



Palacio de Convenciones de La Habana, Cuba
15 al 19 de mayo de 2023

Confección y evaluación del panel celular para la liberación de hemoclasificadores. Laboratorio Nacional de Control.

María del Carmen Reyes Vega^{1*}
Somja Benoit Hernández¹
Angélica García Arechavaleta¹
Ananidia Rivero Duperey¹
Carmen Fernández Molina¹

¹Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: mcreyes@cecmed.cu

RESUMEN

Introducción: El Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos establece requisitos regulatorios específicos para los diagnosticadores Clase de riesgo D, entre ellos los reactivos hemoclasificadores.

Objetivos: Confeccionar un panel celular para la liberación de los reactivos hemoclasificadores y evaluar su funcionabilidad a los 3 años de su confección.

Métodos: Se colectaron 38 unidades de Concentrado de eritrocitos en solución aditiva sin capa leucoplaquetaria y fueron fenotipados por método serológico para los sistemas de grupos sanguíneos ABO, Rh, Kell, Duffy, MNS, Kidd, Lewis, Lutheran, P, Xg y Hh. Se almacenaron en congelación (-70 °C) con glicerol al 40 % y a los 3 años se evaluó la funcionalidad a todas las muestras.

Resultados: Se obtuvo un panel celular con presencia de antígenos eritrocitarios del sistema de grupos sanguíneos ABO (A₁, A₂, B, A₁B y A₂B), Rh (D, D^u, C, c, E, e, C^w) y antígenos de baja frecuencia de los sistemas Kell (K, k, Kp^a, Kp^b), Duffy (Fy^a, Fy^b), Kidd (Jk^a, Jk^b), Lewis (Le^a, Le^b), MNS (M, N, S, s), P (P₁), Lutheran (Lu^a, Lu^b), Xg (Xg^a), Hh (H). El grado de reacción de aglutinación no disminuyó a los 3 años de congelado. Un ligero grado de hemólisis en el 34,9 % de las muestras no afectó la funcionabilidad del panel.

Conclusiones: En el Laboratorio Nacional de Control se confeccionó y evaluó la funcionabilidad de un panel celular para la liberación de los hemoclasificadores.

Palabras clave: paneles, eritrocitos, anticuerpos irregulares, diagnosticadores.

INTRODUCCIÓN

El Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED) establece requisitos generales y específicos que deben ser cumplidos por el fabricante de los dispositivos médicos para el diagnóstico in vitro (DMDIV), conocidos en Cuba como diagnosticadores, donde se incluyen los hemoclasificadores.⁽¹⁾

En tal sentido los hemoclasificadores son diagnosticadores diseñados que permiten ser utilizados en la identificación de los grupos sanguíneos, para asegurar la compatibilidad inmunológica de la sangre, los componentes sanguíneos, las células, tejidos u órganos destinados a la transfusión o trasplante. Dichos reactivos se clasifican dentro del grupo de mayor riesgo (Clase de Riesgo D).⁽²⁾

Para realizar los controles necesarios que garanticen la efectividad, seguridad y calidad de estos reactivos es imprescindible disponer de un panel celular de eritrocitos con la presencia de antígenos de la gran mayoría de los sistemas de grupos sanguíneos, tanto de alta como de baja frecuencia.⁽³⁾

Un Panel Celular (PC) es un conjunto de muestras de eritrocitos reactivos preparados a partir de sangre humana de donantes con dotaciones de antígenos que permitan establecer un patrón de reactividad coincidente con los antígenos de diferentes grupos sanguíneos.⁽⁴⁾⁽⁵⁾

En la verificación analítica de los diagnosticadores deben ser utilizados los paneles de referencia, que tienen como desventaja que son materiales biológicos obtenidos de poblaciones demográficamente diferentes y podrían no reflejarla frecuencia de antígenos presentes en la población cubana.⁽⁶⁾

La adecuada preservación de los PC ha sido una constante en el desarrollo de los Bancos de Sangre. En tal sentido, los dos métodos utilizados actualmente son: en soluciones líquidas y la cri conservación.⁽⁷⁾

Los PC se pueden conservar en congelación. Esta práctica ha existido por más de 50 años, sin embargo, no es utilizada comúnmente porque su técnica es engorrosa, costosa y con un potencial riesgoso de contaminación bacteriana.⁽⁸⁾

El objetivo de nuestro trabajo es confeccionar y evaluar la funcionabilidad de un panel celular para la liberación de reactivos hemoclasificadores en el Laboratorio Nacional de Control (LNC).

MÉTODOS

Confección del Panel Celular.

Se colectaron 38 unidades de Concentrado de eritrocitos en solución aditiva sin capa leucoplaquetaria (CEAD) de diferentes donantes, previo consentimiento informado.

El tipaje celular a las unidades de CEAD se realizó a partir de una muestra del tubo de la bolsa; con hemoclasificadores monoclonales anti-A, anti-B, anti-AB, anti-D y el Suero Antiglobulínico Humano (Suero de Coombs) fabricados por LABEX y SPINREACT S.A.

Los procedimientos de identificación de antígenos eritrocitarios a cada muestra se realizaron por serología, empleando la técnica de hemoaglutinación en tubo y Prueba de Antiglobulina Indirecta según lo establecidos por la Organización Mundial de la Salud.⁽⁹⁾

Congelación y descongelación de los eritrocitos:

En el proceso de la congelación de los eritrocitos se utilizó como ACPel glicerol al 40 % para todas las muestras.

Al volumen de eritrocitos a congelarse le añadió la mitad de la solución de glicerol al 40 % gota a gota con agitación suave y constante, se mantuvo en reposo de 5 a 10 min a temperatura de 20 a 25 °C. Seguidamente se agregó de igual forma la otra mitad de la solución de congelación y se repitió la operación anterior. La mezcla se envasó en porciones de 1 mL en micro tubos o tubos de crioconservación de 1,5 mL. Se identificó cada muestra con la etiqueta establecida y se almacenaron a -70 °C.

El concentrado de eritrocitos se descongeló exponiéndolo a temperatura de 20 a 25 °C, posteriormente se traspasó el volumen de eritrocitos descongelado a un tubo de reacción y se sometió a un proceso de desglicerolización añadiendo solución de glicerol al 12 %, se mezcló cuidadosamente y se centrifugó durante 3 min a 2000 rpm; a continuación se realizó un lavado con solución de glicerol al 5 %, otro lavado con cloruro de sodio hipertónico y finalmente dos lavados con solución salina al 0,9 %.

Evaluación de la funcionabilidad del panel celular.

En la evaluación de la funcionabilidad de las 38 muestras del PC después de 3 años de congeladas se evaluaron las siguientes variables:

1. Expresión de los principales antígenos de las muestras del panel.

Se evaluaron los antígeno A y B a las muestras de los fenotipos A, B y AB, respectivamente, el antígeno D a las muestras del grupo O RhD positivo, a las muestras O RhD negativo o el antígeno Fy^a y a las muestras O RhD negativo con Fy^a negativo, el antígeno M.

Se midió el grado de reacción de la aglutinación presente en las muestras en tiempo cero (antes de la congelación) y posteriormente a los 3 años de criopreservadas.

Una vez descongeladas las muestras de eritrocitos se prepararon diluciones al 2 % con solución salina al 0,9 % y se empleó la técnica de hemoaglutinación en tubo:

Se dispensaron 50 µL de la suspensión de eritrocitos al 2 % de cada una de las muestras en un tubo de reacción, se adicionó 50 µL de cada antisuero a probar, anti-A, anti-B, anti-D y anti-M, según corresponde; se incubó 5 min a temperatura de 20 a 25 °C y se centrifugó 1 min a 1000 rpm. La determinación del antígeno Fy^a se realizó por la PAI. Las lecturas se realizaron sobre una lámpara o aglutinoscopio. El resultado positivo se determinó por la presencia de aglutinación y se anotó el grado de reacción de la aglutinación.

Grados de reacción de aglutinación según metodología utilizada por Aburto Almonacid A:⁽¹⁰⁾

2. Evaluación del grado de hemólisis siguiendo la metodología de Sánchez Frenes P.⁽¹¹⁾

Se comprobó el grado de hemólisis cualitativo, por inspección visual del sobrenadante de la suspensión de eritrocitos.

Grado I - Halo de 5 mm por encima de la capa de eritrocitos.

Grado II - Halo de 5 a 10 mm por encima de la capa de eritrocitos.

Grado III - Hemólisis total del sobrenadante.

Grado 0 - No hay hemólisis

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Confección del panel.

A partir de las 38 unidades analizadas se obtuvieron muestras con presencia de antígenos eritrocitarios frecuentes del sistema ABO (A₁, A₂, B, A₁B y A₂B), muestras con el antígeno D Débil y muestras del grupo sanguíneo O con antígenos de los sistemas diferentes del ABO. En la Tabla 1 se muestra la conformación del panel celular y la cantidad de muestras requerida para la evaluación de la potencia, especificidad y avidéz de los reactivos hemoclasificadores. Por no considerarlo necesario no se describen las características completas del PC.

Tabla 1. Panel celular para la evaluación de los hemoclasificadores en el LNC

Panel celular para la evaluación de los hemoclasificadores en el LNC					
Fenotipos	Código de la muestra (PIH)	Muestras requerida para la evaluación de potencia, especificidad y avidéz			
		Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Anti-D
A ₁ RhD+	05B y 07T	2	2	1	-
A ₁ ccddee	06T	-	-	-	1
A ₂ RhD+	26B	-	-	2	-
A ₁ B RhD+	01B, 03B, 06B, 07B, 20B, 27B	-	2	3	-
A ₁ B ccddee	14B	-	-	1	1
A ₂ B RhD+	02B, 08B	2	-	2	-
B RhD+	01T, 10B, 15B	2	2	2	-
B ccddee	12B	-	-	-	1
OccDee	05T, 28B, 32B	-	-	-	2
OCcDee	03T, 17B, 21B	-	-	-	1
OCCDee, K	09B	-	-	1	-
OCCDEe	29B, 30B	2	2	2	-
OCcDEe	02T	-	-	1	-
OccDEe	16B, 04T	-	-	-	1
OCcddee	18B	-	-	-	1
Occddee	13B, 19B	-	-	-	1
OCcD ^u ee	22B	-	-	-	-
OccD ^u ee	23B	-	-	-	1
A ₁ D Débil	04B, 11B, 24B, 25B	-	-	-	1

Ocho fenotipos del grupo sanguíneo O que expresan los antígenos H, Le^a, Le^b, K, k, Kp^b, P₁, D, C, c, E, e, C^w, M, N, S, s, Lu^a, Lu^b, Jk^a, Jk^b, Fy^a, Fy^b y Xg^a, fueron seleccionados para determinar la presencia de anticuerpos irregulares diferente a la especificidad de los reactivos hemoclasificadores. De ellos se escogieron para la evaluación de los hemoclasificadores anti-A, anti-B y anti-AB las muestras con código PIH 16B, PIH 03T, PIH 09B y adicionalmente las muestras PIH 05T y PIH 29B para completar la totalidad de los antígenos que no se encontraban presentes en las muestras seleccionadas. Las muestras del grupo O RhD negativas con presencia de antígenos diferentes del sistema ABO se seleccionaron para la evaluación del hemoclasificador anti-D. (Tabla 2)

Tabla 2. Muestras del Panel celular para la determinación de anticuerpos irregulares.

Muestras del panel para determinación de anticuerpos irregulares	
Reactivos Anti-A, Anti-B, Anti-AB Anti-D	Muestras del Panel PIH 16B, PIH 03T, PIH 09B, PIH 05T, PIH 29B 13B, PIH 18B, PIH 19B,

Evaluación de la funcionabilidad del panel celular.

Al evaluar la funcionabilidad de los eritrocitos del PC para su uso *in vitro* se determinó en el 100 % de las muestras la expresión de los principales antígenos en tiempo cero y después de 3 años de conservados a - 70 °C. (Fig. 1a y Fig. 1b).

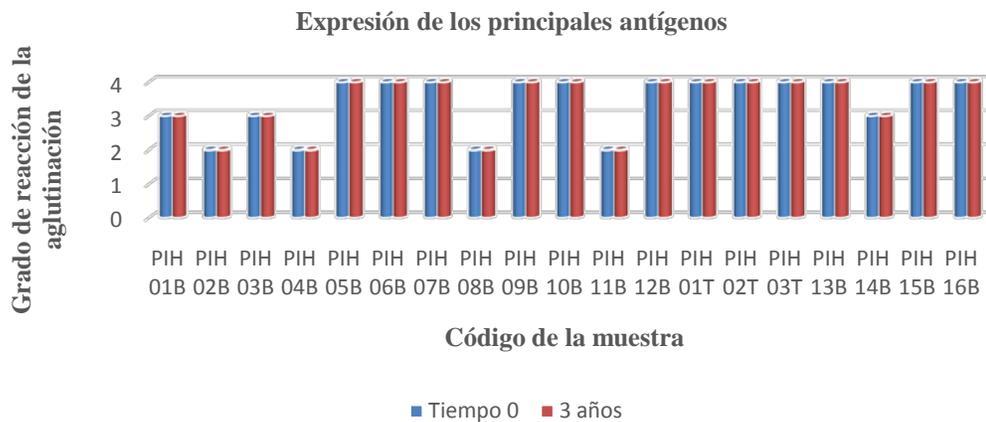


Fig. 1a Evaluación de la expresión de los principales antígenos, antes de congelar (tiempo 0) y a los 3 años de congeladas a - 70 °C. (PIH 01B a PIH 16B).

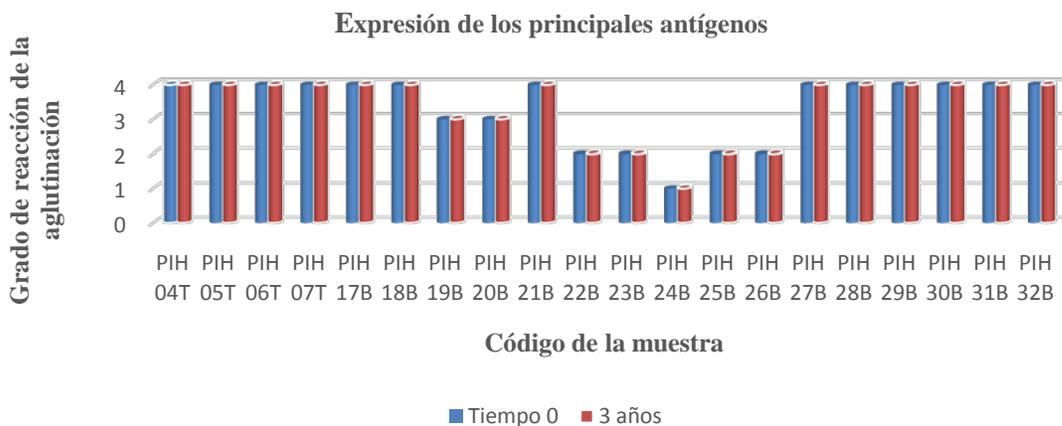


Fig. 1b Evaluación de la expresión de los principales antígenos, antes de congelar (tiempo 0) y a los 3 años de congeladas a - 70 °C. (PIH 04T a PIH 32B).

En las 38 muestras (100 %) el grado de reacción de la aglutinación no disminuyó al evaluarlo 3 años después de congeladas a - 70 °C en comparación con el estudio inicial que se realizó antes de la congelación.

El grado de hemólisis se comprobó en el 100 % de las muestras a los 3 años de congeladas a - 70 °C, por el método de inspección visual del sobrenadante a la suspensión de eritrocitos. En 23 muestras (60,5 %) no se observó hemólisis (Grado 0). En 15 de ellas (39,4 %) se observó una ligera hemólisis (Grado I) y no se observaron muestras con hemólisis Grado II ni Grado III.(Fig. 2a y Fig. 2b).

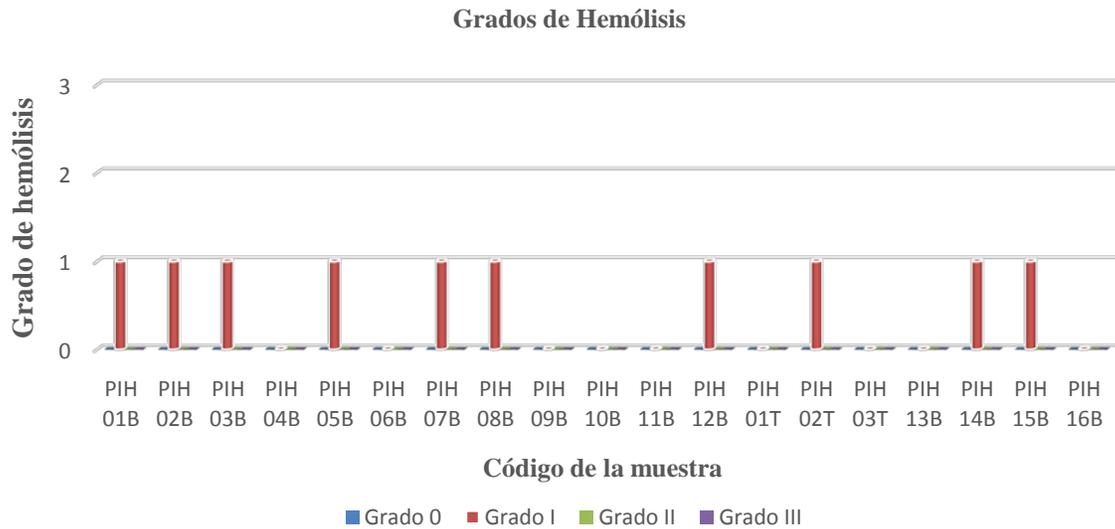


Fig. 2a - Evaluación del grado de hemólisis a los 3 años de congeladas (PIH 01B a PIH 16B)

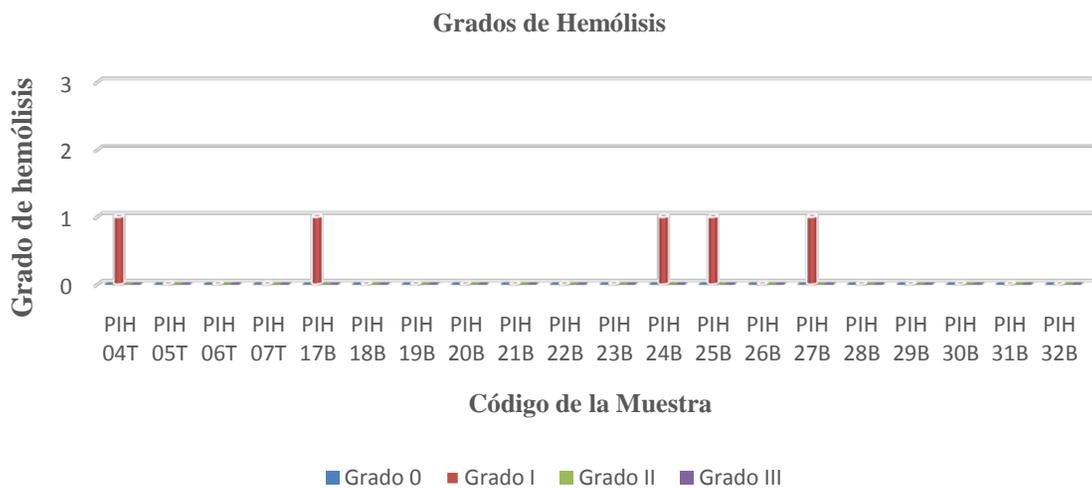


Fig. 2b - Evaluación del grado de hemólisis a los 3 años de congeladas (PIH 04T a PIH 16B)

Como ya se ha mencionado, los reactivos hemoclasificadores desempeñan un importante papel en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de enfermedades inmunohematológicas y en la calidad de las prácticas transfusionales.⁽¹²⁾

Tanto las normas y guías internacionales como el CECMED establecen el uso de Materiales de Referencia Internacionales, para la verificación analítica de los diagnosticadores. El suministro

restringido y su elevado costo limitan su utilización en el trabajo del laboratorio, por lo que fue necesario confeccionar un PC para la liberación de lotes de hemoclasificadores.^{(13) (14)}

En nuestro estudio, se emplearon 38 unidades de CEAD para la confección de un PC, fueron transportadas en condiciones de conservación de 2 a 8 °C y mostraron resultado negativo en las pruebas de detección Sífilis, Virus de la Hepatitis B, Virus de la Hepatitis C y del Virus de Inmunodeficiencia Humana 1 y 2 para asegurar la ausencia de contaminación viral. Las muestras fueron procesadas antes de los 7 días de extraídas.^(15, 16)

En los ensayos de fenotipaje se utilizaron reactivos y eritrocitos de control del PC del laboratorio de Inmunohematología del IHI, equipos y medios de medición del LNC calibrados y en periodo de validez.⁽¹⁷⁾

En el panel se decidió incluir fenotipos de fácil adquisición de los grupos y subgrupos sanguíneos A, B, AB y D Débil por no existir un Banco de Sangre lo suficientemente cerca del LNC para la obtención de estos fenotipos en el momento del ensayo.

El PC dispone adicionalmente con muestras de tres donantes de fenotipo A₁B RhD positivo, un donante de fenotipo B RhD positivo, cuatro donantes con presencia del antígeno D Débil y cuatro de fenotipo O RhD positivo, los que pueden ser utilizados en caso de encontrarse Resultados Fuera de Especificaciones que requiere de fenotipos de donantes diferentes, además, cuenta con la presencia de los 23 antígenos más importantes, en algunos de ellos los antígenos c, Fy^a, Fy^b y S en forma homocigótica.⁽¹⁸⁾

Las muestras con presencia de antígenos I, Js^b y U no fueron seleccionados por no disponer del antisuero específico, estos antígenos son de frecuencia reducida o extremadamente raros, a los que se les denomina privados.⁽¹⁹⁾

Se requiere de un donante más del fenotipo A₂ y O RhD negativo con presencia del antígeno E, en estos casos se utilizarán muestras de sangre recién extraída de donantes fenotipados previamente de los cuales dispone el LNC. Estos fenotipos son de muy baja frecuencia en la población cubana 8,26 % y 0,56 %, respectivamente.⁽²⁰⁾

Con el panel que se confeccionó se pueden evaluar los reactivos cumpliendo con la cantidad de muestras que exigen las regulaciones vigentes.⁽²¹⁾

Servicios de Inmunohematología en otros países elaboran eritrocitos de fenotipos conocidos en el que se incluyen los fenotipos más comunes de sus poblaciones.⁽²²⁾

La Food and Drug Administration (FDA, por sus siglas en inglés) como Autoridad Reguladora Nacional de los Estados Unidos de América, permite almacenar los eritrocitos congelados con glicerol al 40 % (p/v) a -80 °C hasta 10 años luego de su recolección y requiere que las células descongeladas y desgliceroladas sean almacenadas a 4 °C por no más de 24 horas.⁽²³⁾

El glicerol, también conocido como propanotriol o glicerina, es un compuesto químico líquido inodoro, incoloro y viscoso cuya fórmula molecular es C₃H₈O₃. Su densidad es de 1,261 g/cm³, su punto de fusión es 291 K y su punto de ebullición es 563 K.⁽²⁴⁾

Otros autores demostraron la estabilidad fenotípica y genotípica de microorganismos y especies bacterianas empleando la congelación con glicerol a diferentes concentraciones y temperatura de almacenamiento de -20 °C a -70 °C.^(25, 26)

En Cuba estos eritrocitos son conservadas por congelación a -20 °C, utilizando el glicerol como crioprotector, aunque son muy pocos los centros asistenciales que disponen actualmente de un PC, a excepción de las utilizadas para la determinación del grupo sanguíneo serológico que por su fácil obtención son conservadas como sangre total con poca durabilidad.

En 1966, con la creación del IHI, se introducen nuevos métodos de detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios y estudios de frecuencia de grupos sanguíneos ABO, con el empleo de

métodos tradicionales (técnicas en salina, albúmina y prueba de antiglobulina), utilizando PC de eritrocitos fenotipados, conservados a -20 °C.⁽²⁷⁾

Al evaluar la funcionalidad del panel celular, para su uso *in vitro* después de 3 años conservadas con glicerol al 40 % a una temperatura de -70 °C, se demostró que no existe disminución de la expresión de los principales antígenos al no disminuir el grado de reacción de la aglutinación. A pesar de que el 34,9 % de las muestras presentan una ligera hemólisis de Grado I no se ha afectado la fuerza de aglutinación, por lo que mantienen su funcionalidad y se continúan utilizando en los ensayos, siempre que se verifique su reactividad, como control de calidad previo al uso.

La conservación se puede hacer por diferentes métodos y uno de los que brinda mejores resultados ha demostrado ser el glicerol.

Como resultado de este trabajo podemos concluir que el LNC del CECMED dispone de un panel celular para realizar el control analítico de los reactivos hemoclasificadores para ser utilizados en el SNS.

La recomendación del grupo investigador es establecer estandarizaciones y protocolos propios, atendiendo a los procedimientos de congelación, descongelación y temperaturas de conservación, que garanticen la viabilidad y estabilidad bioquímica de los eritrocitos que se conserven por este método.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Regulación D 60-2018. Liberación de lotes de diagnosticadores. La Habana: CECMED; 2018.
2. Regulación No. 50-2012. Clase de riesgo de los diagnosticadores. La Habana: CECMED; 2012.
3. Organización Mundial de la Salud. National standards for blood transfusion service [Internet]. Ginebra: OMS; 2013
4. Alfonso Y, Bencomo A. Procedimientos para la detección e identificación de anticuerpos eritrocitarios. RCHIH. 2001; v.17 n.2.
5. Bencomo Hernández A, Aquino Rojas S, González Díaz I, Chang Monteagudo A, Morera Barrios LM, Rodríguez Leyva R. Caracterización de los antígenos y anticuerpos eritrocitarios en pacientes en espera de trasplante renal. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter [Internet]. 2016; 32(2):223-235.
6. Therapeutic Goods Administration (AU). Regulatory requirements for in-house IVDs [Internet]. Australia: TGA; 2018
7. Guía sobre la transfusión de componentes sanguíneos y derivados plasmáticos. Sociedad Española de Transfusión Sanguínea y Terapia Celular. SETC. 5ª edición. 2015.
8. Ávila-Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, et al. Fundamentos de criopreservación. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol. 57 No. 4. 2006.
9. Safe Blood and Blood Products. Blood Group Serology. Module 3. World Health Organization, reprinted 2009.
10. Aburto A. Recomendaciones para la detección e identificación de anticuerpos irregulares eritrocitarios. Documentos técnicos para el laboratorio clínico. Instituto de Salud Pública de Chile. 2014.
11. Sánchez P, Cuellar Y, Sánchez MJ, Oropesa M, Reinaldo K, Collazo S. Preparación de células control para la prueba de antiglobulina humana. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab 2014; 61 (4): 241-245.
12. Guide to the preparation, use and quality assurance of Blood Components. European Committee (Partial Agreement) on Blood Transfusion (CD-P-TS) EDQM 19th Edition 2017. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare.

13. Regulación No. D 59-2021. Requisitos de los diagnosticadores utilizados en inmunohematología. La Habana: CECMED; 2021.
14. Technical Guidance Series (TGS) for WHO Prequalification - Diagnostic Assessment Panels for quality assurance and quality control of in vitro diagnostic medical devices. World Health Organization; 2017.
15. Montoro E, Moquete E. Manual de procedimientos de bioseguridad en el transporte de muestras biológicas en la Red Pública de Servicios. Código: PRO-TMR-003. Santo Domingo; 2014. p. 1-35.
16. Regulación M 91-20. Especificaciones de calidad de la sangre obtenida por donación y de sus componentes. La Habana: CECMED; 2020.
17. ISO/IEC 17025:2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.
18. Journal of Blood Group Serology and Molecular Genetics. American National Red Cross. Volume 31, Number 2, 2015.
19. Quezada N. Texto de hematología Clínica. Ondo Editorial Comunicacional del Colegio Médico del Perú. ISBN: 2017-06008. 2017.
20. Ballester JM. ABC de la Medicina Transfusional: Guías Clínicas. 2006.
21. United Kingdom Blood Transfusion Services. Guidelines for the Blood Transfusion Services in the United Kingdom. 8th ed. Londres: TSO; 2013. 414 p.
22. JL González. Anticuerpos irregulares su importancia en la medicina transfusional. RMIMSS. 2005. v 43.
23. Penuela O, et al. Preservación de eritrocitos y cambios físicos ocurridos durante el almacenamiento. Rev Fac de Med. 2003; 51(4):190-197.
24. ¿Qué es el glicerol? Beneficios y propiedades / Nutritienda. [Acceso 04/02/2022]. Disponible en: <https://blog.nutritienda.com/glicerol>
25. Sánchez LC, Corrales LC. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. ISSN: 1794-2470 VOL.3 No. 4. 2005:1-116.
26. Pérez-Reytor DC, Sosa AE. Evaluación de la tolerancia a la criopreservación de dos cepas de Escherichia coli K12 de uso frecuente en biotecnología. VaccMonitor 2010; Vol. 19 No. 2.
27. Alfonso ME; Bencomo A. Medicina transfusional e inmunohematología: aportes en cinco décadas de trabajo. RCHIH. 2017; 33(1).