

**BANCO DE SANGRE PROVINCIAL
SANTA CLARA, VILLA CLARA**

**VARIACIONES DE LA CALIDAD DE LOS PREPARADOS PLAQUETARIOS
CONSERVADOS A 4° C DURANTE 72 HORAS.**

Por:

Lic. Orlando Rivera Ramos¹, Dra. Sadi Bárbara Díaz Valdivia², Dr. José Luis Aparicio Suárez³ y Dr. Luis Carrillo Reyes⁴

1. Licenciado en Química. Profesor Auxiliar. Banco de Sangre Provincial.
2. Especialista de I Grado en Laboratorio Clínico. Hospital Universitario "Celestino Hernández Robau".
3. Especialista de I Grado en Hematología. Jefe del Grupo Provincial de Trasplante de Médula Ósea. Hospital Universitario "Arnaldo Milián Castro".
4. Médico Veterinario del Banco de Sangre Provincial.

Resumen

El mantenimiento de las propiedades de las plaquetas para transfusión durante su almacenamiento depende de forma importante de la temperatura de conservación. En este trabajo se evaluó la influencia de la temperatura (4° C) sobre la calidad de los concentrados de plaquetas y plasma rico en plaquetas contenidos en distintos sistemas de bolsas plásticas y conservados durante 72 horas. Para caracterizar las alteraciones ocurridas durante el almacenamiento de los concentrados de plaquetas y plasma rico en plaquetas se hicieron estudios *in vitro* al instante de haberlos obtenido, así como a las 24, 48 y 72 horas de conservación. Otro objetivo de este trabajo fue introducir la técnica del torbellino óptico para evaluar la calidad de los concentrados de plaquetas. En 42 muestras independientes se determinó: recuento de plaquetas, pH, estimación del torbellino óptico y respuesta al estrés hipotónico. En otras 47 muestras se hicieron las pruebas antes mencionadas, con excepción del torbellino óptico. Los resultados obtenidos demostraron que la temperatura de conservación (4° C) usada en la conservación de los preparados plaquetarios en nuestro centro, así como en el resto de los Bancos de Sangre del país, influye negativamente sobre la forma y sobrevida de las plaquetas, sobre todo después de las 24 horas de conservación. En cuanto a la técnica de torbellino óptico, se observó que es confiable y fácil de instaurar para efectuar el control de la calidad sistemático de las plaquetas que se utilizan para transfusión.

Descriptor DeCS:

CONSERVACION DE LA SANGRE/métodos
CONTROL DE CALIDAD
PLAQUETAS

Subject headings:

BLOOD PRESERVATION/methods
QUALITY CONTROL
BLOOD PLACKETS

Introducción

La utilización creciente de las transfusiones de plaquetas se ha traducido en una reducción muy importante de la incidencia de complicaciones hemorrágicas graves en pacientes con trombocitopenia consecutiva a insuficiencia medular¹. Este hecho ha traído como consecuencia

un aumento considerable de la demanda, tanto en cantidad como en la calidad de los concentrados plaquetarios (CP).

En respuesta a estos requerimientos, los Bancos de Sangre se han visto obligados a mejorar los procesos de obtención, preparación y almacenamiento de las plaquetas para ser utilizadas en transfusión. En las últimas dos décadas se han producido progresos notables en el conocimiento de los factores que afectan la conservación de las plaquetas en forma de concentrados². Es así como se han definido y estandarizado condiciones físicas, tales como:

- a) Fuerza centrífuga durante la preparación.
- b) Temperatura de almacenamiento.
- c) Recuento de plaquetas en el concentrado.
- d) Permeabilidad de la bolsa a los gases.

De todos los parámetros señalados, se sospecha que la temperatura de almacenamiento es uno de los factores que más está incidiendo negativamente sobre la calidad de los CP que se conservan en nuestro Banco de Sangre.

En nuestro país está establecido que en todos los Bancos de Sangre se conserven los CP a 4° C, pero a esta temperatura la glucólisis de las plaquetas queda prácticamente inhibida y, en consecuencia, el pH varía poco, incluso con altas concentraciones de plaquetas, y permanece por encima de 6,2 después de cuatro días de conservación³. No obstante, el enfriamiento a 4° C produce ciertos cambios en el trombocito, el cual pasa de su forma discoidal normal a forma esférica irregular (desarrollan múltiples pseudópodos) y esta alteración, causada por el frío en las estructuras de las plaquetas, se asocia con su agregación⁴. Además, es bien conocido que su supervivencia se hace menor en comparación con la de plaquetas frescas o conservadas a 22° C en constante movimiento².

Según varios autores^{5,6}, la supervivencia postransfusional de las plaquetas conservadas a 4°C es menor a la que se observa con plaquetas conservadas a 22° C; no obstante, se ha encontrado que *in vivo* estas plaquetas son capaces de corregir inmediatamente un alargamiento del tiempo de sangría inducida por la ingestión de aspirina en donantes transfundidos con sus propias plaquetas conservadas durante 72 horas a 4° C.

Las ventajas de la conservación de los CP a 4° C son:

- La cantidad de plasma por CP es menor (20-30 ml).
- Los riesgos de contaminación microbiológica son menores.

Sin embargo, aunque las plaquetas conservadas a 4° C sean capaces de corregir el tiempo de sangramiento, la notable disminución de su supervivencia desaconseja su utilización cuando no sólo se desea corregir un accidente hemorrágico, sino también garantizar al paciente que no se repitan tales accidentes durante algunos días¹.

El control de la calidad de los CP *in vitro* es esencial para asegurar *in vivo* una hemostasia adecuada en aquellos pacientes que son transfundidos.

Existen numerosas pruebas *in vitro*² e *in vivo*⁷ destinadas a evaluar la calidad de las plaquetas; sin embargo, en el trabajo habitual que se realiza en un Banco de Sangre es necesario disponer de pruebas sencillas y confiables que permitan determinar la calidad de los CP.

Por ello, en este trabajo nos proponemos determinar las variaciones de calidad durante el período de conservación a 4° C, así como introducir la técnica del torbellino óptico en el control sistemático de la calidad de los CP en nuestro Banco de Sangre.

Métodos

Se extrajo sangre total a 89 donantes voluntarios del sexo masculino, que no habían ingerido aspirina durante los quince días previos a la extracción y que nunca habían sido transfundidos. Además, se tuvo en cuenta que la extracción no tuviera un tiempo de duración superior a los 12

minutos, que la punción fuera limpia, y que la aguja hubiera penetrado firmemente en la vena al primer intento.

De estas extracciones, 42 se realizaron en bolsas alemanas de la firma Helm que poseen como solución anticoagulante 63 ml de citrato fosfato dextrosa y adenina (CPD-A1), para recolectar 450 ml de sangre; 22 extracciones se efectuaron en bolsas argentinas de la firma Rivero, con 70 ml de CPD como anticoagulante para recolectar 500 ml de sangre; 10 extracciones se hicieron en bolsas españolas de la firma Grifols, que tienen como anticoagulante CPD-A1 para 450 ml de sangre. Las restantes extracciones fueron hechas en bolsas japonesas de la firma JMS, que poseen como anticoagulante 63 CPD-A1, también para obtener 450 ml de sangre.

Todos los sistemas de recolección empleados en este estudio están formados por sistemas de bolsas plásticas triples.

Las bolsas de sangre total se mantuvieron a temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) hasta el momento de la centrifugación.

Los CP se obtuvieron por el método de doble centrifugación recomendado por la Asociación Americana de Bancos de Sangre (AABB)⁷ y por la Guía Europea de Preparación, Uso y Control de la Calidad de los Componentes Sanguíneos⁸.

La sangre total se centrifugó a 2500 rpm durante tres minutos a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ en una centrífuga japonesa (HITACHI); posteriormente se dejaron en reposo las bolsas centrifugadas por espacio de 15 minutos, y luego el plasma rico en plaquetas (PRP) fue trasladado para una de las bolsas satélites del sistema y centrifugado posteriormente a 3000 rpm durante 15 minutos a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ en la centrífuga antes mencionada.

Al botón plaquetario obtenido después de esta centrifugación se le agregó 50 ± 5 ml de plasma autólogo y se dejó reposar durante 60 minutos; posteriormente fueron desagregadas las plaquetas en un agitador horizontal. Este método utilizado por nosotros fue recomendado por Rivera⁹.

Una vez resuspendidas las plaquetas se procedió a la toma de muestra de cada una de las unidades estudiadas en tubos de ensayo plásticos bajo flujo laminar, y se evaluó en cada bolsa el torbellino óptico; luego los CP fueron conservados a 4°C , y se tomaron muestras de ellos a las 24, 48 y 72 horas de conservación.

La sangre total que fue recolectada en el sistema JMS (N=15), así como las 20 extracciones realizadas en bolsas Helm, fueron procesadas hasta la obtención de PRP, y se estudiaron las variaciones de este componente almacenado a 4°C durante 72 horas.

La toma de muestras del PRP se realizó de la misma forma y con el mismo intervalo de tiempo que se utilizó para los CP.

A las muestras de CP y PRP se les realizaron los siguientes análisis:

a) Recuento de plaquetas

Para los CP:

Se diluyeron 20 μl de muestra en 2000 μl de solución salina al 0,9 % y se dejó en reposo por espacio de 10 minutos; posteriormente se realizó el conteo de las plaquetas en cámara de Neubauer en un microscopio Olympus.

Para el PRP:

Se diluyeron 20 μl de la muestra en 1000 μl de solución salina al 0,9 %, según el mismo procedimiento utilizado para el CP.

b) Medición del pH:

El pH se determinó a temperatura ambiente en un pH-metro RETOMED, previa calibración con solución amortiguadora de pH = 6,0 y 8,0 respectivamente.

c) Torbellino óptico (según la técnica descrita por García¹⁰ y Gudiño²).

El torbellino se visualizó mediante una fuente luminosa al comprimir suavemente las paredes de la bolsa y fue graduado subjetivamente por dos observadores, de acuerdo con la siguiente escala:

- 0 = Sin torbellino.
- 1 = Torbellino difícil de visualizar.
- 2 = Torbellino fácilmente visualizado.
- 3 = Torbellino intenso y constante.

d) Respuesta al estrés hipotónico:

Para la evaluación del estrés hipotónico, tanto en los CP como en los PRP, se utilizó la técnica descrita por Farrugia y colaboradores¹¹, usando un espectrofotómetro SPEKOL 10. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis estadístico, y se les realizó la prueba t de Student para la comparación de medias para muestra pareadas. Se consideraron diferencias significativas cuando p fue menor que 0,05 (p < 0,05).

Resultados

La respuesta al estrés hipotónico de los CP preparados en distintos sistemas de bolsas plásticas y conservados a 4°C, disminuyó significativamente durante el almacenamiento, y se mantuvo en el rango establecido por González¹² para este componente (41,1-80,7 %) hasta las 24 horas, en los sistemas Helm y Grifols, y se encontraron por debajo de estos valores a las 24 horas en los CP conservados en bolsas plásticas Rivero (tablas 1-3).

Tabla 1 Variación de la calidad de concentrados de plaquetas conservados a 4° C durante 72 horas en bolsas plásticas Helm (N = 22).

Tiempo (h)	Estrés hipotónico a los dos minutos(%)	pH	Torbellino óptico	Plaquetas x 10 ⁹ /u
0	58,23 ± 13,13	7,00 ± 0,24	2,86 ± 0,35	85,86 ± 23,90
24	46,59 ± 13,48	6,93 ± 0,26	0,59 ± 0,50	90,21 ± 25,55
48	34,66 ± 10,49	6,87 ± 0,26	0,23 ± 0,43	73,27 ± 18,45
72	27,39 ± 9,53	6,78 ± 0,29	0	75,79 ± 23,40
0-24	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05
24-48	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,01
48-72	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,05	p > 0,05
0-72	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Tabla 2 Variación de la calidad de concentrados de plaquetas conservados a 4° C durante 72 horas en bolsas plásticas Rivero (N = 22).

Tiempo (h)	Estrés hipotónico a los dos minutos(%)	pH	Plaquetas x 10 ⁹ /u
0	63,04 ± 14,97	7,10 ± 0,08	64,68 ± 19,10
24	40,59 ± 8,82	7,03 ± 0,10	59,59 ± 20,38
48	33,09 ± 6,67	7,02 ± 0,14	55,27 ± 18,64
72	27,45 ± 5,38	7,01 ± 0,22	52,36 ± 19,74
0-24	p < 0,001	p < 0,01	P > 0,05
24-48	p < 0,001	p < 0,05	P > 0,05
48-72	p < 0,01	p > 0,05	P > 0,05
0-72	p < 0,001	p > 0,05	P > 0,01

Tabla 3 Variación de la calidad de concentrados de plaquetas conservados a 4° C durante 72 horas en bolsas plásticas Grifols (N= 10).

Tiempo (h)	Estrés hipotónico a los dos minutos(%)	pH	Plaquetas x 10 ⁹ /u
0	55,90 ± 4,58	7,33 ± 0,05	59,70 ± 9,23
24	42,00 ± 2,83	7,28 ± 0,04	59,30 ± 12,37
48	32,90 ± 5,28	7,23 ± 0,05	53,60 ± 7,44
72	25,60 ± 9,30	7,23 ± 0,06	50,00 ± 7,64
0-24	p < 0,001	p < 0,05	p > 0,05
24-48	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,05
48-72	p < 0,05	p > 0,05	p > 0,05
0-72	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,05

Los valores de pH de los CP estudiados se muestran en las tablas 1-3 respectivamente, y existió poca variación de los mismos durante los días de conservación.

Al analizar las variaciones del torbellino óptico durante el período de conservación de los CP obtenidos en el sistema Helm (tabla 1), se observó un descenso brusco en su puntuación a las 24 horas de su conservación a 4° C.

Cuando se investigaron las variaciones en el recuento de plaquetas de los CP almacenados en los diferentes sistemas estudiados (tablas 1-3), se halló una disminución significativa del mismo entre el inicio y final de la conservación, y quedaron fuera del rango establecido (> 55 x 10⁹/u) a las 72 horas de conservación en los casos en los que se usaron los sistemas Helm y Grifols.

En las tablas 4 y 5 se muestran las variaciones de la respuesta al estrés hipotónico de los PRP conservados por 72 horas a 4° C en bolsas Helm y JMS; se observó que hasta las 24 horas los valores se encontraban dentro del rango establecido por González¹². Asimismo, los valores del pH encontrados durante la conservación del PRP a 4° C durante 72 horas en bolsas plásticas Helm y JMS, se mantuvieron dentro de los parámetros establecidos para los preparados plaquetarios (6,2 - 7,4).

El torbellino óptico de los PRP conservados en bolsas Helm (tabla 4) fue significativamente afectado dentro de las primeras 24 horas de almacenamiento.

En el recuento plaquetario de los PRP (tablas 4y 5) se observó que en ambos casos hubo una disminución en el número de plaquetas durante el período de conservación, pero en ambos casos el número de plaquetas se mantuvo dentro de los parámetros establecidos (> 0,55 x 10⁹/u) para los preparados plaquetarios.

Tabla 4 Variación de la calidad de plasma rico en plaquetas conservados a 4° C durante 72 horas en bolsas plásticas Helm.

Tiempo (h)	Estrés hipotónico a los dos minutos(%)	pH	Torbellino óptico	Plaquetas x 10 ⁹ /u
0	60,55 ± 7,23	7,24 ± 0,03	2,90 ± 0,31	103,38 ± 25,73
24	43,80 ± 7,08	7,23 ± 0,04	0	95,15 ± 17,85
48	36,18 ± 5,51	7,21 ± 0,10	0	90,65 ± 25,90
72	30,63 ± 7,13	7,19 ± 0,09	0	91,47 ± 22,48
0-24	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,05
24-48	p < 0,001	p < 0,05	0	p < 0,05
48-72	p < 0,01	p < 0,05	0	p > 0,05
0-72	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,001	p > 0,05

Tabla 5 Variación de la calidad de plasma rico en plaquetas conservados a 4° C durante 72 horas en bolsas plásticas JMS (N =15).

Tiempo (h)	Estrés hipotónico a los dos minutos(%)	pH	Plaquetas x 10 ⁹ /u
0	64,13 ± 11,15	7,40 ± 0,05	123,23 ± 32,15
24	50,93 ± 10,56	7,34 ± 0,05	86,05 ± 32,69
48	39,20 ± 7,04	7,31 ± 0,05	72,19 ± 35,40
72	35,60 ± 9,72	7,31 ± 0,10	71,19 ± 22,97
0-24	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,001
24-48	p < 0,001	p < 0,05	p < 0,05
48-72	p < 0,05	p < 0,05	p > 0,05
0-72	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

Discusión

La disminución en la respuesta al estrés hipotónico por parte de los preparados plaquetarios (CP y PRP) en los distintos sistemas de bolsas plásticas empleados se debió a que la supervivencia plaquetaria se ve afectada cuando las plaquetas se exponen al frío^{3,4,13}. Estudios realizados por Murphy y Garduer¹⁴ demostraron la pérdida de la viabilidad en las plaquetas almacenadas a 13 y 30° C durante 24 horas en comparación con plaquetas conservadas a 22° C. También Gottschall y colaboradores¹⁵ realizaron estudios en los que se confirma la pérdida de la viabilidad plaquetaria con el almacenamiento a largo plazo (más de 24 horas) a temperaturas inferiores a 20° C. Asimismo, otros autores¹⁶ plantean que los CP obtenidos por el método de PRP tienen las plaquetas más activadas en las primeras 48 horas después de la recolección que cuando los CP se obtienen a partir de la capa leucoplaquetaria.

A temperatura de 4° C la glucólisis de las plaquetas queda inhibida y en consecuencia el pH varía poco, incluso con altas concentraciones de plaquetas, y permanece por encima de 6,2 después de tres días de conservación³. La caída de un pH por debajo de 6 se asocia a cambios morfológicos irreversibles en las plaquetas y a una marcada reducción de la viabilidad postransfusional^{1,2}.

En los Estados Unidos la Federación de Drogas y Alimentos (FDA) requiere valores de pH > 6,0 en todas las unidades de plaquetas chequeadas en el control de calidad al final de la conservación¹⁷.

La forma discoide de las plaquetas contenidas en un CP refleja un resplandor opalescente (torbellino óptico) cuando se observa en contra de una luz^{2,10}.

Algunos autores² concluyen que cuando los CP son preparados y conservados en condiciones habituales, la presencia de resplandor correlaciona bien con los valores de pH y, por lo tanto, está asociada con buena viabilidad de las plaquetas. Sin embargo, recomiendan más estudios para investigar si la viabilidad de las plaquetas *in vivo* está alterada cuando el resplandor está ausente, pero el pH es adecuado.

Esta técnica del torbellino óptico tiene la ventaja de no ser invasiva y no requiere ningún tipo de instrumentación. Esta prueba quizás pudiera reemplazar pruebas sistemáticas en el control de la calidad de los CP. Los productos pudieran ser chequeados por la presencia de remolino con resplandor opalescente y sólo podría evaluarse el pH en aquellos productos en los que esté ausente este fenómeno¹⁸.

La exposición de las plaquetas al frío (4° C) incluye un cambio irreversible de la membrana de las mismas, pues pasan de su forma discoidea normal a forma esférica³; la forma de disco es esencial para la función celular y sobrevivida.

En los CP estudiados por nosotros observamos que hubo una disminución significativa en el recuento de plaquetas durante el período de conservación, y quedaron fuera de los parámetros establecidos al final de la conservación, en aquellos casos en que el conteo inicial de plaquetas estaba próximo al valor mínimo exigido para este componente. García¹⁰ y Camargo¹⁹ también obtuvieron disminución en el recuento de plaquetas en CP conservados por cinco días a 22° C con movimiento constante.

Asimismo, en los casos que conservamos PRP durante 72 horas a 4° C, encontramos disminución en el número de plaquetas.

Summary

The maintenance of the platelet properties for transfusion during its storage mainly depends on preservation temperature. The influence of temperature (4°C) on quality of platelet and platelet-containing plasma concentrates contained in different types of plastic bags and preserved during 72 hours was assessed in this work. *In vitro* studies were carried out at the moment of obtainment as well as at 24, 48, and 72 hours of preservation to characterize changes occurred during the storage of the platelet and platelet-containing plasma preparations. Another objective of this work was to introduce the technique of optic whirlwind to evaluate quality of platelet preparations. In 42 independent samples the following features were established: platelet count, pH, optic whirlwind estimation and response to hypotonic stress. In other 47 samples, the above mentioned tests, except optic whirlwind, were carried out. Results show that preservation temperature (4°C) used in platelet preparation preservation in our center, as well as the remaining blood banks of the country, negatively influences on form and survival of platelet mainly after 24 hours of preservation. Regarding the whirlwind technique it was noted that it is reliable and easy for systematic quality control of platelet used in transfusion.

Referencia bibliográficas

1. Linares E. Plaquetaféresis. Viejos y nuevos aspectos. *Rev Arg Transf* 1998;24(3):149-156.
2. Gudiño MD. Pruebas de laboratorio *in vitro* para demostrar la calidad de los productos de plaquetas. *Rev Arg Transf* 1997;23(2):137-150.
3. Genetet B, Mannoni P. La transfusión. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1980:141-165.
4. Mados P, Lluch A. Preparación de concentrados plaquetarios. *Sangre* 1985;30(4-c): 758-761.
5. Valeri C. Hemostatic effectiveness of liquid preserved and previcushy frozen human platelet. *N Engl J Med* 1974;22:290-353.
6. Valeri C, Feingold H, Marchiome L. The relation between response to hypotonic stress and the % recovery *in vivo* in preserved platelets. *Transfusion* 1974:314-331.
7. Standard Committee: Standard of Blood Banks and Transfusion Service. 19th ed. Bethesda, MD: American Association of Blood Banks; 1997.
8. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 5th ed. Concencil of Europe Publishing. Editions du conseil de l'Europe 1999.
9. Rivera O, Cruz M, Gómez E. Estandarización del método de obtención de CP en bolsas plásticas. *Medicentro* 1998;supl 1. URL disponible en: <http://www.vcl.sld.cu/medicentro>
10. García P, Pereira J, Pizarro I, Mezano D. Conservación de concentrados plaquetarios en bolsas de primera generación. Estudio de sus características *in vitro*. *Rev Arg Transf* 1994; 20(4):120-124.
11. Farrugia A, Hognes C, Douglas S, Neal M, James J. Microlitre plate measurement of platelet response to hypotonic stress. *J Clin* 1989;42:1298-1301.
12. González I, Cruz Y, Basanta P, Vázquez D. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1986;2(3):120-134.
13. Morera LM. Concentrados de plaquetas 1 *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1990;6(1):29-43.
14. Murphy S, Garduer FH. Effect of storage temperature in maintenance of platelet viability deleterious effects of refrigerant storage. *N Engl J Med* 1969;280:1094-098.
15. Gottshall JI, Rzad L, Aster RH. Studies of the minimum temperature at which human platelets can be stored with full maintenance of viability. *Transfusion* 1986;26:460-462.

16. Castro E. Nuevas técnicas de preparación de componentes sanguíneos. *Rev Arg Transf* 2001;27(3):275-281.
17. USA, 21 Code of Federal Regulations (CFR), Part 1996;640(24).
18. Bertolini F, Murphy S. A multicenter inspection of the swirling phenomenon in platelet concentrates prepared in routine practice. *Transfusion* 1996;36:128-132.
19. Torre R, Cattáneo C, Carnevali L. Control de calidad de concentrados plaquetarios. *Rev Arg Transf* 1999;25(3):196-197.