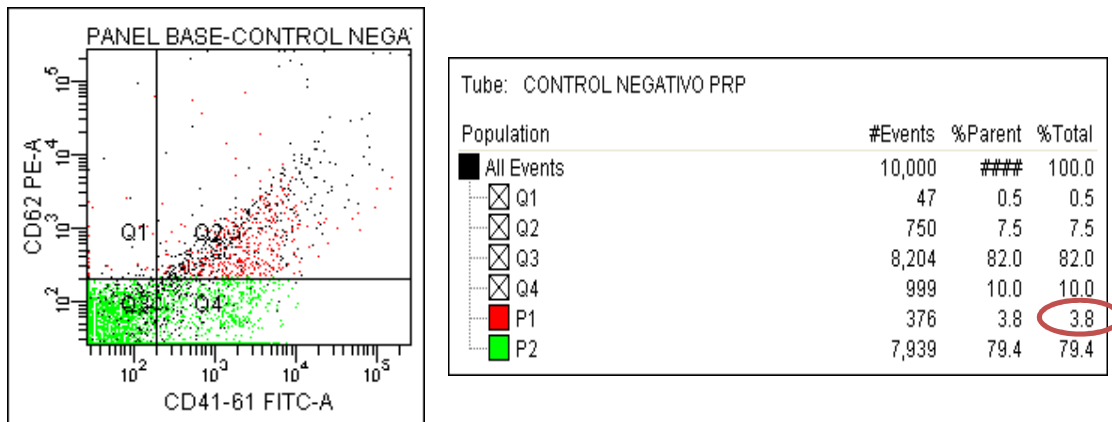
Fuente: Patología Molecular – HCAM (Febrero, 2016)

El reporte fue proporcionado por el equipo técnico del HCAM, del área de Patología Molecular, en la que se utilizó el equipo mencionado para la medición de la activación plaquetaria.

B) Controles Internos:

Se utilizó como control negativo una muestra de plasma citratado, de un paciente sano con plaquetas inactivas, por la administración de ácido acetil salicílico (Antiplate 100mg) (Hansson et al., 2014); comprobando que el anticuerpo CD62, no se unió a las plaquetas inactivas, por ejemplo en Figura N°7 se encuentra únicamente el 3,8% de plaquetas activas pertenecientes al porcentaje basal del paciente.

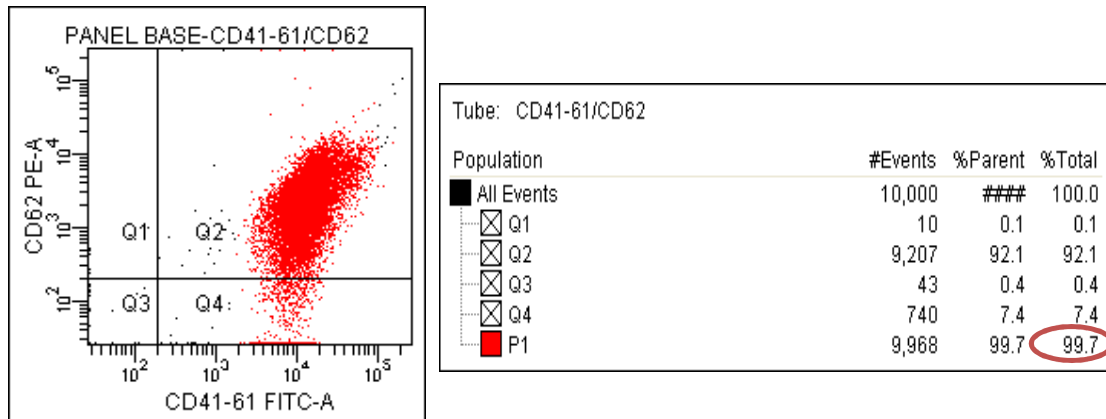
Figura N° 7. Control Negativo para Citometría de Flujo



Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad citometría de flujo

Para el control positivo se utilizó una muestra de plasma activado con 1uL de ADP (Wasiluk et al., 2013), el cual se incubó por 15min. Se muestra en la Figura N°8 un ejemplo, en esta muestra se encontró que el 99,7% de plaquetas se encuentran activadas

Figura N° 8. Control Positivo para citometría de flujo



Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad citometría de flujo

3.8. MANEJO DE LA INFORMACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

Se realizó un registro en Microsoft Excel 2013, la base de datos constaba de: el código del CPQ, fecha, resultados de los parámetros medidos y responsables. Además, este software permitió obtener las gráficas de las frecuencias.

Para el análisis estadístico se usó estadística descriptiva, mediante el programa IBM SPSS Statistics v20, con el fin de encontrar las frecuencias y porcentajes de los datos. Para determinar una relación entre las variables nominales con los días de almacenamiento se usó la prueba *Chi cuadrado* de asociación e independencia; en cambio, para estudiar el efecto del tiempo prolongando de conservación en el pH y activación plaquetaria, el análisis se realizó mediante ANOVA unidireccional, para el conteo celular se aplicó una prueba no paramétrica denominada Kruskal Wallis, dado que no cumplían los requisitos de ANOVA. De igual forma, la relación entre la activación plaquetaria y parámetros de aspecto físico fueron analizadas mediante ANOVA de un factor o prueba de Kruskal Wallis y para variables cuantitativas como el pH, se estudió mediante correlación de Pearson. Un valor de *p* menor a 0,05 indicó una diferencia significativa. Por último, para determinar el grado de correlación entre el swirling y la expresión de CD62 se utilizó

regresión lineal; se definió que no existe correlación con un $r^2 \leq 0.1$, un $0.1 < r^2 < 0.5$ una débil correlación, un $0.5 > r^2 < 0.8$ indica una buena relación y un $r^2 > 0.8$ representa una alta correlación (Dijkstra & et al, 2004).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Se analizaron 64 concentrados de plaquetas, los cuales fueron evaluados al tercer, quinto y séptimo día de almacenamiento, examinando un total de 192 muestras, a las que se midieron 7 parámetros, relacionados con el mantenimiento del aspecto físico, control de calidad y activación plaquetaria.

4.1.1. Análisis de las frecuencias de los parámetros relacionados al aspecto físico

Al evaluar los parámetros de aspecto físico, se obtuvo que un 100% de concentrados plaquetarios cumplieron con el volumen establecido (40-70mL), presentaron un color amarillo, así como la integridad de las bolsas de contención, es decir, tenían un sistema cerrado estéril óptimo, sin presencia de aberturas. Al observar la formación de swirling (torbellino) determinándose que 112 (58,3%) presentaron una formación de 3 cruces (+++) de Swirling, sugestivo del mantenimiento de la forma plaquetaria (Tabla N°4.1).

Tabla N°4.1. Frecuencias del nivel de swirling

Swirling	Frecuencia	Porcentaje (%)
(+)	13	6,8
(++)	58	30,2
(+++)	112	58,3
Ausencia	7	3,6
Escaso	2	1,0
Total	192	100,0

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

Adicionalmente, se valoró la presencia de agregados plaquetarios, obteniéndose que 102 (53,1%) concentrados no presentaron agregados (Tabla N°4.2).

Tabla N°4.2. Frecuencias de agregados plaquetarios

Agregados	Frecuencia	Porcentaje (%)
Ausencia	102	53,1
Escasos	20	10,4
(+)	36	18,8
(++)	26	13,5
(+++)	8	4,2
Total	192	100,0

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

Se determinó dentro de los parámetros de aspecto físico una frecuencia de 156 (81,3%) concentrados plaquetarios que no presentaron lipemia (Tabla N°4.3).

Tabla N°4.3. Frecuencias del análisis de lipemia

Lipemia	Frecuencia	Porcentaje (%)
Ausencia	156	81,3
Escasa	36	18,8
Total	192	100,0

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

El último parámetro físico analizado fue la presencia o ausencia de burbujas, encontrando que 172 (89,6%) CPQs no presentaron burbujas (Tabla N°4.4).

Tabla N°4.4. Frecuencias del análisis de presencia o ausencia de burbujas

Burbujas	Frecuencia	Porcentaje (%)
Ausencia	172	89,6
Presencia	20	10,4
Total	192	100,0

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

4.1.2. Análisis de las frecuencias de los parámetros relacionados al control de calidad establecido por la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB)

Al analizar estos parámetros se obtuvo que el 54,2% de CPQs presentaron un conteaje de plaquetas normal ($>5,5 \times 10^{10}$ cél/bolsa), tal como se puede apreciar en el Gráfico N°4.1.

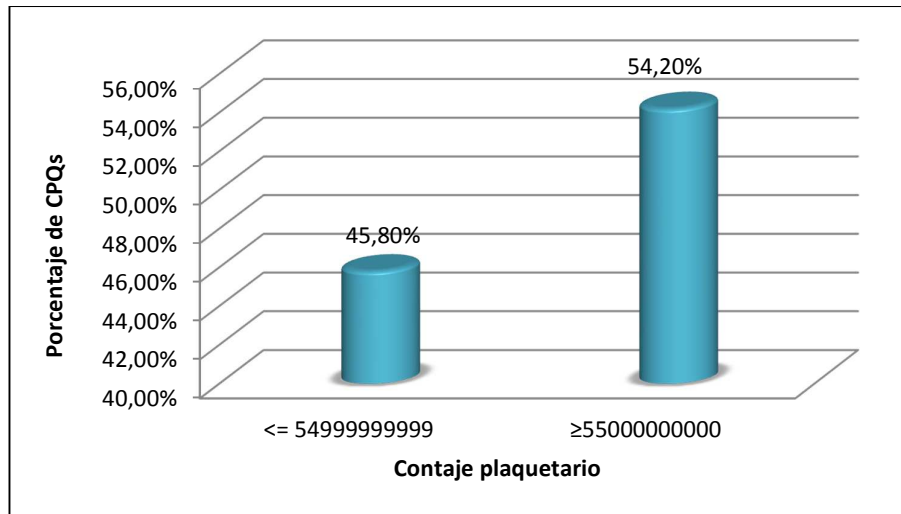


Gráfico N°4.1. Porcentaje de CPQs que cumple con el conteaje plaquetario

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

El 100% de CPQs cumple con un conteo óptimo de leucocitos residuales ($<0,12 \times 10^9$ cél/bolsa) (Tabla N°4.5).

Tabla N°4.5. Frecuencia de CPQs que cumplen con el conteo de leucocitos residuales

Leucocitos	Frecuencia	Porcentaje (%)
1280000 - 113850000	192	100

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo

Fuente: Base de datos control de calidad

Por el contrario, el 92,7% de CPQs sobrepasa el límite de eritrocitos residuales ($<1,2 \times 10^9$ cél/bolsa), obteniéndose que solo el 7,3% de los CPQs se encuentran dentro del rango normal (Gráfico N°4.2).

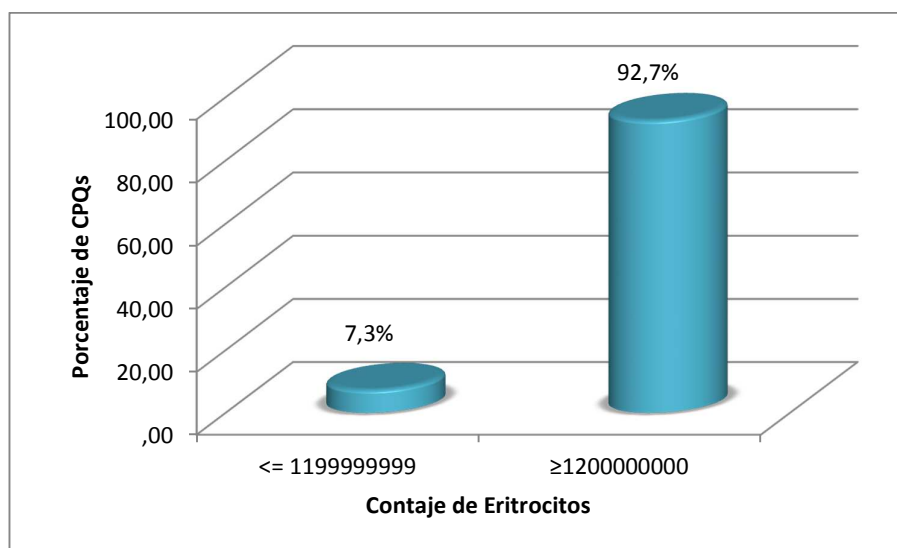


Gráfico N° 4.2. Frecuencia de CPQs que cumplen con el conteo de eritrocitos residuales

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo

Fuente: Base de datos control de calidad

Al realizar la determinación del pH se encontró un 100% de CPQs que cumplen con los valores normales de pH establecido por la AABB (Tabla N°4.6).

Tabla N°4.6. Frecuencia de la determinación del pH

pH	Frecuencia	Porcentaje (%)
≥6,20	192	100

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

Además del total de 192 CPQs a los que se realizó el cultivo microbiológico, el 100% no presentó contaminación bacteriana, después de haber sido incubados 48h en Agar Base Sangre, EMB y tioglicolato.

4.1.3. Análisis de las frecuencias de activación plaquetaria

Al realizar la medición de la activación se encontró que el 50,5% de CPQs presentan bajos niveles de activación plaquetaria, es decir, están dentro del rango óptimo. (Tabla N°4.7).

Tabla N°4.7. Frecuencia del análisis de activación plaquetaria

Activación plaquetaria	Frecuencia	Porcentaje
≤ 30,9	97	50,5%
31,0 - 50,9	84	43,8%
≥51,0	11	5,7%
Total	192	100%

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

4.2.RELACIÓN DE LOS ASPECTOS FÍSICOS CON LOS DÍAS DE ALMACENAMIENTO

De los análisis realizados se determinó que existe mayor frecuencia de concentrados plaquetarios (49) con valoración de 3 cruces (+++) de swirling en el tercer día de almacenamiento y se observó una disminución del mismo mientras aumentaba los días de almacenamiento. La prueba estadística demostró una relación significativa a partir del día 7 de conservación ($p=0,000$) con respecto al día 3 (Tabla N°4.8).

Tabla N°4.8. Relación entre los días de almacenamiento y el nivel de swirling

		Almacenamiento			Total	
		Tercer	Quinto	Séptimo		
Swirling	Ausencia	Recuento	3	3	3	9
		% dentro de Almacenamiento	4,7%	4,7%	4,7%	4,7%
	(+)	Recuento	1	3	9	13
		% dentro de Almacenamiento	1,6%	4,7%	14,1%	6,8%
	(++)	Recuento	11	21	26	58
		% dentro de Almacenamiento	17,2%	32,8%	40,6%	30,2%
	(+++)	Recuento	49	37	26	112
		% dentro de Almacenamiento	76,6%	57,8%	40,6%	58,3%
	Total	Recuento	64	64	64	192
		% dentro de Almacenamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	Chi-cuadrado de Pearson	n=192		Tercer-Quinto	p=0,119	
				Tercer-Séptimo	p= 0,000	

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo

Fuente: Base de datos control de calidad

En la medición de agregados plaquetarios, se observó que mientras más días de almacenamiento existe mayor cantidad de agregados plaquetarios formados. El estadístico demostró una diferencia significativa en el día 7 de conservación ($p=0,000$) con respecto al día 3 (Tabla N°4.9)

Tabla N°4.9. Relación entre los días de almacenamiento y la presencia de agregados

		Almacenamiento			Total	
		Tercer	Quinto	Séptimo		
Agregados	Ausencia	Recuento	61	23	18	102
		% dentro de Almacenamiento	95,3%	35,9%	28,1%	53,1%
	Escasos	Recuento	2	13	5	20
		% dentro de Almacenamiento	3,1%	20,3%	7,8%	10,4%
	(+)	Recuento	1	21	14	36
		% dentro de Almacenamiento	1,6%	32,8%	21,9%	18,8%
	(++)	Recuento	0	6	20	26
		% dentro de Almacenamiento	0,0%	9,4%	31,2%	13,5%
	(+++)	Recuento	0	1	7	8
		% dentro de Almacenamiento	0,0%	1,6%	10,9%	4,2%
	Total	Recuento	64	64	64	192
		% dentro de Almacenamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Chi cuadrado de Pearson	n=192		Tercer-Quinto	p= 1,000		
			Tercer-Séptimo	p=0,000		

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

La prueba estadística Chi-cuadrado demostró una independencia en la presencia de lipemia y los días de almacenamiento entre el día 5 (p=1,000), el día 7 (p=1,000) con relación del día 3 (Tabla N°4.10, Gráfico N°4.3).

Tabla N°4.10. Relación entre los días de almacenamiento y la presencia de lipemia

		Almacenamiento			Total	
		Tercer	Quinto	Séptimo		
Lipemia	Ausencia	Recuento	52	52	52	156
		% dentro de Almacenamiento	81,2%	81,2%	81,2%	81,2%
	Escasa	Recuento	12	12	12	36
		% dentro de Almacenamiento	18,8%	18,8%	18,8%	18,8%
Total		Recuento	64	64	64	192
		% dentro de Almacenamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Chi cuadrado de Pearson		n=192	Tercer-Quinto p=1,000 Tercer-Séptimo p=1,000			

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

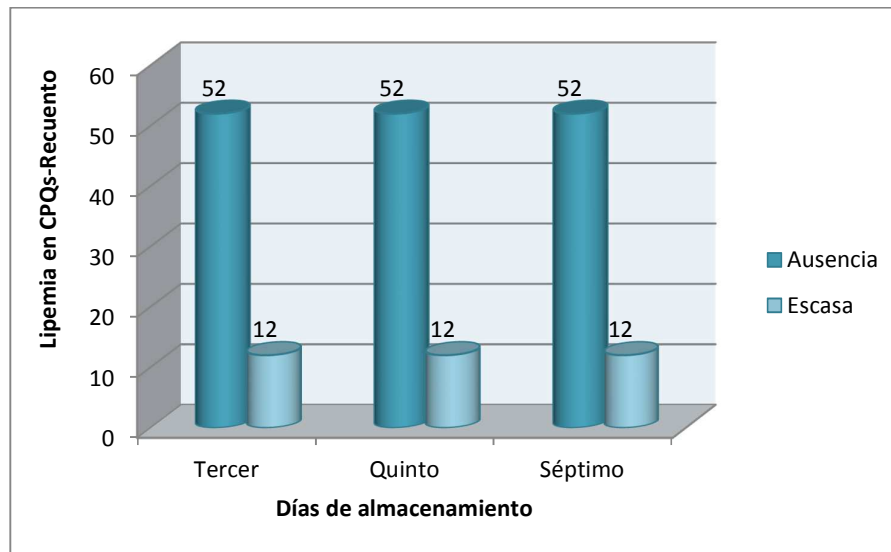


Gráfico N°4.3. Frecuencia de la presencia de lipemia

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

Una disminución en la presencia de burbujas a través del tiempo se observó en los concentrados plaquetarios (Gráfico N°4.4), con una diferencia significativa en el día 7 de almacenamiento con respecto al día 3 (Tabla N°4.11).

Tabla N°4. 11. Relación entre los días de almacenamiento y la presencia de burbujas

		Almacenamiento			Total	
		3	5	7		
Burbujas	Ausencia	Recuento	52	57	63	172
		% dentro de Almacenamiento	81,2%	89,1%	98,4%	89,6%
	Presencia	Recuento	12	7	1	20
		% dentro de Almacenamiento	18,8%	10,9%	1,6%	10,4%
Total		Recuento	64	64	64	192
		% dentro de Almacenamiento	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
Chi cuadrado de Pearson		n=192	Tercer-Quinto p=0,320			
			Tercer-Séptimo p=0,001			

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

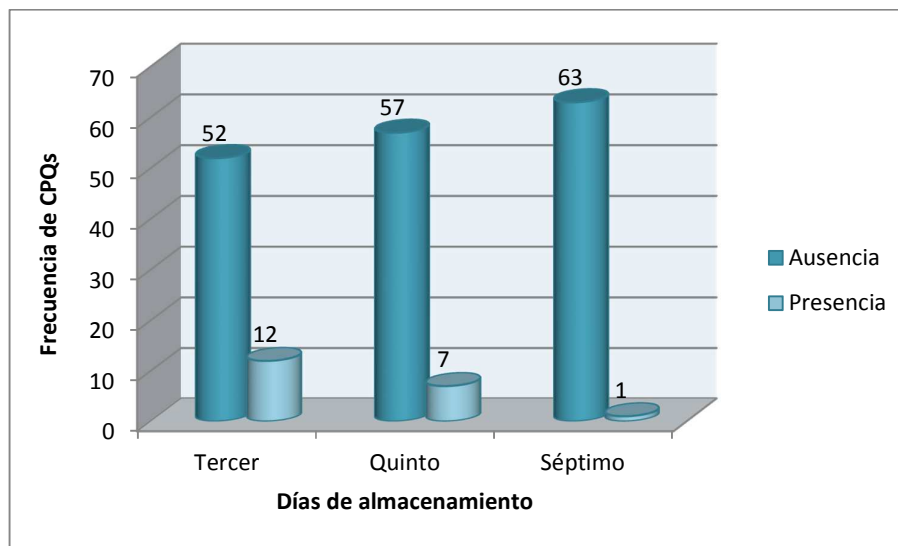


Gráfico N°4.4. Frecuencia de la presencia de burbujas

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

4.3.RELACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD ESTABLECIDOS POR LA AABB CON LOS DÍAS DE ALMACENAMIENTO

Para establecer la relación entre el volumen, conteje de plaquetas, leucocitos y eritrocitos residuales con los días de almacenamiento, se utilizó Kruskal Wallis, una prueba no paramétrica, debido a que estas variables no cumplieron con los supuestos como normalidad y homocedasticidad que se necesita para realizar ANOVA, por el contrario la variable pH, si cumplió con dichos supuestos (Anexo N°7-8).

Se encontró independencia entre el volumen ($p= 0,973$), conteje plaquetario ($p= 0,807$) y leucocitos residuales ($p= 0,890$) con los días de almacenamiento, por el contrario, en el conteje de eritrocitos residuales se observó una diferencia significativa en el día 7 de almacenamiento ($p= 0,003$) con respecto al tercer día, mostrando que mientras aumentan los días de conservación el número de eritrocitos disminuye (Tabla N°4.12).

Tabla N°4. 12. Relación entre los días de almacenamiento y el conteje de eritrocitos residuales

	Días de almacenamiento		Sig
Prueba de	3	5	0,350
Kruskal-Wallis	3	7	0,003

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

Para la variable pH se obtuvo una relación estadísticamente significativa con los días de almacenamiento ($p=0,000$) (Tabla N°4.13). Como se puede observar en el Gráfico N°4.5 esta relación es inversa, es decir, mientras más días de almacenamiento disminuye el pH; para determinar las diferencias entre los días de almacenamiento se utilizó la prueba de Tukey (Tabla N° 4.14) se encontró que no existió diferencias significativas entre los días 3 y 5 ($p=0,054$), pero sí existe diferencia entre los días 3 y 7 ($p= 0,000$), así como los días 5 y 7 ($p=0,000$).

Tabla N°4. 13. Relación entre el pH y los días de almacenamiento

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,920	2	,460	24,388	,000
Intra-grupos	3,565	189	,019		
Total	4,485	191			

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

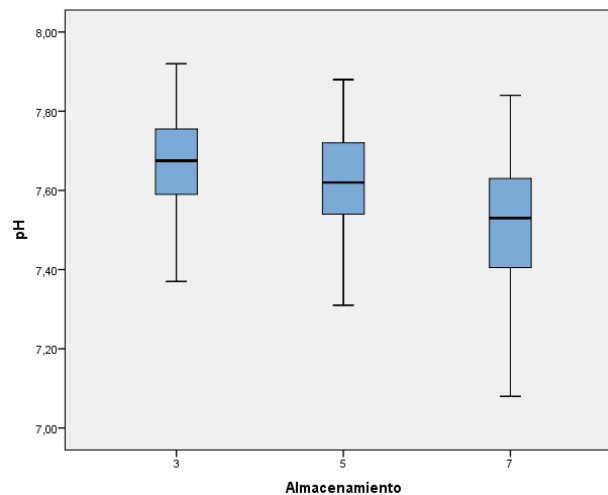


Gráfico N°4.5. Diagrama de caja pH/almacenamiento

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

Tabla N°4.14. Comparación del pH con los diferentes días de almacenamiento utilizando la prueba de Tukey

	Días de almacenamiento		Sig
HSD de Tukey	3	5	0,054
	3	7	0,000
	5	7	0,000

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

4.4.RELACIÓN DE LA LIBERACIÓN DEL MARCADOR CD62 P-SELECTIN CON LOS DÍAS DE ALMACENAMIENTO

Para determinar la relación de la activación con los días de almacenamiento, se midió mediante citometría de flujo la cantidad de proteína CD62 (P-selectin) liberada en la membrana plaquetaria y para esto se utilizó el test estadístico ANOVA de un factor, una vez comprobado que los datos cumplan los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia (Anexo N°9-10). Cabe destacar que la variable activación plaquetaria se transformó a raíz cuadrada para que cumpla el requisito de normalidad de datos.

Se obtuvo dependencia entre los días de almacenamiento y la activación plaquetaria, $p=0,000$ (Tabla N°4.15-4.16), es decir, la expresión de CD62 se incrementaba a través del tiempo de almacenamiento (Gráfico N°4.6). La prueba de Tukey mostró diferencias entre el día 3 y día 5 ($p=0,001$) y el día 5 y 7 ($p=0,000$), así como el día 3 y 7 ($p=0,000$) (Tabla N°4.17).

Tabla N°4.15. Estadísticos descriptivos de la activación plaquetaria

	Almacenamiento	Media	Mínimo	Máximo
Activación plaquetaria	Tercer	25,850	13,4	59,5
	Quinto	31,309	15,6	65,4
	Séptimo	37,861	21,9	66,9

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

Tabla N°4.16. Relación entre la activación plaquetaria y los días de almacenamiento

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	37,786	2	18,893	30,210	,000
Intra-grupos	118,200	189	,625		
Total	155,986	191			

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

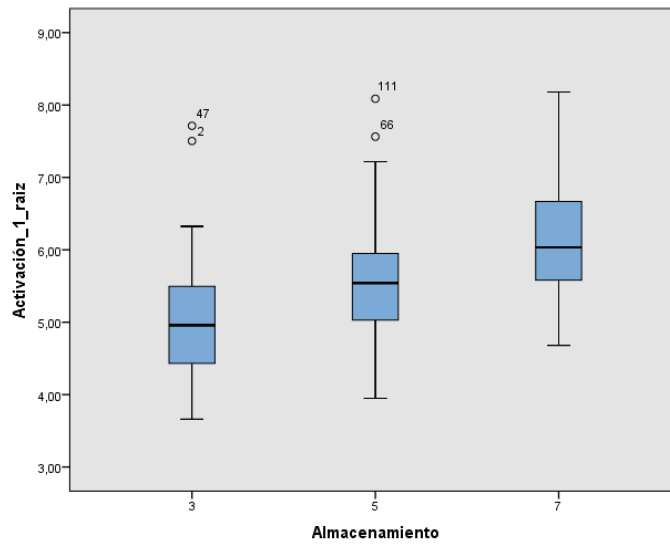


Gráfico N°4.6. Diagrama de caja activación plaquetaria/almacenamiento

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

Tabla N°4.17. Comparación de la activación plaquetaria con los diferentes días de almacenamiento mediante la prueba de Tukey

	Días de almacenamiento		Sig.
HSD de Tukey	3	5	,001
		7	,000
	5	7	,000

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

4.5. RELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES MEDIDAS CON LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

Se calculó la relación que existe entre diferentes variables con la activación plaquetaria, para determinar qué variable medida visualmente es la que mejor predice la activación plaquetaria. Para ello se utilizó la prueba estadística ANOVA de un factor, encontrando una relación dependiente entre el swirling con la activación plaquetaria $p=0,000$ (Tabla N°4.18) (Anexo N° 11-12). Hay que tomar en cuenta que previamente se transformaron los datos de la activación plaquetaria, a raíz cuadrada para que cumplan con los supuestos del ANOVA. Para medir el grado de asociación entre las dos variables se usó regresión simple, se identificó una correlación débil entre las dos variables ($r^2=0,148$), mostrando un incremento en la liberación de CD62 cuando el swirling disminuye (Tabla N°4.19).

Tabla N°4.18. Relación entre la activación plaquetaria y el swirling

	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3	8,301	11,905	,000
Intra-grupos	188	,697		
Total	191			

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

Tabla N°4.19. Regresión simple entre la activación y el swirling

		Swirling
Activación	Coficiente de correlación (R)	- 0,385
	R cuadrado	0,148
	Sig.	,000
	N	192

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

Para determinar la relación entre la activación plaquetaria y los agregados se usó la prueba de Kruskal Wallis, la cual se obtuvo una significancia ($p=0,004$), estableciendo que las dos variables son dependientes, al realizar correlación de Spearman se identificó una relación directamente proporcional entre el nivel de agregados y la activación (Tabla N°4.20).

Tabla N°4.20. Relación entre la activación plaquetaria y agregados

	Activación_raiz
Chi-cuadrado	13,341
Gl	3
Sig. asintót.	,004
Rho de Spearman	0,207

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

Por el contrario, existió independencia entre las variables lipemia y activación plaquetaria, esto se determinó mediante ANOVA de un factor, ya que las variables si cumplen los supuestos ($p=0,174$) (Tabla N°4.21) (Anexo N°13-14).

Tabla N°4.21. Relación entre la activación plaquetaria y lipemia

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1,512	1	1,512	1,860	,174
Intra-grupos	154,474	190	,813		
Total	155,986	191			

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo
Fuente: Base de datos control de calidad

Usando la misma prueba estadística, se estableció una relación independiente entre la presencia de burbujas y la activación plaquetaria ($p=0,380$) (Tabla N°4.22) (Anexo N°15-16).

Tabla N°4.22. Relación entre la activación plaquetaria y burbujas

	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	1	,634	,775	,380
Intra-grupos	190	,818		
Total	191			

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo

Fuente: Base de datos control de calidad

A su vez, se aplicó una correlación de Pearson entre la variable pH y activación plaquetaria, el análisis estadístico demostró una relación inversa entre las dos variables cuantitativas ($R=-,154$) (Tabla N°4.23).

Tabla N°4.23. Correlación de Pearson entre el pH y la activación plaquetaria

		Activación
pH	Coefficiente de correlación	$-,154^*$
	Sig. (bilateral)	,033
	N	192

*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Autoras: Katherine Jaramillo y Clara Arroyo

Fuente: Base de datos control de calidad

DISCUSIÓN

Los concentrados plaquetarios (CPQs) son utilizados como terapia transfusional, en pacientes con enfermedades hematológicas, la eficacia de estos, depende de la calidad de las plaquetas, por lo que es de suma importancia controlar todos los parámetros que determinen la viabilidad de cada concentrado, siendo lo recomendable por la AABB utilizarlos cinco días después de su extracción para garantizar la viabilidad de las plaquetas en el paciente (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012); sin embargo, el estudio realizado por *Chandra* en 2014, determinó que la función plaquetaria puede mantenerse añadiendo una solución aditiva hasta el séptimo día luego de su extracción siempre que la temperatura de almacenamiento sea adecuada (*Chandra & Gupta*, 2014). De igual forma, *Castrillo y otros* en el 2015, evaluaron además de todos los parámetros de calidad de los CPQs, la medición del CD62 P-selectin, los resultados mostraron una buena calidad *in vitro* de los concentrados almacenados durante 9 días suspendidas en solución aditiva (*Castrillo & otros*, 2015). En este estudio también se evaluó los parámetros de calidad *in vitro* de los concentrados plaquetarios almacenados hasta 7 días, siguiendo las recomendaciones de la AABB más la activación plaquetaria, determinándose que deben utilizarse únicamente hasta el quinto día de almacenamiento.

Dentro de los parámetros de calidad se validó el aspecto físico obteniéndose valores óptimos de color amarillo e integridad de la bolsa, datos similares al estudio realizado por *Pineda* en el 2015, en el que se determinó que el 100% de CPQ mantenían su color y no presentaron fisuras las bolsas de contención. En contraste, con el estudio de *Elkassabany* 2008, donde se identificó un cambio de color de amarillo a verde en los concentrados de plaquetas indicativo de contaminación bacteriana, *Elkassabany* (como se citó en *Kirk*, 2014).

Otro parámetro físico observado fue la presencia de swirling o torbellino, el que está relacionado con la morfología discoidea de la plaqueta y su ausencia es indicativa de la activación plaquetaria. En este estudio se encontró que 112 (58,3%) concentrados

plaquetarios presentaron (+++) de swirling e iban disminuyendo mientras aumentaban los días de almacenamiento ($p=0,001$). Datos similares se encuentra en un estudio publicado por *Ravindra y otros* en 2009, identificaron que después de 5 días de almacenamiento, el torbellino disminuyó notablemente, debido a las lesiones ocurridas durante la conservación de plaquetas (Ravindra, Nealman, Pankaj, & Sumitra, 2009). Otro estudio publicado por la *Revista Brasileira de Hematología* en 2012, mostró que el nivel de swirling en concentrados derivados de Buffy coat (BC) disminuyó después del séptimo día y en concentrados obtenidos de Plasma Rico en Plaquetas (PRP) empezó a decrecer significativamente a partir del quinto día (Costa, 2012). *Pineda* en 2015, establece que una causa de la disminución en el número de plaquetas discoidales puede deberse a cambios bruscos de temperatura de almacenamiento (Pineda & Chiriboga, 2015). A su vez, el estudio de *Chandra* en 2014, menciona que temperaturas por debajo de 15°C se correlacionan con la disminución de swirling (Chandra & Gupta, 2014).

Por el contrario la presencia de lipemia, otro parámetro físico evaluado mediante inspección visual mostró que el grado de lipemia no se relaciona con el tiempo de conservación. El Departamento de Investigación de Células Sanguíneas en Ámsterdam, encontró que los concentrados plaquetarios con un plasma lipémico tiene un efecto negativo en la calidad *in vitro* de las plaquetas durante el almacenamiento, debido a que presentaron mayor activación, en comparación con un plasma normal. Pese a este gran avance en la investigación, todavía cabe profundizar sobre el mecanismo del efecto de los lípidos y el grado máximo aceptable de lipemia (Korte, 2012). En el presente estudio este parámetro físico no influyó en la liberación del marcador CD62 P-selectin ($p=0,174$).

Los concentrados plaquetarios pueden presentar agregados inmediatamente después de la separación de sangre total, independiente del método usado. La producción de agregados normalmente se disipa con el reposo, agitación y la temperatura de almacenamiento; los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que los concentrados que presentaron agregados desde el inicio permanecieron así hasta el séptimo día de conservación. No se establecen causas exactas de la formación de agregados, pero en el estudio de *Ringwald*, sugieren que bajas temperaturas, bajo pH, períodos de reposo corto, presencia de burbujas y variables dependientes del donador tienen un impacto en la formación de agregados plaquetarios (Ringwald & Antoon, 2014); en cambio, la Sociedad Internacional de

Transfusión de Sangre menciona que puede ser consecuencia de un fenómeno multifactorial (Van Der Meer et al., 2015). Actualmente, no existe un consenso sobre una estrategia general de descarte de los CPQs con agregados plaquetarios y los criterios dependen de cada banco de sangre, dado que existe poca literatura acerca de los efectos adversos de la transfusión de concentrados con agregados (Castrillo & Jiménez, 2017).

También se determinó que durante el período de almacenamiento los CPQs que presentaron agregados al inicio, incrementaron la formación de estos, presentando una diferencia significativa al séptimo día con relación al tercer día ($p=0,000$). Esto lo corrobora el estudio de *Manasa y Vani* en 2016, en dónde usaron espectrofotometría para medir la agregación plaquetaria y observaron que este parámetro se incrementaba significativamente desde el día 2 hasta el día 12, debido a la producción de radicales libres (Manasa & Vani, 2016). En contraste, en el estudio publicado por Castrillo y otros en 2015, dónde se evaluó el efecto de la formación de agregados plaquetarios, no existió diferencias significativas en el grado de agregados entre los días 2, 5, 7 y 9 de almacenamiento, establece que esto se debe en gran medida a la adhesión de solución aditiva de potasio y magnesio (Pas-E), ya que mantiene la glicólisis en un nivel bajo, evita la disminución de pH y ayuda en la viabilidad de las plaquetas (Castrillo & Álvarez, 2015).

En relación a la presencia de burbujas, en este estudio se observó que éstas disminuían mientras aumentaban los días de almacenamiento, presentando una diferencia significativa al séptimo día con relación al tercer día ($p=0,001$). La posible causa de este resultado pudo ser, que al tercer día los concentrados que presentaban burbujas de aire, se removían al pasar a las bolsas de transferencia, por lo tanto, el nivel de burbujas en la bolsa matriz disminuía. No existen estudios de la relación entre presencia de burbujas y el tiempo de vida de las plaquetas. Pero de acuerdo al estudio de *Sandgren y Saeed*, muestran que el almacenamiento de concentrados con burbujas causa mayor desintegración de las plaquetas, de igual modo el porcentaje de plaquetas que expresan el marcador de activación CD62 P-selectin aumentó moderadamente durante el almacenamiento en todos los concentrados, pero fue más notorio en el día 7 ($p < 0.05$), Sandgren y Saeed (como se citó en Castrillo, 2015). Sin embargo, en el presente estudio no se observó una relación dependiente entre las burbujas y la activación plaquetaria ($p=0,380$).

Al realizar el conteo celular de los concentrados plaquetarios, se obtiene que el 54,2% de 192 CPQs, presenta un conteo de plaquetas óptimo establecido por la AABB ($>5,5 \times 10^{10}$ cél/bolsa) (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012), el estudio de *Pineda* realizado en el mismo lugar, se obtuvo que el 45% de CPQs mantienen un rango óptimo de conteo de plaquetas (Pineda & Chiriboga, 2015). El conteo plaquetario de cada CPQ depende de la técnica de obtención, sin embargo no se ve influenciada por el tiempo de centrifugación, como menciona Pineda en su estudio (Pineda & Chiriboga, 2015). Adicionalmente, en este estudio se determinó que el conteo plaquetario, no varía al pasar los días de almacenamiento, al contrario de *Dantas y otros* indican que el conteo varía hasta el tercer día, debido a que ocurre fragmentación plaquetaria, pero se estabiliza el conteo hasta el quinto día (Dantas et al., 2011).

Al determinar el conteo de leucocitos residuales, se obtuvo que el 100% de CPQs presentan un conteo óptimo ($<0,12 \times 10^9$ cél/bolsa) según la AABB (Asociación Americana de Bancos de Sangre, 2012), parámetro relacionado con algunos estudios como *Pineda* en 2015 y *Dantas* en 2011, que indican que la cantidad de leucocitos no supera el límite, esto gracias a las técnicas de obtención, la leucodepleción se puede conseguir con filtros muy eficientes o bien mediante Buffy coat, técnica que elimina el mayor porcentaje de leucocitos al realizar diferentes etapas de centrifugado, como menciona *Vuk y otros* en su artículo publicado en 2013. Es esencial medir este parámetro, ya que el exceso de leucocitos puede causar reacciones adversas en el paciente debido a los antígenos de membrana y a la producción de citoquinas de los leucocitos (Vuk et al., 2013).

Al evaluar el conteo de eritrocitos residuales se observó que el 92,7% no cumple con los parámetros establecidos por la AABB, y que va disminuyendo mientras más días de almacenamiento, por el contrario un estudio realizado por la Fundación Hemominas de Brasil, indica que los CPQs analizados cumplen con el conteo óptimo de eritrocitos residuales y que no se observa una diferencia al pasar los días de almacenamiento (Costa, 2012). Los resultados obtenidos en este estudio pudo deberse a la modificación que sufre este parámetro en el momento de la separación de las alícuotas del CPQ, ya que los eritrocitos suelen quedarse adheridos a las paredes tubulares de la bolsa, por lo que al momento de fraccionar las alícuotas a los tres y cinco días va disminuyendo la cantidad de eritrocitos en la bolsa matriz que fue analizada al séptimo día.

El pH es un parámetro importante al determinar la viabilidad de las plaquetas, a pesar de que el 100% de CPQs analizados cumplieron con un pH mayor a 6.2, este disminuyó con respecto a los días de almacenamiento, con una relación significativa ($p=0,000$) entre el tercer y séptimo día, pero no entre el tercer y quinto día ($p=0,054$); resultados similares al estudio de *Dijkstra y otros* en 2004, quienes obtuvieron una diferencia significativa ($p<0,001$), al relacionar entre el 2, 3, 4, y 5 vs. 8-12 días de almacenamiento, sin embargo, el pH no disminuyó del rango normal hasta el séptimo día (Dijkstra & et al, 2004), así mismo lo corrobora el estudio de *Costa* en el 2012, en donde el pH se encuentra estable hasta el séptimo día (6,93 – 7,34) (Costa, 2012). La disminución del pH puede ser debido a que las plaquetas consumen glucosa para su metabolismo, generando como resultado ácido láctico, causante de la disminución del pH, esto a la vez resulta en una lesión plaquetaria, activando a las plaquetas. (Van Der Meer, 2016)

Otro parámetro evaluado fue la expresión de CD62 P-selectin, ésta es una de las proteínas más abundantes de los gránulos alfa de las plaquetas y se expone en la superficie plaquetaria al ser activadas (Nagy, Debreceni, & Kappelmayer, 2011). Esta activación fue medida por citometría de flujo, la fluorescencia fue expresada como el porcentaje de células positivas. Muchos autores sugieren que esta activación se incrementa durante el almacenamiento (Quintero M., 2014) (Dijkstra & et al, 2004). En este estudio los resultados mostraron que la liberación de este marcador se incrementa progresivamente encontrando una diferencia significativa, al quinto día ($p=0,001$) y séptimo día de almacenamiento ($p=0,000$) con relación al tercer día. Este hallazgo se relaciona con la investigación publicada por la revista *Disorders and Transfusion*, en donde se determinó *in vitro* la calidad de concentrados plaquetarios almacenados hasta 5 días, preparados por dos métodos: buffy coat (BC) y plasma rico en plaquetas (PRP), encontraron que el grado de activación fue significativamente mayor en PRP que en BCs, estableciéndose de esta manera que las condiciones de obtención de las plaquetas pueden causar la activación plaquetaria, lo que contribuye a disminuir la capacidad funcional de las plaquetas almacenadas (Soleimany, 2012).

Un estudio similar publicado por la Universidad de Talca-Chile, encontró un incremento de la secreción de CD62 a través del tiempo, con un diferencia significativa a partir del tercer hasta el noveno día de almacenamiento, además evidenciaron que el método de obtención influye en el nivel de activación plaquetaria (Quintero M., 2014). En dicha

investigación se obtuvo plaquetas a partir de sangre total (PST), aféresis resuspendidas en plasma (PAP) y en solución aditiva (PAS), por lo que existió menor activación tanto en PAP y PAS en relación a PST desde el día 1 de almacenamiento, debido a la disminución de manipulación de operadores. En la presente investigación los concentrados plaquetarios fueron obtenidos únicamente por buffy coat, por lo que sería necesario se realice un estudio que compare la activación con plaquetas obtenidas por la metodología de plasma rico en plaquetas.

Además, se investigó la relación existente entre la activación plaquetaria y los parámetros medidos visualmente; la expresión del marcador P-selectin (CD62), indicativo de activación plaquetaria, tuvo una correlación débil con el swirling ($r^2=0,148$), encontrando que mientras más activación plaquetaria, existe menos swirling, relación encontrada también por *Dijkstra y otros*, sin embargo en su estudio, se presenta una correlación fuerte ($r^2=0,66$), es decir, el 66% de la variable activación plaquetaria (CD62), es explicada por la cantidad de swirling (Dijkstra & et al, 2004).

Otro de los parámetros medidos visualmente fue la cantidad de agregados plaquetarios que tuvieron una relación significativa ($p= 0,004$) con la activación plaquetaria, medidas con el marcador CD62, mostrando dependencia entre las dos variables; esta relación también se menciona en el fórum de la Revista Internacional de Transfusión Sanguínea, determinan que concentrados plaquetarios con agregados persistentes son indicativo de una activación plaquetaria elevada, con la consecuente disminución de la recuperación *in vivo* (Van Der Meer et al., 2015).

Por último, en esta investigación se identificó una correlación débil entre el pH y la activación plaquetaria, mostrando un incremento en el porcentaje de expresión del marcador CD62 cuando el pH disminuye. Por el contrario, un estudio de *Dijkstra y otros* en 2004, obtuvieron una correlación alta ($r^2=0,85$) entre el pH y la activación plaquetaria, mencionan que cuando el pH permanecía >6.5 , la expresión de CD62 se encontraba por debajo del 30%; en cambio, en un $pH < 6.2$, la expresión de CD62 subía del 60% (Dijkstra & et al, 2004). Este aumento puede deberse a la disminución de glucosa en el medio y la consecuente producción de lactato, lo que se traduce en cambios morfológicos de las plaquetas (Quintero, 2014) (Manasa & Vani, 2016).

CONCLUSIONES

- ✓ Se evaluó los parámetros que permiten establecer la viabilidad de las plaquetas de acuerdo a directrices de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB) de aplicación universal.
- ✓ El 100% de los donantes previa a la donación de sangre presentaron un conteo de plaquetas óptimo.
- ✓ La verificación de los parámetros de calidad de los CPQs demostró que las variables de aspecto físico, conteos celulares (plaquetas y leucocitos) no son dependientes del tiempo de almacenamiento.
- ✓ Las variables que presentaron diferencias significativas al séptimo día de almacenamiento con relación al tercer día, fueron: el swirling (torbellino), la presencia de agregados plaquetarios y variación en el pH.
- ✓ La liberación de la glicoproteína CD62 aumenta progresivamente con el tiempo de conservación de las plaquetas y se afecta por la disminución del pH, debido al aumento del ácido láctico que promueve la activación de plaquetas.
- ✓ De acuerdo a los análisis obtenidos en este estudio no debe utilizarse los CPQs luego del quinto día de almacenamiento por el aumento de agregados plaquetarios y activación de más del 50% de las plaquetas.

RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda que el personal encargado de la terapia transfusional, realice una inspección visual previa a una transfusión de concentrados plaquetarios, sobretodo la medición de swirling, parámetro que es utilizado para predecir el cambio de forma de plaquetas presentes y su activación; sin embargo, al ser un parámetro medido visualmente y por ende subjetivo, es necesario realizar capacitaciones y estudios de concordancia intra e inter observador al personal que se encargue de este procedimiento, asegurando así la correcta medición de un parámetro de gran beneficio y que no requiere de un presupuesto elevado, lo cual suele ser un limitante en la mayoría de las instituciones públicas del país.
- ✓ Se recomienda validar el proceso de fraccionamiento de CPQ a partir de sangre total en cada Banco de Sangre, dependiendo del fabricante de la bolsa, anticoagulante utilizado y de la centrifuga que se utilice, con el fin de obtener un conteo óptimo de plaquetas, de leucocitos y eritrocitos residuales.
- ✓ En caso de que se requiera mantener a los concentrados de plaquetas hasta el 7 día de almacenamiento (sobre todo en CPQs de donadores con grupos sanguíneos poco comunes), se recomienda añadir una solución aditiva PAS, la cual disminuye la lesión por almacenamiento, aumentando el tiempo de vida de las plaquetas al conservar su viabilidad.
- ✓ Se recomienda que se aplique como medida obligatoria un sistema de control de calidad mensual a todos los hemocomponentes, en cada Banco de Sangre del Ecuador, como lo menciona la AABB.
- ✓ Se recomienda realizar otros estudios en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana, verificando los parámetros de calidad a los CPQs, al comparar diferentes metodologías de obtención, bolsas de recolección utilizadas y añadiendo soluciones aditivas antes de ser utilizados.

BIBLIOGRAFÍA

- American Association of Blood Banks. (2012). *Technical Manual of the American Association of Blood Banks* (17 ed.). Estados Unidos: AABB.
- Barrera Ramírez, L. M., Drago Serrano, M. E., Pérez Ramos, J., Zamora, A. C., Gómez Arroyo, F., Del Rosario Sainz Espuñes, T., & Mendoza Pérez, F. (2004). Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista Del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1), 42–55.
- Bashir, S., Aftab, I., & Akbar, S. (2016). Effect of Platelet Additive Solution (PAS) on Random Donor Platelet Concentrates. *Journal of Rawalpindi Medical College*, 20(3), 219-221.
- Bashir, S., Mohsin, S., & Amin, H. (2014). Comparison of changes in platelet count, mean platelet volume and swirling in stored platelet concentrates with and without platelet additive solution. *Journal of Applied Hematology*, 5(1), 10-14.
- Bendezú, F. (2015). Características epidemiológicas del uso clínico de hemocomponentes. *Tesis-Hospital Nacional Docente Niño San Bartolomé-Perú*, 49-102.
- Carmona, J. U., Ríos, E., Vilar, J. M., Giraldo, C. E., & López, C. (2014). Effect of two anticoagulants on the cell count and platelet activation parameters from bovine platelet rich plasma. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 346, 341–346.
- Carrillo, R., & Garnica, M. (2011). Actualidades en transfusión. *Revista Médica de Anestesiología*, 34(1), S207-S210.
- Castrillo, A., & Jiménez, T. (2017). Collection, storage, inspection and quality control of platelet concentrates obtained by apheresis: the situation in Spain. *Transfusion and Apheresis Science*, 1-11. doi:<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.transci.2017.02.002>
- Cedeño, J. (06 de 04 de 2015). *MEDIBAC*. Obtenido de <http://www.labmedibac.com/wp-content/uploads/2015/04/MEDIO-DE-TIOGLICOLATO-USP-MEDIBAC-LAB.pdf>

- Chandra, T., & Gupta, A. (2014). Extended Shelf Life of Random Donor Platelets Stored for 7 Days in Platelet Additive Solution at Different Temperatures. *Biomed J*, 37(4), 211-217. doi:10.4103/2319-4170.117896
- Coller, B. (2012). Historical perspective and future directions in platelet research. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 9(1), 374-395. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04356.x
- Costa, J. (2012). Comparison of cytokine levels and metabolic parameters of stored platelet concentrates of the Fundação Hemominas, Belo Horizonte, Brazil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 34(2), 94-99. doi:DOI: 10.5581/1516-8484.20120029
- Cruz Roja Ecuatoriana. (2017). *Campaña de donación-CRE*. Obtenido de <http://www.cruzroja.org.ec/index.php/78-campana/240-campana>
- Dantas, M., Brasil, S., Cavalcante, F., & Monteiro, T. (2011). Platelet aggregation and quality control of platelet concentrates produced in the Amazon Blood Bank. *Revista Brasileira de Hematología e Hemoterapia*, 33(2), 111. doi: 10.5581/1516-8484.20110030
- Dijkstra, T., Pietersz, R., & Huijgens, P. (2004). Correlation between the extent of platelet activation in platelet concentrates and in vitro and in vivo parameters. *Vox Sanguinis*, 87, 257-263.
- Editores de la Enciclopedia Británica. (2016). *Encyclopedia Britannica*. Obtenido de Encyclopedia Britannica: <https://www.britannica.com/science/pH>
- FDA. (2016). Bacterial Risk Control Strategies for Blood Collection Establishments and Transfusion Services to Enhance the Safety and Availability of Platelets for Transfusion. *Department of Health and Human Services*, 37.

- Flores, O. I., Meza, J. M., Nava, J. A., & Ramírez, K. (2014). Fisiología de la coagulación. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 37(2), S382–S386. Recibido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/rma/cma-2014/cmas142c.pdf>
- Fundación Hemominas. (16 de Junio de 2016). Control de Calidad de Hemocomponentes. Belohorizonte, Brazil: SUS.
- Gal, B., López, M., Martín, A., & Prieto, J. (2013). *Bases de la fisiología plaquetaria*. Obtenido de Bases de la fisiología plaquetaria: http://media.axon.es/pdf/98243_1.pdf
- Gale, A. (2011). Current understanding of Hemostasis. *Toxicologic Pathology*, 39(1), 273–280. <https://doi.org/10.1177/0192623310389474>.Current
- García, T., & Castillo, A. (2012). Impacto de la automatización en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. *Memorias Convención Internacional de Salud Pública*, 1-9.
- Gekas, C., & Graf, T. (2013). CD41 expression marks myeloid biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood*, 121(22), 4463–4472. <http://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457929>.
- Ghoshal, K., & Bhattacharyya, M. (2014). Overview of platelet physiology: Its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. *The Scientific World Journal*, 1–17. <http://doi.org/10.1155/2014/781857>
- González, A., & y cols. (2010). Vías de señalización implicadas en la megacariopoyesis. *Gaceta Médica de México*, 146(2), 136–143. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2010/gm102j.pdf>
- Hansson, E., Shams, H., Åström, K., Hesse, C., Wallén, H., Dellborg, M., & Hemmings, H. C. (2014). Effects of ex vivo platelet supplementation on platelet aggregability in blood samples from patients treated with acetylsalicylic acid, clopidogrel, or ticagrelor. *British Journal of Anaesthesia*, 112(3), 570–575. <http://doi.org/10.1093/bja/aet339>

- Hervé, B. (2015). Nuevas tecnologías en diagnóstico microbiológico: automatización y algunas aplicaciones en identificación microbiana y estudio de susceptibilidad. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(6), 753-763. doi:10.1016/j.rmclc.2015.11.004
- Hussein, E. (8 de Marzo de 2015). Clinical and quality evaluation of apheresis vs random-donor platelet concentrates stored for 7 days. *Tranfusion Medicine*, 25, 20-26.
- Instituto Nacional de Salud de Colombia. (2011). Guía de control de calidad de componentes sanguíneos. Bogotá D.C.: Imprenta Nacional de Colombia.
- Kirk, L., Arora, V., & Bandhlish, A. (2014). The colour of plasma. *Canadian Journal of Anesthesia*, 61(209), 209-210. doi:10.1007/s12630-013-0078-5
- Kshitija, M., & Ravneet, K. (2015). Platelet storage lesion: An update. *Asian Journal of Transfusion Science*, 9(1), 1-3.
- Korte, D. (2012). In vitro quality tests for cellular blood products. *Sanquin Research*, 1-3.
- LABNALCIT. (2016). ¿Qué es la Citometría de Flujo?
- Leach, M., Drummond, M., & Doig, A. (2015). Principios de la Citometría de Flujo. En *Citometría de Flujo* (págs. 3-18). Venezuela: AMOLCA
- López, A., & Macaya, C. (2013). Plaqueta : fisiología de la activación y la inhibición. *Revista Española de Cardiología*, 13, 2-7. Retrieved from <http://www.revespcardiol.org/es/plaqueta-fisiologia-activacion-inhibicion/articulo/90200688/>
- Lozano, M., Rivera, J., & Vicente, V. (Mayo de 2012). Concentrados de plaquetas procedentes de sangre total (buffy coat) u obtenidos por aféresis; ¿qué producto emplear? *Revista de Medicina Clínica*, 138(12).
- Mallhi, R., Kumar, S., & Philip, J. (2015). A Comparative Assessment of Quality of Platelet Concentrates Prepared by Buffy Coat Poor Platelet Concentrate Method and

- Apheresis Derived Platelet Concentrate Method. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*, 31(4), 453-459. doi: 10.1007/s12288-014-0476-z
- Manasa, K., & Vani, R. (2016). Influence of Oxidative Stress on Stored Platelets. *Advances in Hematology*, 15(1), 2015. doi:10.1186/cc9866
- Middelburg, R., Roest, M., Ham, J., Coccoris, M., Zwaginga, J., & Van Der Meer, P. F. (2013). Flow cytometric assessment of agonist-induced P-selectin expression as a measure of platelet quality in stored platelet concentrates. *Transfusion*, 53(8), 1780–1787. <http://doi.org/10.1111/trf.12001>
- Miltenyi Biotec. (2014). CD62P Antibodies human. USA.
- Ministerio de Salud Pública. Plan Nacional de Sangre 2015-2017, Pub. L. No. 00000011 (2015). Recibido de www.msp.gob.ec
- Mokhtar, M., H. H., & Joshi, S. (2016). Assessment of quality of platelets preserved in plasma and platelet additive solution: A Malaysian experience. *Asian Journal of Transfusion Science*, 10(1), 84-87. doi:10.4103/0973-6247.172177
- Moliner, V., & Marco, P. (2013). Nuevos fármacos antiagregantes en el síndrome coronario agudo y su utilización en el servicio de urgencias. *Emergencias*, 25, 58–65.
- Naghadeh, H., Badlou, B., Ferizhandy, A., Mohammadreza, T., & Shahram, V. (Julio de 2013). Six hours of resting platelet concentrates stored at 22–24 °C for 48 hours in permeable bags preserved pH, swirling and lactate dehydrogenase better and caused less platelet activation. *Blood Transfusion*, 11(3), 400–404.
- Naghadeh, T., & Farhad, R. (Febrero de 2014). The effect of 24 h resting of old PCs at 22–24 C in permeable. *Transfusion and Apheresis Science - Journal - Elsevier*, 50(1), 106–110.

- Nagy, B., Debreceni, I., & Kappelmayer, J. (2011). Flow cytometric investigation of classical and alternative platelet activation markers. *The Journal of the International Federation of Clinical Chemistry*, 23(4), 1-11.
- Nor, S., & Huda, B. (2014). Quality Assessment of Platelet Concentrates Prepared after Whole Blood Overnight Storage. *Journal of Medical and Bioengineering*, 3(2), 87-92. doi:10.12720/jomb.3.2.87-92
- Organización Panamericana de la Salud OPS. (2012). *Estándares de trabajo para Servicios de Trabajo*. Washington D.C.: Biblioteca de la Sede de la OPS. Tercera Edición.
- Organización Panamericana de la Salud. (15 de 08 de 2016). *Latinoamérica y el Caribe está casi a mitad de camino de alcanzar el 100% de donantes voluntarios de sangre*. Obtenido de Latinoamérica y el Caribe está casi a mitad de camino de alcanzar el 100% de donantes voluntarios de sangre: http://www2.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12143%3A1ac-approaching-half-way-100-voluntary-blood-donation&Itemid=1926&lang=es
- Periayah, M. H., Halim, A. S., Yaacob, N. S., Mat Saad, A. Z., Hussein, A. R., Abdul Rashid, A. H., & Ujang, Z. (2014). Glycoprotein IIb/IIIa and P2Y 12 Induction by Oligochitosan Accelerates Platelet Aggregation. *BioMed Research International*, 2014, 1-8. <http://doi.org/10.1155/2014/653149>
- Perkins, H., Kumaran, D., Kou, Y., Qaisar, R., Geelhood, S., Ramirez, S., & Loza, M. (29 de Marzo de 2016). Noninvasive pH monitoring for bacterial detection in platelet concentrates. *TRansfusion*, 56(6).
- Pineda, G., & Chiriboga, R. (2015). Evaluación de la Calidad concentrados plaquetarios obtenidos a partir de sangre total en el Hemocentro de Cruz Roja Ecuatoriana. *Tesis-PUCE*, 46-63.
- Plaza, E., Lozano, M., Sánchez, I., & Egea, J. (Octubre de 2012). Evaluation of platelet function during extended storage in additive solution, prepared in a new container

- that allows manual buffy-coat platelet pooling and leucoreduction in the same system. *Blood Transfusion*, 10(4), 487.
- Quintero, M. (2014). Evaluación del estrés oxidativo en plaquetas obtenidas por aféresis en comparación con plaquetas obtenidas a partir de sangre total y su impacto sobre la funcionalidad. *Universidad de Talca Chile*, 1-113.
- Quinteros, M., Atea, J., & Ruiz, S. (2014). Registro de temperatura de envíos de hemocomponentes. *Transfusion Medicine*, 1-5. doi:10.1109/ARGENCON.2014.6868517
- Ravindra, S., Nealman, M., Pankaj, M., & Sumitra, D. (2009). Quality assessment of platelet concentrates prepared by platelet rich plasma-platelet concentrate, buffy coat poor-platelet concentrate (BC-PC) and apheresis-PC methods. *Transfusion Science*, 3(2): 86–94. doi: 10.4103/0973-6247.53882.
- Reina, I., & Moreno, A. (2011). Control de calidad de los concentrados plaquetarios en el Banco Metropolitano de Sangre. *Medicina Transfusional*, 1-4.
- Ringwald, J., & Antoon, M. (2014). Residual aggregates in platelet products: what do we know? *Vox Sanguinis*, 106, 209-218.
- Rivera, M., Fernández, R., Montes, E., Villegas, R., & Islas, S. (17 de Junio de 2011). Contaminación bacteriana de hemocomponentes. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 58(3), 151-155.
- Rubio-García, V. (2013). Rendimiento Plaquetario en paciente crítico. *Tesis-Universidad de Oviedo Centro Internacional de Posgrado*, 36-71.
- Ruiz, E. (2006). Antiagregantes Plaquetarios. *Revista Peruana de Cardiología*, 32(1), 29–38.
- Simon, D., Kunicki, T., & Nugent, D. (2008). Platelet function defects. *Haemophilia*, 14(6), 1240–1249. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2008.01898.x>

- Szalai, G., LaRue, A. C., & Watson, D. K. (2006). Molecular mechanisms of megakaryopoiesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(21), 2460–2476. <http://doi.org/10.1007/s00018-006-6190-8>
- Soleimany, A. (2012). Platelet Activation in Stored Platelet Concentrates: Comparison of Two Methods Preparation. *Journal of Hematology*, 1(1), 15-19. doi:10.4021/jh103e
- Torres, C., Benito, J., & Gayá, A. (Julio de 2007). Calidad del plasma rico en plaquetas: estudio de la activación plaquetaria. *Rev Esp Cir Oral y Maxilofac*, 29(4), 242.
- Thomas, S. (2016). Platelets: handle with care. *Transfusion Medicine*, 26(5), 330–338. <http://doi.org/10.1111/tme.12327>
- Van Der Meer, P. (2016). PAS or plasma for storage of platelets ? A concise review. *British Blood Transfusion Society*. <http://doi.org/10.1111/tme.12325>
- Van Der Meer, P., & Dumont, L. (2015). Aggregates in platelet concentrates. *Vox Sanguinis*, 108, 96-125. doi:DOI: 10.1111/vox.12184
- Vuk, T., Strauss, M., Gulan, J., Ocic, T., Sarlija, D., & Jukic, I. (2013). Quality control of leucocyte-depleted platelet concentrates obtained by buffy-coat method. *Transfusion Medicine*, 3–8. <http://doi.org/10.1111/tme.12051>
- Wasiluk, A., Kemon, H., Mantur, M., Polewko, A., Ozimirski, A., & Milewski, R. (2013). Expression of P-selectin (CD62P) on platelets after thrombin and ADP in hypotrophic and healthy, full-term newborns. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 26(13), 1321–1324. <http://doi.org/10.3109/14767058.2013.784251>
- Zumbado-Salas, G., Ramirez-Acosta, C., & Rodríguez-Pineda, M. (2015). Recolección de plaquetas mediante aféresis rendimiento y el efecto de las variables de los donadores en el proceso. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*, Vol 9: (2) 33-45.

ANEXOS

Anexo N° 1. Autorización del Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana



CONVENIO DE INVESTIGACIÓN CONJUNTA

En la ciudad de Quito a los 29 días del mes de noviembre de 2016, intervienen por una parte, la señora Victoria Albán Torres, en su calidad de Presidente Nacional y representante legal de la Sociedad Nacional Cruz Roja Ecuatoriana, a quien para efectos del presente instrumento se la denominará indistintamente CRE, CRUZ ROJA ECUATORIANA o LA INSTITUCION y por otra parte la señorita Clara Estefanía Arroyo Rubio, portadora de la Cédula de Ciudadanía No.- 0503533119 y la señorita Evelyn Katherine Jaramillo Ruales, portadora de la Cédula de Ciudadanía No.- 1003639844, por sus propios derechos; a quienes en adelante se denominarán LAS INVESTIGADORAS; quienes de forma libre y voluntaria convienen celebrar el presente CONVENIO DE INVESTIGACIÓN CONJUNTA, al tenor de las siguientes cláusulas:

PRIMERA. -ANTECEDENTES:

La Sociedad Nacional de la Cruz Roja Ecuatoriana, es una entidad autónoma, de derecho privado sin fines de lucro, constituida conforme las resoluciones de la Conferencia Internacional de Ginebra de 1864 y de los Principios de la Convención de Ginebra de 1906. Se fundó en la ciudad de Guayaquil el 22 de abril de 1910. Se la declaró Institución de Beneficencia y Utilidad Pública mediante Ley del Congreso de la República del 26 de octubre de 1910, publicada en el Registro Oficial No. 1392 del 14 de noviembre del mismo año.

La Sociedad Nacional de la CRUZ ROJA ECUATORIANA se regula por la ley que la constituyó, por los Convenios y Tratados Internacionales legítimamente aprobados por el Ecuador y por sus Estatutos. Es una corporación de derecho privado de aquellas reguladas por las disposiciones del título XXX del Libro Primero del Código Civil; y, sus actuales Estatutos fueron aprobados por el Ministerio Salud Pública, según Acuerdo 028, de 30 de marzo de 2016.

Por su parte LAS INVESTIGADORAS, por medio de la investigación conjunta a través del uso y aplicación de los laboratorios, muestras (65 Concentrados plaquetarios destinados para control de calidad en el transcurso de dos meses), insumos (130 Cuchillas Terumo TSCD Waffers para realizar conexiones estériles) y apoyo científico que LA SOCIEDAD NACIONAL DE LA CRUZ ROJA ECUATORIANA, brindará mediante el presente convenio A LAS INVESTIGADORAS, es que éstas, conjuntamente con CRE, procederán con la investigación referente a la viabilidad de los concentrados plaquetarios.

SEGUNDA.- OBJETO DEL CONTRATO.

El objeto del presente Contrato consiste entonces en la realización por parte de la CRUZ ROJA ECUATORIANA y LAS INVESTIGADORAS, de la investigación denominada: "Evaluación de la viabilidad de los concentrados plaquetarios a los tres, cinco y siete días de su obtención a partir de sangre total en el Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana en el periodo 2016"; investigación que en lo principal pretende determinar





Cruz Roja Ecuatoriana

Sede Central

-El Tribunal Arbitral está integrado por un solo árbitro designado de conformidad con la Ley de Arbitraje y Mediación.

-El Tribunal Arbitral decidirá en Derecho.

-Para la ejecución de medidas cautelares el Tribunal Arbitral está facultado para solicitar de los funcionarios públicos, judiciales, policiales y administrativos su cumplimiento, sin que sea necesario recurrir a juez ordinario alguno.

-Las partes consienten en someter cualquier disputa sobre daños extracontractuales que tengan cualquier relación con el presente contrato ante el mismo tribunal arbitral.

-El procedimiento arbitral será confidencial.

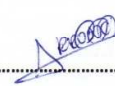
-El lugar de arbitraje será las instalaciones del Centro de Arbitraje y Mediación de la Cámara de Comercio de Quito.

-Las partes renuncian a la jurisdicción ordinaria, se obligan a acatar el laudo que expida el Tribunal Arbitral y se compromete a no interponer ningún recurso en contra del mismo, salvo el recurso de nulidad previsto en la Ley Arbitraje y Mediación.

En aquello atinente a los derechos morales y patrimoniales de los resultados de la investigación conjunta las controversias se tramitarán conforme la Ley de Propiedad Intelectual.

Las partes intervinientes ratifican en todas sus partes el contenido del presente Instrumento, sin reserva de ninguna clase y por convenir a sus intereses, para constancia de lo cual, lo firman por triplicado.


Victoria Albán T.
PRESIDENTA NACIONAL
CRUZ ROJA
ECUATORIANA


Srta. Clarita Estefanía
Arroyo Rubio
LA INVESTIGADORA


Srta. Evelyn Katherine
Jaramillo Ruales
LA INVESTIGADORA

Anexo N° 2. Autorización del Hospital Carlos Andrade Marín



INSTITUTO ECUATORIANO DE SEGURIDAD SOCIAL
HOSPITAL "CARLOS ANDRADE MARÍN"
Coordinación General de Investigación

Quito DM, 14 de noviembre 2016.

CERTIFICADO

Asunto: Expediente N° 130, recibido: 12 de agosto de 2016

La Coordinación General de Investigación del Hospital Carlos Andrade Marín, en ejercicio de las atribuciones conferidas por el Reglamento General de Unidades Médicas del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social, certifica el cumplimiento de los requisitos institucionales del protocolo de investigación:

Evaluación de la viabilidad de los concentrados plaquetarios a los tres, cinco y siete días de su obtención a partir de sangre total en el Hemocentro Nacional de Cruz Roja Ecuatoriana en el período 2016.

Investigadoras: Srta. Evelyn Jaramillo Ruales

Srta. Clara Arroyo Rubio

Atentamente,



Dr. Hugo Romo Castillo

COORDINADOR GENERAL DE INVESTIGACIÓN

HOSPITAL "CARLOS ANDRADE MARÍN"

PD: El Hospital Carlos Andrade Marín tiene derechos de propiedad intelectual sobre las investigaciones realizadas con sus pacientes. Al finalizar la investigación, los autores deberán entregar un resumen del estudio realizado bajo las normas de publicación de la Revista CAMBIOS.

Copia: archivo

Anexo N° 3. Consentimiento informado a donantes para extracción de un tubo extra



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo,..... he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados con fines científicos. Acepto participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

.....
Firma del participante o del padre o tutor

Fecha:.....

Esta parte deber ser completada por las Investigadoras:

Hemos explicado al Sr (a):..... la naturaleza, los propósitos de la investigación, los riesgos y beneficios que implica su participación. Hemos contestado a las preguntas planteadas por el participante. Hemos leído y conocemos la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y nos apegamos a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

.....
Clara Estefanía Arroyo Rubio

.....
Evelyn Katherine Jaramillo Ruales

Anexo N° 4. Control de calidad de los concentrados plaquetarios del "Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana"

N°	FECHA	# DE BOLSA	TIPO DE BOLSA (del concentrado plaquetario)	Fecha de recolección	Día de almacenamiento	T°	Vol	Aspectos Físicos			
								Color	Swirling (presencia o ausencia)	Grumos (presencia o ausencia)	Sueldas (S/N)
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											


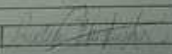
**Anexo N°4. Control de calidad de los concentrados plaquetarios del
"Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana"**

N°	Contaje celular			pH (≥6.2)	Contaminación bacteriana (S/N)	Activación plaquetaria Óptimo:20-30% Regular: 31-50% Malo: >51%	Responsables
	Plaquetas ($>5.5 \cdot 10^{10}$ / Unidad)	Leucocitos residuales ($<0.12 \cdot 10^9$ / Unidad)	Eritrocitos residuales ($<1.2 \cdot 10^9$ / Unidad)				
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							

Anexo N° 5. Registro de transporte de CPQs

	ORIGEN	DESTINO
UNIDAD	Hemocentro de la Cruz Roja Ecuatoriana	Hospital Carlos Andrade Marín
TEMPERATURA	_____	_____
FECHA	_____	_____
HORA	_____	_____
RESPONSABLE	_____	_____

Anexo N° 6. Control de calidad de medios de cultivo

CERTIFICADO DE CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO (Agares - Semisólidos - Líquidos)				Codigo:	F-MDC-032
				Edición:	00
				Fecha Aprobación:	15/08/2018
MACRO PROCESO: Vigilancia Epidemiológica y Laboratorio de Referencia Nacional.		PROCESO INTERNO: Centro de Referencia Nacional de Medios de Cultivo.			
OMBRE: Agar-Sangre de Borrego / Agar EMB					
OTE: 98EMB182117		CANTIDAD: 3 Unidades			
ECHA DE RECEPCIÓN: 20 de Enero del 2017					
ECHA DE ELABORACIÓN: 16 de Enero del 2017					
ECHA DE EXPIRACION: 16 de Febrero del 2017 a 2-8 °C					
CARACTERÍSTICAS FÍSICAS					RESULTADOS
OLOR:	Rojo / Púrpura				CONFORME
OLUMEN:	24 ml. D.U				CONFORME
PRESENTACION:	Cajas Bipétri Plásticas				CONFORME
N:	7.3 ± 2 a 25°C / 7.2 ± 0.2 a 25°C				7.3 / 7.2
CONTROL DE ESTERILIDAD A 35°C ± 2 °C POR 24 HORAS					RESULTADOS
A 36°C X 24 HORAS NO SE OBSERVO MACROSCÓPICAMENTE NI MICROSCÓPICAMENTE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS					N/A
EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA CON INCUBACIÓN A 35°C ± 2 °C 48 HORAS (NORMA ISO 751133-2)					RESULTADOS
Microorganismo	Características Físicas / Características Químicas	Selectividad	Productividad		
Agar Sangre de Borrego					
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	CRECIMIENTO COLONIAS PUNTIFORMES CON BETA HEMOLISIS QUE POR TINCIÓN DE GRAM SE OBSERVA COCOS GRAM POSITIVOS	NO	SI	CONFORME	
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	CRECIMIENTO COLONIAS BLANCAS MEDIANAS SIN PRESENCIA DE HEMOLISIS QUE POR TINCIÓN DE GRAM SE OBSERVAN COCOS GRAM POSITIVOS	NO	SI	CONFORME	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	CRECIMIENTO COLONIAS UMBRICADAS CON ALFA HEMOLISIS QUE POR TINCIÓN DE GRAM SE OBSERVAN COCOS GRAM POSITIVOS	NO	SI	CONFORME	
Agar EMB					
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	MACROSCÓPICAMENTE PRESENTA COLONIAS VIOLETAS CON BRILLO METÁLICO (-) OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA CRECIMIENTO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS	NO	SI	CONFORME	
<i>Xerosisella pneumoniae</i> ATCC 700602	MACROSCÓPICAMENTE PRESENTA COLONIAS VIOLETAS CON BRILLO METÁLICO (-) OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA CRECIMIENTO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS	NO	SI	CONFORME	
<i>Salmonella enteritidis</i> INSP-26	MACROSCÓPICAMENTE PRESENTA COLONIAS INCOLORAS CON BRILLO METÁLICO (-) OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA CRECIMIENTO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS	NO	SI	CONFORME	
% Productividad		N/A	N/A	N/A	
Nota: El certificado de control de calidad microbiológico solo respalda el parametro de productividad de crecimiento de microorganismos.					
Responsable:		MGS. Q.F Sandra Uruchima Campoverde		Firma: 	

Anexo N° 7. Prueba de homogeneidad de varianzas- pH/días de almacenamiento

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,885	2	189	,058

Anexo N° 8. Prueba de normalidad- pH/ días de almacenamiento

Almacenamiento		Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Estadístico	gl	Sig.
pH	3	,061	64	,200*
	5	,068	64	,200*
	7	,067	64	,200*

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Anexo N° 9. Prueba de homogeneidad de varianzas- activación plaquetaria/días de almacenamiento

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,015	2	189	,985

Anexo N° 10. Prueba de normalidad- activación plaquetaria/ días de almacenamiento

Almacenamiento		Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Estadístico	gl	Sig.
Activación_1_raiz	3	,076	64	,200*
	5	,090	64	,200*
	7	,077	64	,200*

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Anexo N° 11. Prueba de homogeneidad de varianzas- activación/ swirling

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,561	3	188	,641

Anexo N° 12. Prueba de normalidad- activación plaquetaria/ swirling

		Kolmogorov-Smirnov ^a		
Swirling		Estadístico	gl	Sig.
Activación_1_raíz	Ausencia	,237	9	,155
	(+)	,145	13	,200*
	(++)	,095	58	,200*
	(+++)	,063	112	,200*

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Anexo N° 13. Prueba de homogeneidad de varianzas- activación/ lipemia

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,131	1	190	,289

Anexo N° 14. Prueba de normalidad- activación plaquetaria/ lipemia

		Kolmogorov-Smirnov ^a		
Lipemia		Estadístico	gl	Sig.
Activación_1_raíz	Ausencia	,052	156	,200*
	Escasa	,077	36	,200*

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Anexo N° 15. Prueba de homogeneidad de varianzas- activación/ burbujas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2,700	1	190	,102

Anexo N° 16. Prueba de normalidad- activación plaquetaria/ burbujas

Burbujas		Kolmogorov-Smirnov ^a		
		Estadístico	gl	Sig.
Activación_raíz	Ausencia	,054	172	,200*
	Presencia	,086	20	,200*

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Anexo N° 17. Equipos y reactivos

Cámara agitadora de plaquetas



Equipo hematológico SYSMEX XT 1800i



Citómetro de flujo FACS Canto II



Anticuerpos monoclonales



Anexo N° 18. Procesamiento de las muestras

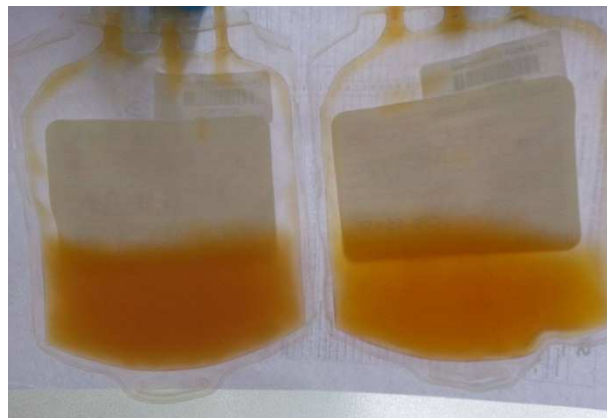
- Extracción de la muestra a donantes voluntarios



- Fraccionamiento de hemocomponente



- Medición de aspectos físicos



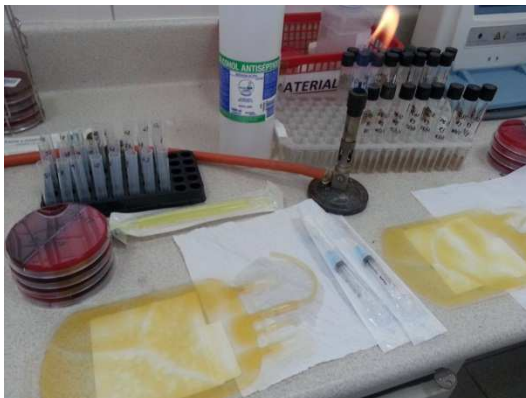
- Control de temperatura de la cámara agitadora de plaquetas y ambiental



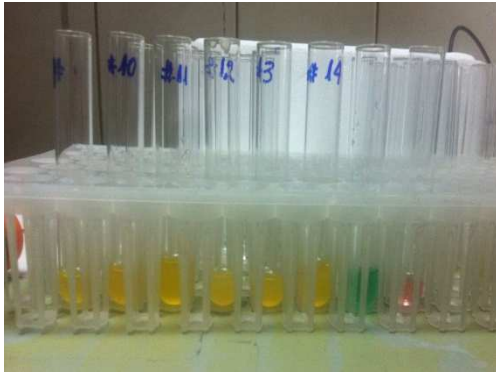
- Alícuotas de los concentrados plaquetarios a los 3 y 5 días de almacenamiento



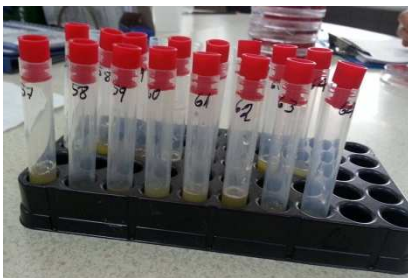
- Cultivo microbiológico



- Análisis de pH



- Contaje Celular



- Activación plaquetaria

