



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
CENTRO DE ESTUDIOS DE
BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

**“Obtención de Reactivos Dobles
Conjugados para el uso en
Citometría de Flujo”.**

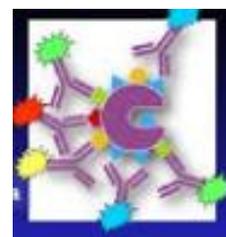
**Tesis en Opción al Título Académico de
Máster en Biotecnología.
Mención Biotecnología Industrial.**

Autora: Ing. Yanet Rivero Fernández.

Tutores: Dra.C. Suyén Rodríguez Pérez.
MSc. George Fernández Duharte.

Consultante: Dra.C. Teresita Rodríguez
Obaya.

**Santiago de Cuba
2020**



Dedicataria

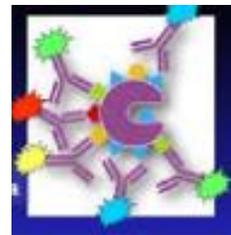
Dedicatorias

A mi esposo por estar siempre a mi lado, dándome fuerzas, confianza y ánimo para seguir siempre adelante enfrentando todas las adversidades.

A mi amada hija, que es la flor de mis alegrías, como ejemplo de generosidad y sacrificio.

A mis padres queridos por educarme y forjar lindos sentimientos en mí y el carácter de cumplir con todas las metas propuestas.

A mi querido hermano Carlos E. por estar siempre ahí.



Agradecimientos

Agradecimientos.

A mi esposo por su gran consideración, amor y fuerzas para seguir adelante.

A mi mamá por siempre estar cada vez que la necesito, dando ánimo y ejemplo para continuar con mis metas.

A mi adorada hija por sacarme una sonrisa en los momentos más estresantes.

A mi tutora Suyen, por su gran apoyo y experiencia en la realización de este trabajo y en mi formación como profesional.

A mi tutor George, por brindarme su apoyo y sus consejos para el logro de este trabajo.

A mis amigas y amigo por siempre estar en los momentos que los necesito, Saraí, Sandra y Henry.

Al claustro de profesores de la maestría por los conocimientos y la ayuda brindada.

A todos mis compañeros de la maestría y en especial a José A.

A mis compañeros del LABEX y del CIM especialmente a Grisel, Rydell, Osmany, Lisset, Giorkys, Niubis, Lisandra, Rafael G., Andro, Nelsa, Yudelmis, Mirley, Olga, por sus aportes imprescindibles en la ejecución de los trabajos experimentales y por el apoyo técnico.

A la compañera Melvys del Hospital Camilo Cienfuegos, de la provincia de Sancti Spíritus por su colaboración como técnica para la realización del trabajo experimental.

Al departamento de Calidad y Economía.

A todas las personas que de cierta forma contribuyeron conmigo en este largo proceso, que me ha permitido estar hoy aquí y en especial a aquellas otras que nunca confiaron en mí y sin percatarse me convirtieron en una persona fuerte y retadora para la vida.

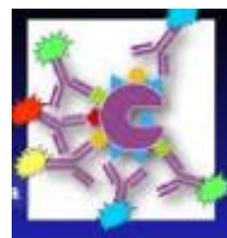
A todos muchas Gracias.



Resumen

Resumen.

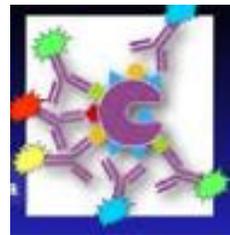
Los reactivos antiCD dobles conjugados con fluorocromos, brindan la posibilidad de identificar las variedades de leucocitos en sangre periférica humana, permitiendo su uso en diagnóstico para los pacientes con inmunodeficiencias, entre otros. En el país se utiliza este reactivo importado, limitando su disponibilidad para el Sistema de Salud Cubano; por lo que, en el LABEX, se investiga la obtención de reactivos para uso en Citometría de Flujo, teniendo una línea de productos de AcM antiCD como base diagnóstica. Para analizar los riesgos de la propuesta productiva del producto *ior*[®] *LeukoCIM antiCD* se aplicó la metodología de calidad HACCP, donde se identificaron 8 peligros potenciales y 24 puntos críticos, de los cuales 19 afectan la calidad del reactivo; descargándose su seguimiento a través de planes de medidas y vigilancia. En la propuesta de obtención de este reactivo para su mejora, se ensayaron simples conjugados del antiCD4 (PE, FITC) y dobles conjugados, en diferentes combinaciones (antiCD4-PE/antiCD45-FITC, antiCD4-PE/antiCD3-FITC, antiCD20-PE/antiCD3-FITC). En los simples conjugados antiCD4 se obtiene un 31.93 % de reconocimiento, apropiado como actividad biológica para el conjugado con PE y de 44.3 %, para el conjugado con FITC; correspondiendo a la dilución 1/20 y 1/5, respectivamente. Sin embargo, para las propuestas de reactivos dobles conjugados, cuando se utiliza el antiCD4-PE se recomienda trabajar con la dilución 1/10; pero existe afectación del reconocimiento, que no cumple para este AcM conjugado. Para el antiCD45-FITC se puede trabajar en cualquier dilución, sin afectación del marcaje. En las combinaciones antiCD3-FITC con antiCD4-PE y antiCD20-PE, se cumple con el porcentaje de reconocimiento, mayor a 73 % en ambas propuestas. También para el antiCD20-PE se refiere un 6.35 % como actividad biológica en rango, para su doble conjugado. Este estudio permitió establecer requisitos de mejoras para la obtención del reactivo doble conjugado en LABEX, en particular para el antiCD4-PE, abriendo paso a la fase desarrollo del producto para así alcanzar su posterior registro sanitario.



ABSTRACT

Abstract

The reagents with double antiCD conjugated with fluorochromes provide the possibility of identifying different subpopulations of panleukocyte, allowing their use in diagnosis for patients with immunodeficiencies, among others. This reagent is imported to use in the country, limiting its availability for the Cuban Health System. Therefore, in LABEX, the obtaining of reagents for use in Flow Cytometry is being investigated, having a line of antiCD mAb products as a diagnostic support. To analyze the risks of the productive proposal of the Ior[®] LeukoCIM antiCD product, the HACCP quality methodology was applied, where 8 potential hazards and 24 critical points were identified, of which 19 affect the quality of the reagent; downloading its monitoring through measures and surveillance plans. In the proposal to obtain this reagent for its improvement, single conjugates of antiCD4 (PE, FITC) and double conjugates were tested, with different combinations (antiCD4-PE/antiCD45-FITC, antiCD4-PE/antiCD3-FITC, antiCD20-PE/antiCD3-FITC). In the simple antiCD4 conjugates, is obtained a 31.93% and 44.3% recognition, appropriate as biological activity for the conjugate with PE and FITC, corresponding to the 1/20 and 1/5 dilution, respectively. However, for the proposals of double conjugated reagents, when using antiCD4-PE it is recommended to work with the 1/10 dilution; nevertheless using the antiCD45-FITC could work in any dilution, without affecting marking. In the combinations antiCD3-FITC with antiCD4-PE or antiCD20-PE, the recognition percentage is higher than 73% in both proposals. Also for antiCD20-PE, is referred to as biological activity in range, 6.35%, for its double conjugate. This study made it possible to establish quality improvement for obtaining the double conjugated reagents in LABEX, in particular for the antiCD4-PE requirement, opening the development phase of the product in order to achieve its subsequent health register.



Glosario de Términos

Glosario de Términos.

AcM: anticuerpo monoclonal.

Ac: Anticuerpo.

Ag: Antígeno.

APP: Análisis de Preliminar de Peligros.

C.F: Citometría de Flujo.

CPPC: Control de Peligros y Puntos Críticos.

CV: Coeficiente de Variación.

CIM: Centro de Inmunología Molecular.

CIGB: Centro de Ingeniería Genética.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DTT: Ditioneitol.

Fab: Fragmento de unión al antígeno (fragment antigen union).

Fc: Fragmento cristalizante.

FPLC: Cromatografía líquida rápida para proteínas (Fast Protein Liquid Chromatography).

FSC: dispersión frontal de la luz (forward scatter).

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína.

F/P: Relación FITC/Proteína.

GMBS: 4- Meleimidobutyric acid N- hydroxysuccinimide ester.

HC: Cadena pesada (heavy chain).

HACCP: Análisis de peligro y Puntos Críticos de Control.

HPLC: Cromatografía líquida de proteínas de alto rendimiento (High Performance Liquid chromatography).

I.F.I: Inmunofluorescencia Indirecta.

I.F.D: Inmunofluorescencia Directa.

Ig: Inmunoglobulina.

IFA: Ingrediente Farmacéutico Activo.

Iss: Individuo supuestamente sano.

LABEX: Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales.

LAM: Líquido Ascítico Murino.

LC: Cadena ligera (light chain).

MINSAP: Ministerio de Salud Pública de Cuba.

NEM: N- Ethylmaleimide.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

PBS: Buffer Fosfato Salino 0,01M pH 7, 2.

PC: Puntos Críticos.

PCC: Puntos Críticos de Control.

PM: Plan de Medidas.

PV: Plan de Vigilancia.

PE: Ficoeritrina.

SNC: Sistema de Salud Nacional.

SSC: dispersión lateral de la luz (side scatter).

SPDP: 3- (2-Pyridyldithio) propionie acid N-hidroxysuccinimide ester.

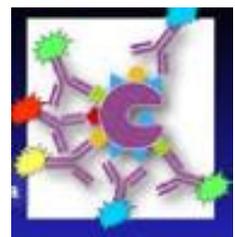
SMCC: 4- (N- Maleimidomethyl) cyclohexanecarboxylie acid N-hidroxysuccinimide ester.

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

SGC: Sistema de gestión de Calidad.

SOD: método de Severidad, Consecuencia, Probabilidad y Ocurrencia.

V: volumen.

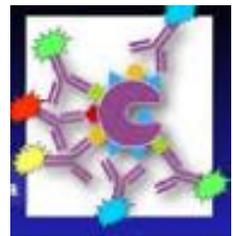


Índice

Índice

I. Introducción.....	1
II. Revisión Bibliográfica.....	4
2.1 Componentes celulares del sistema Inmunológico y su relación con la producción de Anticuerpos.....	4
2.2. Obtención de Anticuerpos Monoclonales.....	5
2.3. Métodos inmunoquímicos como base del Inmunodiagnóstico.	7
2.3.1. Técnicas de Inmunofluorescencia.	8
2.3.2. Compuestos fluorescentes: Fluorocromos.	9
2.3.3. Conjugados con Fluorocromos.	12
2.4. Citometría de Flujo.....	13
2.5. Uso de reactivos diagnosticadores en Cuba.....	16
2.6. Gestión de Calidad con enfoque a reducción de Riesgos en la Industria Biotecnológica.....	17
2.6.1. Metodologías de Gestión de Riesgo.....	18
2.6.2. Evaluación de los Riesgos.....	22
2.6.3. Valoración del Riesgo.....	23
2.6.4. Medidas Correctivas y Preventivas.....	23
III. Materiales y Métodos.....	25
3.1. Análisis de Peligro y Puntos Críticos de Control del proceso productivo de Marcadores Leucocitarios.....	25
3.2. Obtención del Anticuerpo Monoclonal Purificado antiCD.....	26
3.3. Simples Conjugados.....	27
3.3.1. Obtención del AcM Conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC). 27	
3.3.2. Obtención del AcM conjugado con β -Ficoeritrina (PE).....	28
3.4. Obtención del Reactivo Doble Conjugado.....	30
3.4.1. Determinación de la Actividad Biológica al Producto Conjugado.	30
3.5. Valoración económica.....	31
IV. Resultado y Discusión.....	32

4.1.1.- Análisis de Peligros y Puntos Críticos de los Marcadores Leucocitarios.	32
4.2.- Implementación de mejoras al producto: ior [®] antiCDs conjugados.....	38
4.2.1.- Obtención de los Conjugados Simples antiCD.	38
4.2.2.- Influencia del fluorocromo en la conjugación con el anticuerpo antiCD4.	44
4.3.- Obtención de reactivos Dobles Conjugados para su reconocimiento por Citometría de Flujo.....	46
4.3.1. Análisis de la variabilidad del reactivo de LABEX por diferencias entre técnicos (analistas).	54
4.4. Evaluación de un reactivo doble conjugado, antiCD4-PE/antiCD3-FITC para inmunofenotipaje de linfocitos T.....	56
4.5. Evaluación de un reactivo doble conjugado para reconocimiento de linfocitos B.....	58
4.6. Valoración Económica de la obtención de los conjugados para citometría de flujo.	60
V. Conclusiones	64
VI. Recomendaciones	66
VII. Bibliografía.....	68
VIII. Anexos.....	78



Introducción

I. Introducción.

El sistema inmunitario es una red compleja de células (como los linfocitos), tejidos (ej. linfáticos) y órganos (como el timo) que trabajan juntos para defender al cuerpo de sustancias extrañas o gérmenes (antígenos); tales como, las bacterias, los virus o las células tumorales. Dentro de este sistema, los leucocitos constituyen poblaciones celulares presentes en sangre, que median en la respuesta inmune a través de mecanismos de fagocitosis (como granulocitos) o a través de la producción de anticuerpos (como los linfocitos T y B) (<http://chemocare.com/es/chemotherapy/what-is-chemotherapy/el-sistema-inmunitario>). Las afectaciones del sistema inmune, provocan serios problemas para la salud individual, generándose por respuestas exacerbadas a sustancias que en general no son dañinas, por deficiencias inmunitarias y/o por trastornos que causan que el sistema inmunitario ataque por error a nuestras propias células (<http://medlineplus.gov/spanish/medlineplus>). Para su seguimiento, se requieren reactivos que permitan detectar la “diana molecular” y que brinde información sobre el estado de salud del personal afectado, considerado al paciente sujeto del diagnóstico.

Según la Regulación 20/2004 se denomina **diagnosticadores** a los reactivos, juegos de reactivos, sistema, calibradores, controladores o medios de cultivo, destinados por el fabricante a ser utilizados *in vitro* en el estudio de muestras procedentes del cuerpo humano con el objetivo de proporcionar información relativa a un estado fisiológico o patológico, o a una anomalía congénita o para supervisar medidas terapéuticas (CECMED, 2004). A nivel mundial los diagnosticadores se han desarrollado de forma acelerada y se consideran elementos básicos en la eficiencia, la eficacia y la efectividad de la medicina moderna. Dentro de los atributos que se impone para un diagnosticador, enunciados en la Reg. 42/2005, se encuentran una alta sensibilidad analítica, especificidad, un rango elevado de medición y poseer trazabilidad contra estándares internacionales (CECMED, 2005).

El diagnóstico, tratamiento y seguimiento oportuno y acertado de las enfermedades requiere, entre otros factores, de diagnosticadores efectivos, seguros y con una calidad acorde. El fallo en el funcionamiento de un diagnosticador implica un riesgo para la salud del individuo que puede acarrear consecuencias desde casi insignificantes hasta muy graves (CECMED, 2008). Por su alta especificidad, numerosos Anticuerpos Monoclonales (AcM) han sido integrados como parte de reactivos de diagnóstico. Existen varias plataformas tecnológicas para revelar estos reactivos de inmunodiagnóstico, entre las que se

encuentran, por ejemplo: la Citometría de Flujo, la Microscopía, la Espectrofotometría, Turbidimetría, entre otras.

La citometría de flujo es un método analítico, basada en una inmunofluorescencia indirecta (IFI), que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido, que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad y por supuesto, cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo. Esta técnica es empleada en el conteo de subpoblaciones de linfocitos en pacientes con inmunodeficiencias humanas, así como la caracterización de leucemias agudas y síndromes linfoproliferativos crónicos, entre otros padecimientos (Barry, 2004)

CIM-LABEX cuenta con las instalaciones preliminares, el personal capacitado y el equipamiento fundamental, para el diseño de la tecnología de obtención de reactivos simples y dobles conjugados de AcM, que permitan su utilización en los estudios de caracterización inmunofenotípica de linfocitos, utilizados principalmente en el seguimiento de inmunodeficiencias. Actualmente se desarrollan investigaciones para proveer de una línea de productos de inmunodiagnósticos, basados en AcM y Fluoróforos de producción propia.

El hecho de tener un producto diagnosticador doble conjugado de Ac con fluorocromos diferentes, nos brinda la posibilidad de identificar y cuantificar la población de leucocitos humanos en sangre periférica de pacientes, posibilitando hacer un pronóstico de diferentes enfermedades de origen inmuno-hematológico detectadas. Se puede disponer en nuestros centros hospitalarios de un método diagnóstico con un menor costo, para hacer más rápido la identificación, seguimiento, a pacientes con leucemias, linfomas y el SIDA. Esto ofrece también la posibilidad de insertar al CIM como proveedor de estos productos, en el mercado nacional e internacional.

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, para el desarrollo de las investigaciones objeto de este trabajo, se propone el siguiente marco metodológico:

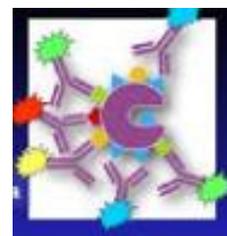
Problema: Nuestro país no cuenta con reactivos diagnosticadores que combinen Anticuerpos conjugados con Fluorocromos, para identificar y enumerar subpoblaciones linfocitarias para uso en Citometría de Flujo.

Hipótesis: Si se obtienen anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos específicos para el reconocimiento de distintos linfocitos, es posible obtener reactivos diagnosticadores para la identificación de subpoblaciones leucocitarias por Citometría de Flujo.

Objetivo General: Evaluar variantes de anticuerpos simples y dobles (antiCD) conjugados con fluorocromos, para el desarrollo de reactivos de marcaje de poblaciones linfocitarias por Citometría de Flujo.

Objetivos específicos.

- Evaluar los riesgos del proceso productivo de Marcadores Leucocitarios para Citometría de Flujo, implementado en LABEX.
- Evaluar los conjugados de anticuerpos antiCD4 con dos fluorocromos (PE: Ficoeritrina y FITC: Isotiocianato de Fluoresceína,).
- Comprobar el desempeño de dobles conjugados de anticuerpos antiCDs con los dos fluorocromos de ensayo, para el marcaje de subpoblaciones linfocitarias.
- Determinar el costo del reactivo doble conjugado y evaluar su factibilidad para la sustitución de importaciones.



Revisión Bibliográfica

II. Revisión Bibliográfica.

2.1 Componentes celulares del sistema Inmunológico y su relación con la producción de Anticuerpos.

En la clasificación de las células del sistema inmune tipificadas mediante el uso de los diagnosticadores, se encuentran los leucocitos o glóbulos blancos, cuya función radica en proteger el organismo como parte del sistema inmune, contra agentes patógenos causantes de enfermedades. Estos pueden dividirse en tres poblaciones celulares (**Anexo 1**): (Abbas, 2010)

- Los **granulocitos** se forman en la médula ósea, representan el 70% de los leucocitos, su función es la de fagocitosis de microbios participando en la inmunidad contra las bacterias, parásitos y alergias, presentan gránulos en su citoplasma y núcleo lobulado. Se dividen en tres tipos de células: los neutrófilos con dos a cinco lóbulos nucleares; Los eosinófilos con núcleo bilobulado y los basófilos con núcleo irregular en forma de “S”.
- Los **monocitos** son células grandes, que representan el 5% de los leucocitos, poseen un núcleo en forma de herradura; se mueven activamente tornándose macrófagos y su función es la fagocitosis de microorganismos patogénicos.
- Los **linfocitos** que representan el 25% de los leucocitos, poseen un núcleo regular que ocupa casi todo el volumen de la célula, su función es garantizar la inmunidad de los organismos. Estos se clasifican en linfocitos “T” y “B”. Los linfocitos T se forman en la médula ósea y migran posteriormente al timo y son los responsables de la inmunidad celular. El papel de los linfocitos B es la producción de los anticuerpos y son por lo tanto responsables de la inmunidad humoral.

Los **anticuerpos** (Ac) son producidos en respuesta a la invasión de moléculas foráneas en el cuerpo, nombradas antígenos. Cada Ac se define como una inmunoglobulina (Ig) capaz de una combinación específica con el antígeno que ha causado su producción en un biomodelo susceptible (**Anexo 2**) (Abbas, 2010).

La definición clásica de **antígeno** (Ag) es cualquier sustancia foránea que incita una respuesta inmune, cuando se introduce dentro de tejidos de animales susceptibles y que son capaces de combinar con los anticuerpos específicos formados. Los antígenos son generalmente de alto peso molecular y comúnmente son de naturaleza proteica o polisacáridica. Aunque otras moléculas de menor

peso molecular también pueden funcionar como antígenos; por ejemplo, polipéptidos, lípidos y ácidos nucleicos (Kumagai y Tsumoto, 2001).

Los anticuerpos existen como una o más unidades en forma de Y, compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas. Cada unidad (Y) contiene dos copias idénticas de una cadena pesada (HC, *Heavy chain*) y dos copias idénticas de una cadena ligera (LC, *Light chain*); llamadas así, por sus pesos moleculares relativos que son de aproximadamente 50 kDa y de 25 kDa, respectivamente. Estas cadenas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuros S-S intercatenarios y pueden separarse por reducción y acidificación (**Anexo 2**).

Las partes de las regiones hipervariables del anticuerpo que contactan con el antígeno se denominan paratopos y la región de un antígeno que puede específicamente unirse a un anticuerpo es llamado epítotope (Abbas y Lichtman, 2004).

Los anticuerpos pueden ser divididos en cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, basado en el número de unidades Y y en el tipo de cadena pesada (Abbas, 2010). El anticuerpo más abundante en circulación es la IgG, por lo que es muy comúnmente usado en ensayos inmunoquímicos para su seguimiento.

Los anticuerpos son producidos naturalmente por los linfocitos B en los mamíferos. Cada estirpe de linfocito B presente en el cuerpo secreta un anticuerpo diferente, por lo que el suero sanguíneo constituye una fuente de anticuerpos heterogéneos (policlonales); siendo los anticuerpos de estructura homogénea (monoclonales), producidos por una estirpe única de linfocito B, los que se caracterizan por una especificidad constante, siendo muy útiles en el diagnóstico (Abbas, 2010).

El uso masivo de los anticuerpos monoclonales (AcM) en la investigación, el diagnóstico y la terapéutica de enfermedades del hombre, ha creado la necesidad de estrategias y métodos adecuados para su producción y purificación en cantidades y calidad suficientes, para cada aplicación específica (Rabell, 2014).

2.2. Obtención de Anticuerpos Monoclonales.

El primer método para producir anticuerpos homogéneos o monoclonales (anticuerpos clonados a partir de una sola célula madre) con una especificidad conocida, fue descrito por Georges Köhler y Cesar Milstein en 1975. El mismo se basa en la fusión de forma *in vitro* de una célula B (linfocito B) productora de anticuerpos, procedentes de un biomodelo previamente inmunizado (generalmente

ratón), con una célula de mieloma con la capacidad de dividirse indefinidamente en cultivo celular. Como resultado de esta unión se obtienen los llamados hibridomas, con la capacidad de multiplicarse rápida e indefinidamente y a la vez capaz de secretar el anticuerpo codificado por el linfocito B parental, permitiendo la producción intensiva *in vivo* e *in vitro* de anticuerpos monoclonales (Saleem y Kamal, 2008).

La Ingeniería Genética ha irrumpido exitosamente en el campo de la producción de los monoclonales y ya se han obtenido anticuerpos quiméricos, humanizados (ratón-humano) y fragmentos de anticuerpos expresados en fagos que permiten el clonaje y manipulación de repertorios de linfocitos B murinos y humanos. Con esta potencialidad, pueden obtenerse anticuerpos que no existen en la naturaleza como los catalíticos y es posible provocar maduración *in vitro* de la afinidad de los anticuerpos recombinantes (Winter, 1991; Little y col., 2000; Kim y col., 2005).

La tecnología de producción *in vivo* consiste en inocular las células de un hibridoma en la cavidad peritoneal de un biomodelo, originando tumores que sintetizan un líquido rico en anticuerpos llamado Líquido Ascítico Murino (LAM) (Fuentes y col., 2001) (**Figura 1**).

Los anticuerpos monoclonales constituyen en el momento actual el principal grupo de medicamentos biotecnológicos. Un hito importante en relación con la obtención de estos fármacos fue la puesta a punto de la tecnología del hibridoma por Köhler y Milstein en 1975. Desde entonces, la naturaleza molecular de los anticuerpos monoclonales terapéuticos, así como los métodos de producción han evolucionado considerablemente. Actualmente, las estrategias para la producción de estos fármacos pasan inevitablemente por la selección de dianas terapéuticas de interés, hecho que entraña gran dificultad, ya que, a menudo no se conocen completamente las rutas bioquímicas implicadas en la génesis y desarrollo de muchas patologías.

Su obtención puede llevarse a cabo utilizando ratones genéticamente modificados en los cuales se introducen los genes que codifican las inmunoglobulinas humanas, utilizando los vectores adecuados.

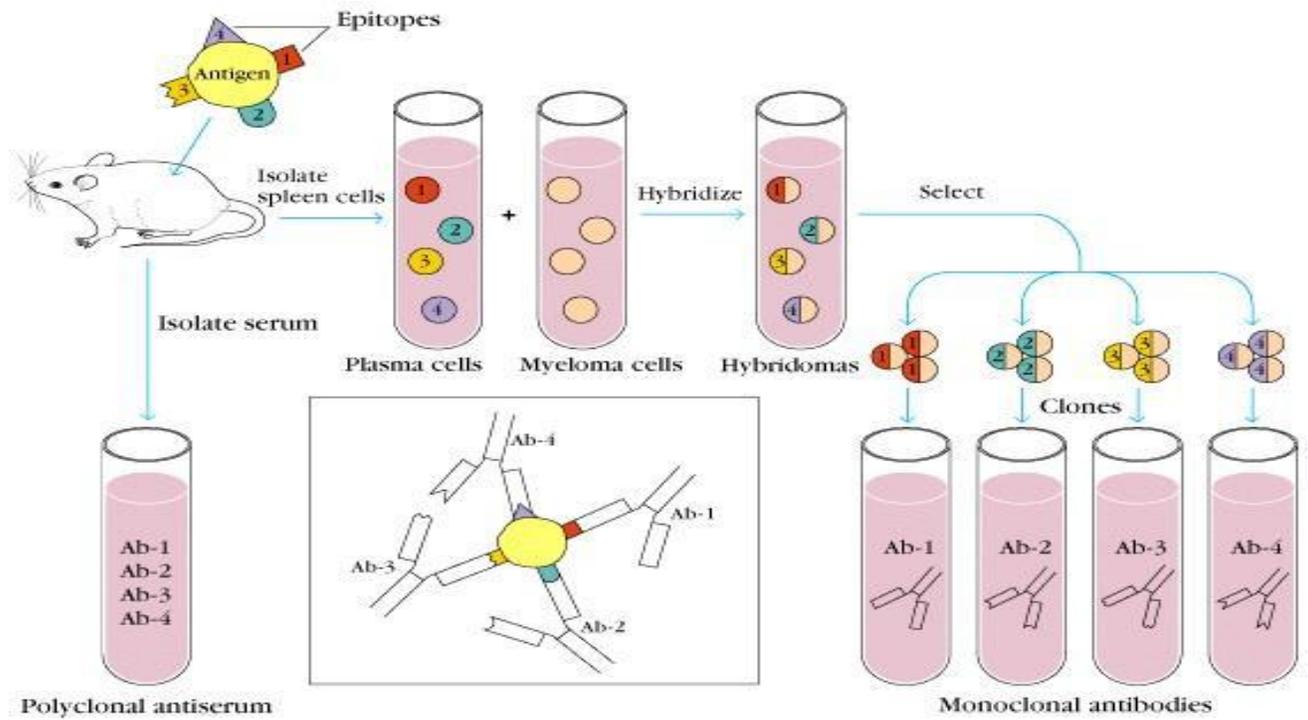


Figura 1. Esquema de la producción de Anticuerpos monoclonales. Tomado de <https://es.slideshare.net>.

También puede emplearse la tecnología de presentación de proteínas en la superficie de fagos filamentosos o *Phage Display*, que permite obtener anticuerpos monoclonales sin utilizar ratones. Mediante esta técnica se obtienen bibliotecas de anticuerpos, a partir de las cuales podrán seleccionarse aquellos que contengan la secuencia genética que codifica el anticuerpo con mayor afinidad y especificidad por la proteína diana. La tecnología de ADN recombinante también ha hecho posible la obtención de moléculas recombinantes derivadas de anticuerpos, como los fragmentos de anticuerpo y las proteínas de fusión, así como otros, llamados biespecíficos, en los cuales los dos sitios de unión al antígeno poseen especificidades diferentes (García, 2011).

2.3. Métodos inmunoquímicos como base del Inmunodiagnóstico.

Gran parte de los progresos alcanzados por la biología moderna se deben al perfeccionamiento de los métodos analíticos de medición. La introducción de los procedimientos basados en las reacciones inmunológicas ha representado un importante avance en el análisis de sustancias de interés en biología, animal y vegetal, difíciles de medir empleando los métodos bioquímicos habituales.

Dentro de los procedimientos inmunológicos, los más útiles y prácticos son aquellos que se basan en la especificidad de la unión Ag-Ac, asociación que combina interacciones dependientes de los puentes de hidrógeno, las hidrofóbicas, fuerzas electrostáticas y las fuerzas de Van Der Waals (Roitt y Delves, 2003).

La propiedad que tiene la Ig de unirse a un antígeno, la especificidad de esta unión y el hecho de que pueda ser visible por los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, con radioisótopos o con enzimas) hacen que estos métodos se empleen ampliamente (Pérez, 2009).

Dado que los antígenos y anticuerpos se caracterizan por sus interacciones mutuas, uno de ellos puede utilizarse para cuantificar al otro. Existen diversos métodos analíticos basados en procedimientos distintos para visualizar la unión Ag-Ac, como, por ejemplo: técnicas de inmunoprecipitación, técnicas de inmoaglutinación, técnicas inmunofluorimétricas, técnicas inmunorradiológicas y técnicas inmunoenzimáticas.

2.3.1. Técnicas de Inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación que hace uso de anticuerpos unidos químicamente a una sustancia fluorescente, para demostrar la presencia de una determinada molécula. Como todos los inmunoensayos, aprovecha la capacidad que tienen los anticuerpos para unirse con alta especificidad, a una determinada molécula blanco; pero se diferencia de otras técnicas inmunoquímicas, en que la señalización del anticuerpo es una molécula fluorescente como por ejemplo, el Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (Burtis y col., 2008).

La inmunofluorescencia como técnica inmunoquímica de cuantificación se puede utilizar tanto en muestras de origen biológico como en muestras no biológicas, siempre que se encuentren en un medio favorable para la unión de los anticuerpos. Existen dos tipos de técnicas de inmunofluorescencia: primaria (o directa) y secundaria (o indirecta) (Handbook-<http://www.molbiol.ox.ac.uk/www/pathology/tig/fitc.html>, 2006) (**Figura 2**).

- **Primaria o Directa - IFD**

La inmunofluorescencia primaria, o directa, también conocida por sus siglas IFD, hace uso de un único anticuerpo que se encuentra químicamente unido a un fluoróforo o fluorocromo. El anticuerpo reconoce la molécula diana y se une a ella directamente.

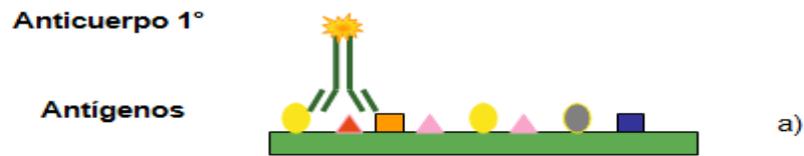
Esta técnica presenta algunas ventajas con respecto a la indirecta, como que reduce el número de etapas necesarias, por lo tanto, es más rápida y, por otro lado, es menos sensible a las interferencias debidas a reactividad cruzada de los anticuerpos o a reacciones no específicas.

- **Secundaria - IFI**

La Inmunofluorescencia secundaria, o indirecta (también conocida por sus siglas IFI) hace uso de dos anticuerpos; el anticuerpo primario es el que reconoce y se une a la molécula diana, mientras que el secundario que es el que se encuentra marcado con el fluorocromo reconocen al primario y se une a él. Esta técnica es un poco más compleja que la IFD, requiere más pasos y es más posible que sufra interferencias. Pero en contrapartida, es mucho más flexible que una técnica directa, debido a que es posible que un anticuerpo primario una a más de un anticuerpo secundario, lo que implica un efecto de amplificación que también aumenta la sensibilidad de la técnica.

Immunofluorescencia Directa

Utiliza un solo anticuerpo



Immunofluorescencia Indirecta

Utiliza un 2° anticuerpo conjugado

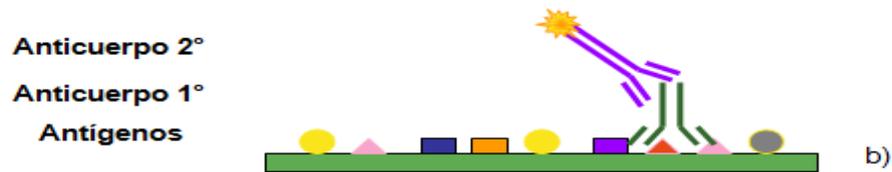


Figura 2. Esquema de la aplicación de inmunofluorescencia con uso de AcM: a) directa; b) indirecta. Tomado de: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Hidatidosis/50-Roquel-Liliana.pdf

2.3.2. Compuestos fluorescentes: Fluorocromos.

La **fluorescencia** es un tipo particular de luminiscencia, que caracteriza a las sustancias que son capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética de longitud de onda diferente. La energía total emitida en forma de luz es siempre menor a la energía total absorbida y la diferencia entre ambas es disipada en forma de calor. En la mayoría de los casos la longitud de onda emitida es de menor energía que la absorbida; sin embargo, si la radiación de excitación es intensa, es posible para un electrón absorber dos fotones. En esta absorción bifotónica, la longitud de onda emitida es más corta que la absorbida. El mecanismo de fluorescencia típico implica tres pasos secuenciales: absorción, disipación no radiactiva y emisión (Skoog, 2006).

El ciclo completo es muy breve, transcurre en tiempos del orden de los nanosegundos, por lo que puede considerarse prácticamente instantáneo. Es este tiempo tan corto lo que diferencia a la fluorescencia de otro conocido fenómeno luminoso, la fosforescencia. El mecanismo de fluorescencia también se encuentra muy relacionado con el proceso de quimioluminiscencia. Las sustancias que son capaces de emitir luz al ser excitadas por diferentes tipos de radiación se denominan fluoróforos. Es posible obtener una amplia variedad de colores por fluorescencia, dependiendo de la longitud de onda que emita el compuesto fluorescente. El fenómeno de fluorescencia posee numerosas aplicaciones prácticas, entre las que se encuentran por ejemplo: análisis en mineralogía, gemología, sensores químicos (espectroscopia fluorescente), pigmentos y tintas, detectores biológicos y lámparas fluorescentes (Acuña, 2009).

Las biomoléculas pueden marcarse con un grupo químico fluorescente (fluorocromo) mediante una reacción química simple, lo cual permite una detección sensible y cuantitativa de la molécula. Algunos ejemplos de su uso son:

- La microscopía de fluorescencia de tejidos, células o estructuras subcelulares, se consigue marcando el anticuerpo con un fluorocromo y permitiendo que aquel encuentre su antígeno correspondiente presente en la muestra. Al marcar varios anticuerpos con diferentes fluorocromos se puede lograr la visualización de múltiples objetivos dentro de una misma imagen.
- Es muy utilizada en la Citometría de flujo para identificar diferentes receptores en las células estudiadas, marcando estas células con anticuerpos específicos conjugados con fluorocromos.

Los **fluorocromos** son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente, estos se caracterizan por sus espectros de excitación y de emisión. Estos espectros varían en los diferentes Fluorocromos (Washington, 2005).

Las propiedades reconocidas de un buen fluorocromo reportada en literatura son (Peng y col.,2009):

- 1) Alto coeficiente de extinción a la longitud de onda de excitación.
- 2) Alto rendimiento cuántico.
- 3) Elevada foto estabilidad.
- 4) Corto estado de excitación.
- 5) Su espectro de absorción debe ser lo más cercano posible al espectro de emisión del láser utilizado.
- 6) El espectro de emisión debe ser diferente al de absorción para asegurar que ambas señales se separan.
- 7) Se deben utilizar colorantes que formen uniones con las proteínas (sin afectar los grupos de combinación específica del anticuerpo).
- 8) Que sean foto estables.

Se describen dos clases de fluorocromos, según la interacción que se establece con el anticuerpo:

- ✓ **Fluorocromos de unión covalente:** son moléculas orgánicas, las que forman una unión covalente, principalmente con grupos amino libres en los anticuerpos. Como ejemplo tenemos el Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), la ficoeritrina, biotina, rodamina, rojo texas, cianinas, entre otros (Esteban, 2007).
- ✓ **Fluorocromos de unión no covalente:** son aquellos cuyas uniones son no covalentes con estructuras dentro de las células, por ejemplo, Hoechst, DAPI, Naranja de acrimina, yoduro de propidio y otros.

A continuación, expondremos algunas características de los fluorocromos fundamentales que se utilizan en reactivos para las técnicas de inmunofluorescencia.

❖ El Isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Es el fluorocromo más utilizado para marcar proteínas. FITC, por sus siglas en inglés, es una molécula pequeña con afinidad por las proteínas, incluidas las inmunoglobulinas, se excita con luz azul a 488 nm y emite luz a 520 nm. El grupo isotiocianato reacciona con los grupos amino de los residuos de lisina en la proteína (**Anexo 3**). Es una molécula pequeña que se conjuga normalmente por vía aminas primarias, donde a cada anticuerpo se conjugan de 3 a 6 moléculas de FITC. Algunos autores reportan que la razón molar puede ser de 3-10, pues mayor cantidad de uniones de fluorocromo al anticuerpo puede provocar problemas de solubilidad (Golim y col., 2007). (**Anexo 4**).

❖ Las Ficobiliproteínas.

Las ficobiliproteínas actúan como pigmentos accesorios para la fotosíntesis en algas marinas de las *Rhodophyceae*, *Cyanophyceae*, *Cryptophyceae* y algunas *Pirrophyceae*. Se encuentran organizadas en estructuras celulares, llamadas ficobilisomas, las cuales están unidas en conjuntos regulares a la superficie exterior de los tilacoides (Fernández, 2007). Las ficobiliproteínas se encuentran en muy alta concentración en muchas algas (*P. cruentum* o cianobacteria *Anabaena variabilis*) y pueden ser encontrados numerosos protocolos a partir de estas algas, donde pueden obtenerse a escala de cultivo (Glazer, 1993).

Las propiedades espectroscópicas de las biliproteínas individuales dependen principalmente de la naturaleza química de las bilinas. Las ficobiliproteínas se dividen en tres clases según sus propiedades de absorción: **ficoeritrinas** ($\lambda_{\text{máx}} \sim 540\text{--}570$ nm), las cuales contienen los cromóforos ficoeritrobilina y ficourobilina; las **ficocianinas** ($\lambda_{\text{máx}} \sim 610\text{--}620$ nm), que contienen ya sea una mezcla de los cromóforos ficocianobilina y ficoeritrobilina o sólo ficocianobilina, según la especie de origen; y **aloficocianinas** ($\lambda_{\text{máx}} \sim 650\text{--}655$ nm), con ficocianobilina como grupo prostético (Bermejo, 2003). (**Anexo 5**)

Los grupos cromóforos dan un color característico a cada ficobiliproteína: **rojo a la ficoeritrina**, **azul brillante a la ficocianina**, y **verde azulado a la aloficocianina**. Se ha encontrado que las principales clases de ficoeritrinas difieren en sus características de absorción: *ej.* las β -ficoeritrinas muestran $\lambda_{\text{máx}} \sim 565$ y 546 nm.

Dentro de la familia de las ficobiliproteínas, la β -ficoeritrina es la mejor elección para el conjunto de aplicaciones citadas, como consecuencia de sus características espectroscópicas más ventajosas, tanto absorciométricas como fluorimétricas, debido a su alto coeficiente de extinción molar (que le confiere un

intenso color rosa brillante) al disponer de 32 cromóforos en su molécula. Además, los acoplamientos intermoleculares de los cromóforos le confieren un elevado rendimiento cuántico de fluorescencia (permite su detección con mayor sensibilidad que otros fluorocromos convencionales) (Michael y col., 2008).

El creciente uso de la ficoeritrina es debido a su aplicación en el acoplamiento a proteínas o moléculas de interés, como son: anticuerpo, avidina, drogas, etc. La unión de ficobiliproteínas a moléculas específicas es realizada a través de los reactivos heterobifuncionales que dan lugar a la formación de un enlace covalente; entre los más usados se encuentran SPDP, SMCC y GMBS. Por cálculos teóricos en la conjugación ocurre que por cada miligramo de anticuerpo se conjugan aproximadamente 3,2 mg de ficoeritrina.

2.3.3. Conjugados con Fluorocromos.

El marcaje celular con AcM acoplados a fluorocromos, representa un paso crucial para la identificación de subtipos celulares mediante el uso de la técnica de citometría de flujo (Revista CENIC. 2007). Los anticuerpos monoclonales permiten detectar y “etiquetar” poblaciones específicas de células. Los conjugados de los anticuerpos-fluorocromos como reactivos biológicos constituyen en la actualidad una de las herramientas indispensables para confirmación del diagnóstico y evolución de las enfermedades inmunológicas (Toledano, 2005)

La conjugación del fluorocromo al anticuerpo, principalmente de isotipos IgG, depende de varios factores como son: cantidad de fluorocromo añadido, pH del medio, tiempo de contacto, temperatura, naturaleza de las proteínas y especie de la que procedan las globulinas; además, el fluorocromo empleado debe reunir una serie de cualidades ya citadas anteriormente.

Una de las tecnologías que emplean estos conjugados, para procesamiento de muestras biológicas en el diagnóstico de enfermedades, es la Citometría de Flujo (CF); donde los anticuerpos monoclonales definen la detección del antígeno específico de interés (anticuerpos + fluorocromos), y es la intensidad de fluorescencia directamente proporcional al número de moléculas del conjugado unidas al antígeno, confiriendo el anticuerpo especificidad al marcaje (Ortiz y col., 1999).

Con la aparición de los anticuerpos monoclonales (AcMs), a finales de los setenta y su ulterior desarrollo en las décadas siguientes, se produce un mayor conocimiento de las características moleculares y antigénicas de las células.

2.4. Citometría de Flujo.

La citometría de flujo es una herramienta poderosa para definir y enumerar leucocitos, es la Citometría de Flujo (CF). Es una técnica sencilla que se aplica en la rutina diaria de algunos laboratorios clínicos y de investigación en el fenotipaje de estirpes celulares diferentes (Carey y col., 2007; Michael y col., 2008). El nombre original de la citometría de flujo era "citofotometría de pulso", que fue el nombre publicado en la primera patente de aplicación práctica de la citometría de flujo fluorescente. En la 5ta Conferencia sobre Citometría Automatizada de la *American Engineering Foundation* realizada en 1976, en Pensacola - Florida, ocho años después de la presentación del primer citómetro de flujo fluorescente (1968), se acordó utilizar el nombre de citometría de flujo, un término que rápidamente ganó popularidad.

La citometría de Flujo es la técnica que permite obtener información sobre poblaciones celulares a partir de un estudio individualizado de un gran número de células (habitualmente entre 5000 y 10000), que por tanto serán una muestra lo suficientemente representativa del conjunto poblacional. La suspensión de células en solución isotónica se hace pasar a través de un pequeño orificio, de modo que cuando salen lo hacen una a una (individualizada), formando parte de una corriente continua o flujo cilíndrico (Michael y col., 2008). Sobre esta corriente de células se hace incidir un haz de luz láser, cuya dispersión y reflexión son analizadas en duración, intensidad y espectro, los datos obtenidos almacenados en memoria del ordenador y desde allí, pasadas a archivos binarios que posteriormente pueden ser analizados con detenimiento (**Anexo 6**).

Por lo que un citómetro de flujo es un instrumento que permite identificar, cuantificar y caracterizar propiedades de partículas (ej. células) que se encuentra en suspensión en un fluido en movimiento, haciendo incidir sobre ellas uno o varios haces de luz con longitudes de onda bien definidas. En un citómetro de flujo coinciden y se entremezclan de forma continua y desde hace décadas, los avances ocurridos en distintas áreas tecnológicas, incluida la tecnología láser, la producción de anticuerpos monoclonales, la química de los fluorocromos, la mecánica de fluidos, la óptica, la electrónica y la informática (Roederer, 2012).

2.4.1. Estudios de los Parámetros Citométricos.

Existen varios parámetros a tener en cuenta a la hora de implementar un método diagnóstico para ser evaluado en los Citómetros. A continuación, se exponen

algunos aspectos importantes para su desarrollo y resultado preciso, reproducible y la mayor sensibilidad.

❖ **Detección de células:** El haz de luz láser cuando atraviesa una célula sufre una dispersión que puede ser evidenciada en un foto-detector, situado detrás de la corriente de células y justo enfrente de la fuente emisora, como una disminución de la luz incidente. El tiempo que dure el corte en la llegada de fotones al detector será proporcional al diámetro, y por tanto el volumen, celular. Este estudio de interrupción frontal del haz laser se denomina en términos anglosajones como *Forward Scatter* (FS).

❖ **Complejidad:** Además del detector de luz situado frente al haz laser, existe otro grupo óptico, el más importante, que detecta la luz dispersada por las células y que se coloca formando un ángulo de 90° con el haz laser. Esta luz es descompuesta mediante los filtros apropiados para poder estudiar tanto, la dispersión de luz de la misma longitud de onda del láser, como la emitida por los fluorocromos. La mayor o menor dispersión de la luz y por tanto la mayor o menor detección de luz en éste detector, será proporcional a la rugosidad de la superficie celular y a las estructuras y organelos celulares (Robinson y col., 2006; Roederer, 2012).

❖ **Fluorescencia:** La luz dispersada pasa a través de espejos que reflejan fotones hasta longitudes de onda determinadas y dejan continuar a los de longitud de onda mayor, de manera que es posible descomponer la luz en varios rangos de longitudes de onda que nos permiten estudiar rugosidad y dos o tres fluorescencias según los citómetros (Flores, 2016) (**Figura 3**).

❖ **Fluorocromos:** Son productos químicos que al ser estimulados con fotones con longitud de onda comprendida entre determinados rangos (de excitación) emiten a su vez otro fotón de longitud de onda mayor (de emisión). El prototipo es la fluoresceína que al ser estimulada con luz ultravioleta (no visible) emite luz de color verde (visible) aunque existen muchos otros como ficoeritrina, rodamina, rojo de Texas, etc.

Es posible combinar a la vez dos o tres compuestos fluorescentes siempre que emitan en diferente longitud de onda y el fluorómetro sea capaz de excitarlos a la vez y discriminar los fotones emitidos por ellos; siendo identificados como técnicas de Fluorescencias múltiples. Los colorantes más utilizados son, la citada fluoresceína con excitación máxima a 495 nm y emisión máxima a 520 nm y la ficoeritrina con excitación a 495 y emisión a 576 nm; lo que permite utilizarlos simultáneamente con un láser de 488 nm (**Figura 4**).

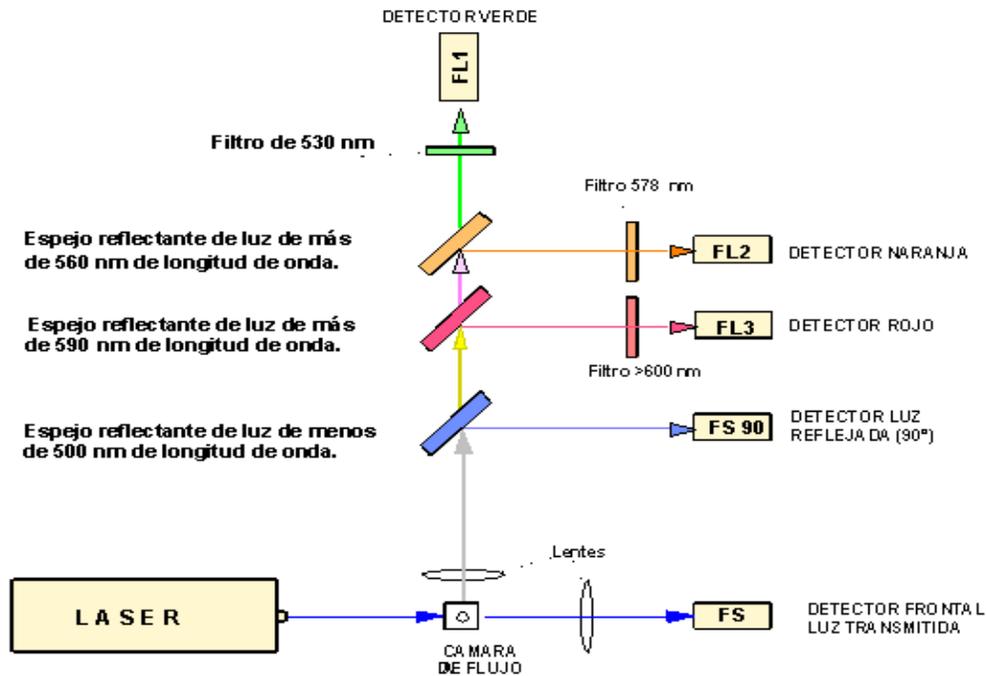


Figura 3. Esquema del funcionamiento de un citómetro de flujo. Tomado de <https://www.bing.com>.

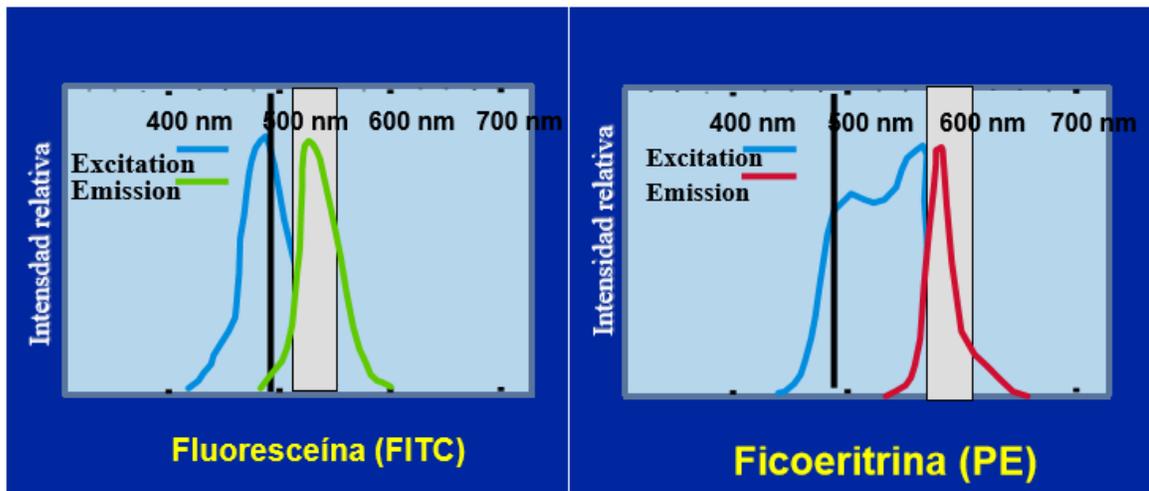


Figura 4. Patrones de detección de Fluorescencia para diferentes fluorocromos. Tomado de: <https://docplayer.es/3360512-Tecnicas-de-biologia-celular-y-molecular-utilizadas-en-investigacion-cientifica-basica-y-aplicada-citometria-de-flujo.html>

En algunas ocasiones ciertos fluorocromos producen el llamado fenómeno “*Quenching*” referido como la transferencia de energía entre dos moléculas marcadas con el mismo fluorocromo y que están suficientemente cercanas. Debido a ello una molécula puede ser excitada por la luz del láser y por la luz que emite la otra molécula (Figuerola, 2016.)

Los Fluorocromos más utilizados en Citometría de Flujo son:

- **FITC**: Isotiocianato de fluoresceína. Se excita con luz azul a 490 *nm* y emite a 514 *nm*. Produce *Quenching*. Su rendimiento cuántico es 0.5.

- **PE**: Ficoeritrina. Se excita a 480 *nm* pero su máximo está de 540-575 *nm* y emite a 578 *nm*. No produce *Quenching*, su alto rendimiento cuántico de fluorescencia permite su detección con mayor sensibilidad que otros fluorocromos convencionales, es 0.95. (Barcarizo, 2012; Fernández y col., 2017)

2.4.2. Aplicaciones de la Citometría de Flujo.

La citometría de flujo es una técnica que permite un análisis celular multiparamétrico de forma rápida, sensible y específica. La disponibilidad de amplios paneles de reactivos de gran calidad facilita la aplicación de este método analítico en el diagnóstico, clasificación, evaluación pronóstica y valoración de enfermedades inmunológicas, crónicas.

La aplicación de la citometría de flujo al análisis celular permite conocer aspectos físicos de la célula (tamaño y complejidad) y determinar la presencia o ausencia de determinados antígenos (habitualmente entre 3 y 4) en los diferentes compartimentos celulares (superficie celular, citoplasma, mitocondria y núcleo) lo que contribuye a aumentar, tanto la especificidad como la sensibilidad de la prueba (Matsui y col., 2004).

En otras áreas como en el diagnóstico y clasificación de las inmunodeficiencias primarias, en el monitoreo de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide, la citometría de flujo ha demostrado su utilidad (Dai y col., 2004).

El desarrollo de la biotecnología de anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos ha propiciado grandes avances en el diagnóstico de enfermedades; así emerge la Citometría de Flujo como una herramienta poderosa e importante en la diferenciación de subpoblaciones celulares. De igual forma, se ha demostrado que proporciona datos con valor pronóstico en cáncer gástrico y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En esta última enfermedad se ha

comprobado que el monitoreo de las subpoblaciones linfoides, específicamente el conteo absoluto de linfocitos CD4, tiene tanto valor pronóstico como terapéutico; así como conteo de leucocitos CD45 en la leucemia. En el seguimiento de pacientes oncológicos, el pronóstico de tumores sólidos y linfomas, se tienen experiencias en Cuba con la evaluación de infocitos en sangre periférica por citometría de flujo multiparamétrica (Arango y col., 2020).

Adicionalmente esta herramienta analítica permite analizar funciones celulares como la proliferación, la fagocitosis y la apoptosis, por mencionar algunas (Pérez y col., 2018). Poco a poco ese pasa de un valor diagnóstico a una evaluación terapéutica. La CF también permite identificar, caracterizar y separar poblaciones celulares: Cell Sorters®; revolucionando la Clínica para la purificación de células para trasplantología, *ej.* en la terapia aprobada por la FDA para tratar linfomas de linfocitos B, con linfocitos T del propio paciente modificados genéticamente para los receptores de antígenos tumorales (Androulla, 2018).

2.5. Uso de Reactivos Diagnosticadores en Cuba.

La producción de diagnosticadores en Cuba es de considerable importancia por la repercusión social que tiene, al permitir un seguimiento clínico de enfermedades de origen inmunológico, labor que engloba gran importancia desde el punto de social y económico.

En la actualidad la ciencia cubana ha destinado sus mejores esfuerzos en el desarrollo de los métodos diagnósticos y de seguimiento de este tipo de enfermedades. Por lo que disponer de AcMs conjugados, producidos en nuestro país, con la calidad requerida para este tipo de estudio, hace más económico el diagnóstico y lo garantiza para todos los pacientes inmuno-comprometidos (WHO, 2003).

En Cuba, el Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX) es una unidad productiva de diagnosticadores basados en AcM, incorporando los conjugados simples con fluorocromos para Citometría de Flujo, como: antiCD3 conjugado con FITC, antiCD4 conjugado con FITC, antiCD8 conjugado con FITC, antiCD45 conjugado con FITC, antiCD4 conjugado con PE; constituyendo un suministrador nacional de conjugados primarios para CF y otros inmunodiagnosticadores, del Sistema Nacional de Salud (SNS). Dentro de los clientes más importantes de los reactivos desarrollados por LABEX, que lo han utilizado para su uso en el monitoreo de enfermedades, se tienen el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), el Instituto Nacional de Oncología y

Radiobiología (INOR), el Instituto de Hematología e Inmunología (IHI), y en especial, el Instituto de Medicina Tropical *Pedro Kourí (IPK)* (Melchers, 2005).

La necesidad de continuar desarrollando estos reactivos, se sustenta en su amplio uso en el país en el monitoreo, pronóstico y discernimiento, de enfermedades inmunes y tratamientos en ensayo. Sin embargo, existe una amplia familia de “dianas” del sistema inmune como células de interés de valor diagnóstico, que son reconocidas de utilidad por los clientes habituales de los reactivos del LABEX, ampliando la familia de reactivos conformados por conjugados de AcM y fluoróforos.

También, la adecuación a estándares internacionales, exige el diseño de estos reactivos para el múltiple marcaje o en formas de tándem, aumentando el alcance de las células a estudiar y los estudios multiparamétricos (Flores, 2016).

2.6. Gestión de Calidad con enfoque a reducción de Riesgos en la Industria Biotecnológica.

Los principios de la gestión de riesgos son eficazmente utilizados en diferentes áreas de negocio y gubernamentales tales como finanzas, aseguradoras, seguridad laboral, salud pública, farmacovigilancia y también son utilizados por las agencias que regulan estos sectores. Aunque hasta el día de hoy hay varios ejemplos del uso de la gestión de riesgos para la calidad en la industria farmacéutica, estos son limitados y no representan el total de las contribuciones que la gestión de riesgos ofrece.

Además, la importancia de los sistemas de calidad ha sido reconocida en la industria farmacéutica, y es evidente que la gestión de riesgos para la calidad, es un componente con un valor añadido en un sistema de calidad eficaz. El uso de la gestión de riesgos para la calidad puede además facilitar la toma de decisiones fundamentadas, proporciona a las autoridades más garantías sobre la capacidad de una compañía para tratar riesgos potenciales, y puede mejorar el alcance y el nivel de la supervisión directa por parte de las autoridades.

La gestión de riesgos para la calidad, proporciona de manera específica una guía relativa a los principios y algunas herramientas de gestión, que puede permitir una toma de decisiones más eficaz y coherente fundamentada en los riesgos, tanto por parte de la industria como de las autoridades, respecto a la calidad de sustancias activas y medicamentos a lo largo de la vida del producto (Whyte y Eaton, 2004; Fryland, 2004).

2.6.1. Metodologías de Gestión de Riesgo.

La gestión de riesgos para la calidad proporciona un enfoque científico y práctico a la toma de decisiones. Proporciona métodos documentados, transparentes y reproducibles que son necesarios para llevar a cabo las etapas del proceso de gestión de riesgos para la calidad, basándose en el conocimiento existente sobre la evaluación de la probabilidad, la gravedad y, en ocasiones, la capacidad de detección del riesgo (Directriz ICH-Q9, 2016).

Tradicionalmente, los riesgos para la calidad se han evaluado y gestionado de forma informal con distintos métodos (procedimientos empíricos y/o internos) en base a, por ejemplo, la recopilación de observaciones, las tendencias y otra información. Todo ello sigue proporcionando información útil que puede servir de apoyo para algunas cuestiones tales como la gestión de las reclamaciones, defectos de calidad, desviaciones y asignación de recursos (Whyte y Eaton, 2004).

La industria farmacéutica puede, además, evaluar y gestionar los riesgos utilizando herramientas de gestión del riesgo reconocidas y/o procedimientos internos, apoyado en herramientas estadísticas. A continuación, se muestra una lista de algunas de estas herramientas (Directriz ICH-Q9, 2008).

- Modo de Análisis de Efectos (FMEA).
- Modo de Fallo, Efectos y Análisis de criticidad (FMECA).
- Análisis del árbol de fallos (TLC).
- Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP).
- Análisis Operabilidad Hazard (HAZOP).
- Análisis de Peligros preliminar (PHA).
- Clasificación de riesgos y la filtración.

Podría ser conveniente adaptar estas herramientas para su uso en áreas específicas relativas a la obtención de un fármaco (medicamento) y la calidad del producto. Métodos de gestión de riesgos de calidad y las herramientas estadísticas de soporte, pueden ser utilizados en combinación. El uso combinado proporciona una flexibilidad que puede facilitar la aplicación de los principios de gestión de riesgos de calidad. El grado de rigor y de detalle que se le dé a la gestión de los riesgos para la calidad debe reflejar el conocimiento disponible y ser proporcional a la complejidad y/o criticidad del tema a tratar (Moreno, 2012).

2.6.1.1. Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP).

El Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control, **HACCP** por sus siglas en inglés, parece haberse inspirado en las teorías sugeridas por el Dr. W. Edwards Deming, las cuales empezaron a transformar la calidad en las líneas de producción, lo que dio paso al desarrollo del sistema de gestión total de la calidad que apuntaba a las mejoras de las manufacturas, al tiempo que reducía los costos de producción. Este sistema fue utilizado en sus orígenes, en la industria automovilística, por la Administración para la Aeronáutica y el Espacio (NASA), laboratorios del Ejército de los Estados Unidos y la compañía de alimentos Pillsbury, los cuales a finales de los años 60 y comienzos de los 70 iniciaron su aplicación en la producción de alimentos con requerimientos de "cero defectos", presentándolo oficialmente en 1971, cuando lo sometieron a deliberación durante la Primera Conferencia Nacional de Protección de Alimentos en Estados Unidos (OMS, 2003; WHO, 2013).

Se ha aplicado ampliamente en la industria de alimentos, pero en los últimos tiempos se ha visto su utilidad en procesos biotecnológico; debido a que puede ser utilizado para identificar y gestionar los riesgos asociados a peligros físicos, químicos y biológicos (incluida la contaminación microbiana). El HACCP es más útil cuando el conocimiento del proceso y del producto es lo suficientemente amplio como para basar en él la identificación de los puntos críticos de control. El resultado del HACCP es la información sobre la gestión de riesgos que facilita el control de los puntos críticos no solo en el proceso de fabricación, sino en otras fases del ciclo de vida del producto (Moreno, 2012).

La finalidad del sistema es lograr que el control se centre en los puntos críticos (PCC) de cualquier proceso que pueden ser fuentes potenciales de "peligros". En el caso de que se identifique un peligro que debe controlarse, pero no se encuentre ningún PC, deberá considerarse la posibilidad de formular de nuevo la operación.

En él se identifican, evalúan y previenen todos los riesgos de contaminación de los productos a nivel físico, químico y biológico a lo largo de todos los procesos de la cadena de suministro, estableciendo medidas preventivas y correctivas para su control, tendientes a asegurar la calidad. Cuando se introduzca alguna modificación en el producto, el proceso o en cualquier fase, será necesario examinar la aplicación del sistema de PC y realizar los cambios oportunos (ISO 9000, 2015).

Para implementar esta herramienta de Calidad, se deben seguir los siguientes pasos, de manera general:

A) - Formación de un equipo de HACCP: La empresa deberá asegurar que se disponga de conocimientos y competencia específicos para los productos, que permitan formular un plan de PC eficaz. Para lograrlo, lo ideal es crear un equipo multidisciplinario.

B) - Descripción del Producto: Deberá formularse una descripción completa del producto que incluya información pertinente sobre: composición, estructura física/química (incluidos Concentración, pH, etc.), envasado, durabilidad, condiciones de almacenamiento y sistema de distribución.

C) - Elaboración de un Diagrama de Flujo: El diagrama de flujo deberá ser elaborado por el equipo de PC y cubrir todas las fases de la operación. Cuando el sistema de HACCP se aplique a una determinada operación, deberán tenerse en cuenta las fases anteriores y posteriores a dicha operación. El equipo de HACCP deberá cotejar el diagrama de flujo con la operación de elaboración en todas sus etapas y momentos, y enmendarlo cuando proceda.

D) - Enumeración de todos los posibles riesgos relacionados con cada fase, ejecución de un análisis de peligros, y estudio de las medidas para controlar los peligros identificados: El equipo de HACCP deberá enumerar todos los peligros que puede razonablemente preverse que se producirán en cada fase. Luego, deberá llevar a cabo un análisis de peligros para identificar, en relación con el plan de HACCP, cuáles son los peligros cuya eliminación o reducción a niveles aceptables resulta indispensable (ISO 9000, 2015).

Al realizar un análisis de peligros, deberán incluirse, siempre que sea posible, los siguientes factores:

- la probabilidad de que surjan peligros y la gravedad de sus efectos.
- la evaluación cualitativa y/o cuantitativa de la presencia de peligros.

El equipo tendrá entonces que determinar qué medidas de control, si las hay, pueden aplicarse en relación con cada peligro. Puede que sea necesario aplicar más de una medida para controlar un peligro o peligros específicos, y que con una determinada medida se pueda controlar más de un peligro.

E) - Determinación de los Puntos Críticos de Control (PCC): Es posible que haya más de un PCC al que se aplican medidas de control para hacer frente a un peligro específico.

Si se identifica un peligro en una fase en la que el control es necesario para mantener la característica del producto, y no existe ninguna medida de control que pueda adoptarse en esa fase o en cualquier otra, el producto o el proceso deberá modificarse en esa fase, o en cualquier fase anterior o posterior, para incluir una medida de control.

F) - Establecimiento de Límites Críticos para cada PCC: Para cada punto crítico de control, deberán especificarse y validarse, si es posible, límites críticos. En determinados casos, para una determinada fase, se elaborará más de un límite crítico. Entre los criterios aplicados suelen figurar las mediciones de temperatura, nivel de humedad, esterilidad, pH, etc.

G) - Establecimiento de un Sistema de Vigilancia para cada PCC: La vigilancia es la medición u observación programadas de un PCC en relación con sus límites críticos. Mediante los procedimientos de vigilancia deberá poderse detectar una pérdida de control en el PCC. Además, lo ideal es que la vigilancia proporcione esta información a tiempo como para hacer correcciones que permitan asegurar el control del proceso para impedir que se infrinjan los límites críticos. Cuando sea posible, los procesos deberán corregirse cuando los resultados de la vigilancia indiquen una tendencia a la pérdida de control en un PCC, y las correcciones deberán efectuarse antes de que ocurra una desviación.

La mayoría de los procedimientos de vigilancia de los PCC deberán efectuarse con rapidez porque se referirán a procesos continuos y no habrá tiempo para ensayos analíticos prolongados (Directriz ICH Q9, 2008).

H) - Establecimiento de Medidas Correctivas: Con el fin de hacer frente a las desviaciones que puedan producirse, deberán formularse medidas correctivas específicas para cada PCC del sistema de HACCP. Estas medidas deberán asegurar que el PCC vuelva a estar controlado. Las medidas adoptadas deberán incluir también un sistema adecuado de eliminación del producto afectado. Los procedimientos relativos a las desviaciones y la eliminación de los productos deberán documentarse en los registros de HACCP.

I) - Establecimiento de Procedimientos de Comprobación: Deberán establecerse procedimientos de comprobación para determinar si el sistema de HACCP funciona eficazmente. La frecuencia de las comprobaciones deberá ser suficiente para confirmar que el sistema de HACCP está funcionando eficazmente (Directriz ICH Q9, 2008; ISO 9000, 2015).

2.6.2. Evaluación de los Riesgos.

Evaluación de riesgos consiste en la identificación de los peligros el análisis y la evaluación de los riesgos asociados con evaluación de riesgos consiste en la identificación de los peligros el análisis y la evaluación de los riesgos asociados con la exposición a esos riesgos (como se define a continuación). Las evaluaciones de riesgos de calidad comienzan con una descripción del problema o riesgo pregunta bien definida. Cuando el riesgo en cuestión está bien definido, una herramienta de gestión de riesgos adecuada y los tipos de información que se necesita para hacer frente a la cuestión de riesgo será más fácilmente identificable. Como una ayuda para definir claramente el riesgo (s) para la evaluación del riesgo, tres cuestiones fundamentales a menudo son útiles (Sandle, 2003):

- 1- ¿Qué podría salir mal?
- 2- ¿Cuál es la probabilidad que va a salir mal (probabilidad)?
- 3- ¿Cuáles son las consecuencias (gravedad)?

La identificación de riesgo consiste en un uso sistemático de la información para identificar los riesgos referentes a la realización del proceso o producto, que se refiere a la descripción del problema. La información puede incluir datos históricos, análisis teórico, opiniones informadas, y las preocupaciones de los interesados. Direcciones de identificación de riesgos del “¿Qué podría salir mal?” pregunta, incluyendo la identificación de las posibles consecuencias. Esto proporciona la base para nuevas etapas en el proceso de gestión de riesgos de calidad.

El Análisis de riesgo es la estimación del riesgo asociado a los peligros identificados. Es la estimación del riesgo asociado a los peligros identificados. Es el proceso cualitativo o cuantitativo de la vinculación de la probabilidad de aparición y gravedad de los daños. En algunas herramientas de gestión de riesgos, la capacidad de detectar el daño (detectabilidad) también influye en la estimación del riesgo.

La Evaluación de Riesgo compara el riesgo identificado y analizado contra criterios de riesgo dado. Las evaluaciones de riesgo consideran que la fuerza de la evidencia para las tres de las preguntas fundamentales. Al hacer una evaluación eficaz de los riesgos, la solidez del conjunto de datos es importante, porque determina la calidad de la salida. Revelando supuestos razonables y fuentes de incertidumbre, se aumentará la confianza en este producto y / o proceso para ayudar a identificar sus limitaciones.

La estimación de la probabilidad y consecuencias de cada riesgo identificado. La probabilidad indica la “facilidad” de que se produzca la situación que daría lugar al daño. Se puede graduar en baja, media y alta. (ISO 9000, 2015; CECMED, 2017).

Las consecuencias reflejan la severidad o gravedad del daño que se puede esperar en caso de materialización del riesgo de accidente, pudiendo graduarse en: ligeramente dañino, dañino y extremadamente dañino (**Anexo 7**).

2.6.3. Valoración del Riesgo.

Cruzando las variables probabilidad y consecuencia en la siguiente (**Anexo 8**), obtendremos la valoración final del riesgo, pudiendo considerarse trivial, tolerable, moderado, importante e intolerable.

Esta valoración de los riesgos nos da la información precisa para decidir si es necesario implantar medidas correctoras o mejoras en los controles ya existentes, y también nos ayudará a asignar prioridades a la hora de planificarnos. Por supuesto, las medidas de control deben ser proporcionales al riesgo. En el Anexo 8 se muestra una (**Anexo 9**) con un criterio sugerido como punto de partida para la toma de decisiones (CECMED, 2017).

2.6.4. Medidas Correctivas y Preventivas.

Para cada una de las situaciones anómalas y riesgos identificados en la evaluación, debemos indicar las medidas necesarias para eliminar o controlar dichos riesgos (**Anexo 9**).

La elección de estas medidas deberá hacerse siguiendo los Principios de la acción preventiva:

- Evitar los riesgos.
- Evaluar los riesgos que no se puedan evitar.
- Combatir los riesgos en su origen.
- Adaptar el trabajo a la persona, en particular en lo que respecta a la concepción de los puestos de trabajo, así como a la elección de los equipos y los métodos de trabajo y de producción, con miras, en particular, a atenuar el trabajo monótono y repetitivo y a reducir los efectos del mismo en la salud.
- Tener en cuenta la evolución de la técnica.
- Sustituir lo peligroso por lo que entrañe poco o ningún peligro.

- Planificar la prevención, buscando un conjunto coherente que integre en ella la técnica, la organización del trabajo, las condiciones de trabajo, las relaciones sociales y la influencia de los factores ambientales en el trabajo.
- Adoptar medidas que antepongan la protección colectiva a la individual.
- Dar las debidas instrucciones a los trabajadores. (Qian y col., 2010; CECMED, 2017)



Materiales y Métodos

III. Materiales y Métodos.

3.1. Análisis de Peligro y Puntos Críticos de Control del proceso productivo de Marcadores Leucocitarios.

Se realizó la aplicación del HACCP, Método de definición de **Puntos Críticos** y de **Control**, una vez identificados previamente los Peligros potenciales y/o reales.

Para el levantamiento de los Puntos Críticos de los procesos involucrados en la obtención del **producto** “marcadores leucocitarios”, se parte inicialmente de la elaboración del Diagrama de flujo de cada Proceso o Subproceso involucrado, analizando los peligros para la calidad del producto en todas las etapas por la que pasa y comparándolo con la existencia de Puntos de control, desde la obtención del inóculo, la producción del Líquido Ascítico Murino (LAM), la purificación y conjugación del IFA, la formulación y etiquetado del producto, hasta su posterior comercialización; asociados a los Puntos Críticos identificados en cada etapa (Directriz ICH Q9, 2008).

Del análisis riguroso de las etapas por las que pasa el producto, se generaron los Diagramas de flujos. Para la señalización de estos, en rojo y a la derecha se pusieron los posibles puntos críticos que pudieran parar el proceso de obtención de los marcadores, a la izquierda y en negro los controles de proceso existente en las etapas y en azul se reflejaron los controles de proceso para una mejora de la obtención del producto; empleando el sistema de análisis de peligro de puntos críticos de control (HACCP), el mismo permite identificar peligros específicos y medidas para su control. (**Anexo 10**).

Para este análisis se constituyó un equipo de 11 especialistas, conformados por Doctor en Ciencias (1), Másteres en Biotecnología (5), Licenciados (4) y un Ingeniero Químico; todos relacionados con los procesos involucrados en la obtención del producto de interés: marcadores leucocitarios (AcM antiCD). Para ello primero se repasó las diferentes etapas del producto y se les explicó la importancia de identificar y tratar de reducir los posibles riesgos para llegar a la meta de “error cero”. Se visualizó las consecuencias de los errores de calidad, pudiendo provocar pérdidas para la empresa y desabastecimiento de los reactivos en las redes nacionales (**Anexos 11**).

Los Puntos críticos identificados fueron evaluados según las variables probabilidad y consecuencia en la que obtendremos la valoración final del riesgo, pudiendo considerarse como trivial, tolerable, moderado, importante e intolerable. Esta

valoración de los riesgos nos da la información precisa para decidir si es necesario implantar medidas correctoras o mejoras en los controles ya existentes, y también nos ayudará a asignar prioridades a la hora de planificarnos. Por supuesto, las medidas de control deben ser proporcionales al riesgo (CECMED, 2017). Se empleó como herramienta informática para la evaluación de los riesgos el sistema Quays® (quays.cim.sld.cu) utilizado en la empresa del Centro de Inmunología Molecular (CIM) para el seguimiento de los Planes de Prevención de Riesgo por el Comité de Control Interno.

Del análisis se generaron los posibles peligros potenciales a los que se expone el proceso de Marcadores Leucocitarios y a su vez nuevos límites de control para reducir ese peligro; y se descargan en planes de medidas y de vigilancia para darle seguimiento a los puntos críticos detectados en el proceso, para una mejora del producto marcadores leucocitarios. Se tiene el plazo de un año para darle cumplimiento a los planes con acciones correctivas y evaluar comportamiento de los puntos críticos identificados, así como implementación de las mejoras para el producto; y se le da seguimiento, cada tres meses para su cumplimiento (**Anexo 12**).

El análisis se dirigió al Proceso que pudiese detectarse la mayor cantidad de Puntos Críticos, aquellos con mayor puntaje como Peligro o donde se detecten la menor cantidad de Puntos de control ya establecidos; dirigiendo el plan de medidas a generar más o nuevos puntos de control.

3.2. Obtención del Anticuerpo Monoclonal Purificado antiCD.

Los anticuerpos utilizados para la investigación (antiCD45, antiCD4, antiCD3) fueron obtenidos por el grupo de Procesamiento de IFA del Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales LABEX, Santiago de Cuba; según metodología descrita en procedimiento **O5.PNO.11**, donde se inicia como materia prima el Líquido Ascítico Murino LAM, que fue obtenido a partir de la inoculación de los biomodelos (ratón Balb/c), generado del hibridoma (L3 antiCD45, T4 antiCD4, T3 antiCD3) (Soria, 2010). Posteriormente se realiza la filtración del LAM por 0.2 um para eliminar la grasa existente en el mismo y se procede a la purificación por cromatografía de afinidad y exclusión molecular empleando un equipo de purificación FPLC (AKTA purifier™) para obtener la IFA libre de contaminantes. De ahí se le realiza controles de procesos y se procede a la entrega de muestra para que se realicen los controles de calidad como: el grado de pureza y la actividad biológica, punto isoeléctrico, según **Especificaciones**

5036, 5016, 5015, respectivamente del SGC del LABEX. Los purificados fueron utilizados, una vez liberados, para fines de conjugación (**Anexo 13**).

3.3. Simples Conjugados.

3.3.1. Obtención del AcM Conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC).

Preparación del AcM.

Una vez obtenidas las muestras del antiCD purificado, según procedimiento anteriormente descrito, se verificó que la concentración de la proteína fuese mayor de 7 mg/mL mediante la medición de la absorbancia a 280 nm por espectrofotometría. Se realiza el cambio de pH a la solución conteniendo el AcM, de 7.3 a 9.5 con buffer carbonato-bicarbonato de pH 9,5, para lo cual se ultra filtró usando centricones Ultracel 30 kDa (Goding, 1976).

Conjugación del AcM con FITC.

Para la realización del anticuerpo conjugado con FITC (isómero I, Sigma Catálogo F4274), se inició partiendo de una relación establecida FITC/proteína (1:2) por Harlow, E. and Lane D, dicha relación fue aplicada para nuestra molécula, cumpliendo con el rango de F/P 3.8 reportado por el autor Roederer en 2012, se utilizó como disolvente para el fluorocromo el Dimetilsulfóxido (DMSO) SIGMA®; y se trabajó el anticuerpo a una concentración constante según el procedimiento (O5.PNO.007) (Rabell, 2014).

Se preparó la solución FITC-DMSO con $3,5 \text{ mg}$ de FITC para $500 \mu\text{L}$ de Dimetilsulfóxido, utilizando un frasco de vidrio ámbar se adicionaron al anticuerpo en agitación constante, $50 \mu\text{L}$ de la mezcla FITC-DMSO, en alícuotas de $5 \mu\text{L}$, luego se incubó el Ac con el fluorocromo en agitación suave durante 1 h hasta lograr la conjugación Ac-FITC a temperatura de laboratorio ($24 \text{ }^\circ\text{C}$).

Purificación del Conjugado.

La purificación del anticuerpo conjugado se realizó por filtración en gel en columnas PD-10 Pharmacia® utilizando una matriz de Sephadex G-25 y un Buffer Fosfato Salino $0,01 \text{ M}$ a pH 7,2 como tampón, para remover del gel de exclusión las moléculas y el FITC que no se conjugaron al anticuerpo.

Determinación de la Relación Molar F/P por Espectrofotometría.

La determinación de la relación F/P en la muestra purificada se realizó por espectrofotometría a una densidad óptica de 280 nm para detectar las moléculas de anticuerpo fluorescente en el producto conjugado y a 495 nm para detectar la presencia de moléculas de fluorocromo acoplado a la proteína en el espectro visible del equipo. Como Tampón de lectura se utilizó el Buffer Fosfato Salino 0,01 M a pH 7.2, se vertió la dilución 1/10 de la muestra purificada en una cubeta de cuarzo y se midió la densidad óptica. Se realizaron tres lecturas con el fin de lograr repetitividad. Para determinar la razón molar se utilizó la ecuación 1 (SIGMA.FD, 2005).

$$\frac{F}{P} = \frac{2,77 \times A(495 \text{ nm})}{A(280 \text{ nm}) - 0,35 (A 495 \text{ nm})} \dots\dots\dots (1)$$

Dónde:

F/P - Relación FITC/Proteína

A 495 nm (Absorbancia a 495 nm del fluorocromo)

A 280 nm (Absorbancia a 280 nm del anticuerpo).

3.3.2. Obtención del AcM conjugado con β-Ficoeritrina (PE).

La conjugación se realizó teniendo en cuenta el protocolo descrito por Bermejo en 2002, según procedimiento **O5.PNO.014**. Se ultrafiltró la ficoeritrina primeramente contra Buffer Fosfato Salino pH 7.2 -7.4 para retirar el preservo y posteriormente en Buffer Fosfato 50 mM, 1 mM EDTA pH 7. Se utilizaron 3,2 mg de PE / mg de anticuerpo, incluyendo un 10 % de la pérdida durante los intercambios de amortiguamiento.

La pureza y la concentración de la PE se determinaron midiendo la absorbancia a 495 y 545 nm. Una razón de 545/495 ≥ 2 indica una eliminación adecuada de todas las otras proteínas.

Derivatización de la Ficoeritrina (PE).

Se preparó una solución a 10 mg/mL de SMCC en DMSO minutos antes de su utilización. Luego se añadió 45.53 uL de SMCC dependiendo de los mg de PE, según la relación prevista, se procedió a la agitación a temperatura de laboratorio por 1 h en frasco ámbar. Seguidamente se purificó la PE derivatizada empleando una columna de filtración en gel (PD-10) equilibrada con Buffer Fosfato 50 mM, 1 mM EDTA a pH 7.

Reducción de los Anticuerpos.

Se preparó una solución de 1 M de DTT minutos antes de su uso a 15,4 mg en 100 μ L en agua destilada. Se añadieron los 3 μ L de la solución de DTT necesarios para el anticuerpo, luego se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente se purificó el anticuerpo reducido, por una columna de filtración en gel (PD-10) equilibrada con Buffer Fosfato 50 mM, 1 mM EDTA a pH 7 para realizar un desalado, se determinó la concentración del anticuerpo por espectrofotometría para proceder con la etapa de conjugación del anticuerpo con el fluorocromo.

Conjugación del Ac con β -PE

Se añadió en un frasco ámbar el anticuerpo reducido y la ficoeritrina derivatizada y se agitó por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente se preparó una solución de 10 mg de NEM en 1,0 mL de DMSO anhidro. Se añadieron 3.4 μ L de la solución por mg de anticuerpo a conjugar, se agitó en frasco ámbar a temperatura ambiente durante 30 min. °

Purificación de los Conjugados.

La purificación de los anticuerpos conjugados se realizó por el procedimiento descrito, en una columna de filtración en gel utilizando como medio cromatográfico la matriz de Sephadex G-25 y Buffer Fosfato Salino 0,01 M pH 7,2. El conjugado se almacena a temperatura de 2 a 8 °C.

A todos los anticuerpos conjugados con fluorocromos se le realiza la determinación de la actividad biológica mediante citometría de flujo, para determinar su máxima dilución y su porcentaje de reconocimiento, esto ocurre a la par con el reconocimiento del patrón comercial para tener un estándar de comparación.

Determinación de la relación molar del anticuerpo conjugado con PE.

La determinación de la relación molar del anticuerpo conjugado con PE en la muestra purificada se realizó por espectrofotometría a densidad óptica de 280 nm para detectar las moléculas de anticuerpo fluorescente en el producto conjugado y a 545 nm para detectar la presencia de moléculas de fluorocromo acoplado a la proteína en el espectro visible del equipo. Como Tampón de lectura se utilizó el Buffer Fosfato Salino 50 mM, 1mM EDTA a pH 7.0, se vertió la dilución 1/10 de la muestra purificada en una cubeta de cuarzo y se midió la densidad óptica. Para determinar la relación molar se utilizó la ecuación 2, empleada por Rodríguez (2017).

$$\frac{\beta-PE}{Prot} = 0.232 * \frac{A_{545}}{A_{280} - A_{545} * 0.222} \dots\dots\dots (2)$$

3.4. Obtención del Reactivo Doble Conjugado.

Para evaluar el desempeño del reactivo doble conjugado, a partir de las combinaciones de reactivos simples, se escogieron los conjugados antiCD4 conjugado con PE y el antiCD45 conjugado con FITC.

Primeramente, se realizaron diluciones del antiCD45 conjugado con FITC, tomando de referencia al anti CD4-PE (v:v), para un V_{final} de 100 μL completado con tampón PBS. Se analizó la variabilidad de la dilución en los dos grupos de reactivos definidos por separados y la influencia de un reactivo con respecto al otro, tomando como variable de respuesta el % reconocimiento de cada uno; para determinar en qué dilución estuvo su mejor desempeño. El diseño experimental recoge las variables o combinaciones de 7 Diluciones del antiCD45 conjugado con FITC/ antiCD4 conjugado con PE: 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/30, 1/35, 1/40 (**Anexo 14**).

Los lotes utilizados fueron: antiCD4 conjugado con PE (**D02C1801-PE**); antiCD45 conjugado con FITC (**D19C1901-FITC**). Las muestras fueron diluidas con Buffer Fosfato Salino 50 mM, 1mM de EDTA a pH 7. Como controles de referencias se emplearon los reactivos comerciales de *PARTEC*[®], Lotes **X273551** CD4/PE; **X273561** CD45/FITC.

Las muestras se analizaron en un Citómetro *PARTEC*[®]; lo resultados se procesaron en el programa FloMax[®], que viene instalado en el equipo (Fryland, 2004). Los límites de aceptación de los anticuerpos para el CD4 (30-51) % y del CD45 mayor de 90%.

3.4.1. Determinación de la Actividad Biológica al Producto Conjugado.

Se tomaron las diluciones de las mezclas realizadas, representadas en el (Anexo 14), cada dilución se homogenizó con el vortex. En 56 tubos Falcon de 5 mL, se añadió 100 μL de sangre total humana y 20 μL de cada dilución de la mezcla de doble conjugado a evaluar. Se preparó un control negativo con 100 μL de sangre total del “individuo supuestamente sano” (iss), sin añadir el conjugado AcM-fluorocromo. Como control positivo a los reactivos a evaluar, se utilizaron los reactivos comerciales a los cuales se les añadió 100 μL de iss y 10 μL del producto de referencia.

Todos los tubos se homogenizaron en el vortex e incubaron a 4 °C durante 30 *min* con poca iluminación. Luego de la incubación a cada tubo se le añadió 2 *mL* de solución de lisis y se centrifugó por 5 *min* a 1500 *r.p.m.* a 4 °C. Se desechó el sobrenadante, con mucho cuidado de no perder las células, y se añadió 4 *mL* de Buffer Fast Flow para lavar las células mediante centrifugación a 1500 *rpm* durante 5 *min*. Luego de comprobar la transparencia del sobrenadante, se le añadió a cada tubo 1000 μL del mismo Buffer y se homogenizaron nuevamente en el vortex. Se filtró la muestra con membrana de 0,2 μm para evitar taponamiento en los conductos del citómetro y se leyeron las muestras en un citómetro de Flujo CyFlow™ Space PARTEC®, utilizando los valores de adquisición específicos para leucocitos. El ensayo fue analizado en el programa FloMax®, en él se brindan los porcentajes de reconocimiento.

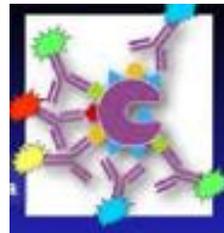
Terminada la lectura en el citómetro de flujo y analizados los datos en el programa FloMax® para determinar la mejor dilución, se procedió a realizar las réplicas de la dilución y su lectura en el equipo de citometría para evaluar reproducibilidad del resultado.

Se prepara el reactivo doble conjugado antiCD4 conjugado con PE/ antiCD45 conjugado con FITC a la mejor dilución de cada uno de los reactivos de simple marcaje, con tres réplicas. El diseño experimental incluye dos variables: dos (2) individuos supuestamente sanos (iss), tres (3) técnicos o analistas (**Anexo 15**)

Ejemplificando con otra mezcla, se combinaron antiCD4 conjugado con PE/ antiCD3 conjugado con FITC; lotes: antiCD4-PE (**D02C1801-PE**), antiCD3-FITC (**01C2001-FITC**) y la otra mezcla utilizada fue el antiCD20 conjugado con PE/ antiCD3 conjugado con FITC; lotes: antiCD20-PE (**D68180100-00-PE**), antiCD3-FITC (**01C2001-FITC**). Para ambos casos, se asumió la dilución 1/10 para ambos reactivos conjugados simples y se utilizó Buffer Fosfato Salino a pH 7.2. Se escogió para este ensayo, uno de los iss y uno de los técnicos que participan en el anterior experimento (**Anexo 16 y 17**).

3.5. Valoración económica.

Para la determinación del costo de producción de los reactivos dobles conjugados en LABEX, se realizó una valoración económica según el cálculo de las fichas de costo calculados para todas las etapas por las que pasa el reactivo (obtención del Inóculo, producción del LAM, purificación y conjugación y por último llenado y etiquetado), con ayuda del programa Microsoft Office Excel® 2020.



Resultados y Discusión

IV. Resultado y Discusión.

4.1.- Aplicación de la Gestión de Riesgos, para la Calidad del reactivo Marcadores Leucocitarios.

Los principios de la gestión de riesgos son eficazmente utilizados en diferentes áreas de negocio y gubernamentales tales como seguridad laboral, salud pública, farmacovigilancia y también son utilizados por las agencias que regulan estos sectores. Aunque hoy en día hay varios ejemplos del uso de la gestión de riesgos para la calidad en la industria farmacéutica, estos son limitados y no representan el total de las contribuciones que la gestión de riesgos ofrece. Además, la importancia de los sistemas de calidad ha sido reconocida en la industria farmacéutica, y es evidente que la gestión de riesgos para la calidad es un componente con un valor añadido en un Sistema de Calidad eficaz (ICH-Q9, 2008).

La industria farmacéutica y los órganos reguladores pueden evaluar y gestionar los riesgos utilizando herramientas de gestión del riesgo reconocidas y/o procedimientos internos (por ejemplo, procedimientos normalizados de trabajo). Estas herramientas se basan fundamentalmente en detectar los **Peligros potenciales o Modos Fallas** y para ello, se requiere un conocimiento profundo del proceso de obtención del producto y de los estándares de calidad que se definen para estos (Sperber, 2013)

El **Control de Peligros y Puntos Crítico** (HACCP en inglés) es un método simple, altamente específico de control de peligros, que se desarrolla basándose en siete principios: 1) conducir un análisis de peligros, 2) identificar los puntos críticos de control (PCC), 3) establecer los límites críticos en cada PCC, 4) establecer los procedimientos para monitorear cada PCC, 5) establecer acciones preventivas y correctivas, 6) establecer procedimientos para verificar que el programa está trabajando correctamente, 7) establecer registros y documentación para mantener el CPPC y asegurar su eficacia (Moreno, 2012). Por lo tanto, la utilización del mismo ayudará a minimizar los peligros potenciales que puedan asociarse al proceso productivo.

4.1.1.- Análisis de Peligros y Puntos Críticos de los Marcadores Leucocitarios.

Los negocios que han tenido éxito, entienden el valor de un Sistema de Gestión de Calidad eficaz cuando la organización se centra en satisfacer los requisitos de los clientes y asegurar que están satisfechos con los productos y servicios que

reciben: “Las organizaciones dependen de sus clientes, y por lo tanto deben comprender las necesidades actuales y futuras de los clientes, satisfacer los requisitos de los clientes y esforzarse en exceder las expectativas de los clientes” (ISO 9000, 2015).

Para el desarrollo y la introducción de los marcadores leucocitarios al mercado nacional e internacional, se incorpora también a los clientes en la gestión de la calidad, a través de la realización de Talleres de Productos con enfoque a Cliente con una periodicidad anual; en el cual, se recogen quejas, sugerencias y preocupaciones de los mismos, mediante encuestas o exposiciones de experiencias, obteniendo de este intercambio propuestas de mejoras para el producto.

Se hizo una revisión de los informes de post comercialización de los años 2017-2019 y se observó como en los tres últimos años los clientes expresan una mayor satisfacción con los ensayos en terreno desarrollados con lotes producidos de anti CDs (CD3, CD4, CD8, CD45), llegando a obtenerse su Licencia Sanitaria conferida por el CEMED (001-10-1D) en el 2018. (CECMED, 2020).

Por otro lado, nuevos y habituales “usuarios” demandan principalmente, la introducción de un nuevo fluorocromo al mercado para el doble marcaje, ya que el tradicional FITC presenta limitaciones en dependencia del citómetro a disposición. Además, se requiere que el conjugado con Ficoeritrina (PE) cuente con mayor intensidad de fluorescencia, pero a su vez solicitan incrementar los AcM conjugado para detección de otras células del sistema inmune. Los marcadores leucocitarios más demandados resultan el antiCD45 y el antiCD4. De este intercambio, se han propuesto para la familia de estos reactivos, nuevas “dianas” para reconocimiento celular, mediante anticuerpos monoclonales conjugados con fluoróforos, para así poder ampliar el uso diagnóstico de los mismos: ej. antiCD20, antiCD56 (CECMED, 2017).

Se conformó el Equipo de Expertos con carácter multidisciplinario, conformados por 11 especialistas, entre ellos un Doctor en Ciencias, Másteres en Biotecnología, Licenciados en Biología y Farmacia, además de un Ingeniero Químico; con los conocimientos y competencias específicas para este producto (**Anexo 11**).

Hay que hacer notar que los Marcadores Leucocitarios son una familia de productos, constituidas por anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos, constituyendo reactivos utilizados en el conteo de poblaciones linfocitarias durante la evaluación de leucemias, linfomas, inmunodeficiencias y otras enfermedades del Sistema Inmune (G2. EM.011, G2.EM.016, G2.EM.017).

Se asocia al uso del Citómetro de Flujo como equipamiento analítico, comercializándose generalmente de manera conjunta el equipo y sus reactivos, por determinados proveedores que monopolizan el mercado de diagnóstico: ej. **PARTEC**[®] (<https://www.sysmex.es/nuestros-productos/product-singleview/cyflow-space-2976.html>), **DAKO**[®], **BECTON** y **DICKINSON**[®] (<http://www.biosystems.com.ar/es/marca/15/bd-biosciences>) o **BECKMAN COULTER**[®]. (<https://www.beckman.es/flow-cytometry/instruments/navios-ex>).

Su obtención para comercialización, involucra varias actividades o tareas, como se describe en el Diagrama de Flujo de Procesos (**Anexo 18**). De todos y cada uno de ellos depende la calidad del **ior[®] antiCD conjugado** que se obtiene. Las especificaciones de calidad del producto se establecen en el documento listado del número de parte resumidas como: 8014, 8026, 8030.

- **Análisis de Peligros.**

Se considera como peligro potencial en un proceso productivo, a las fallas que se pudieran tener en la obtención del producto, lo cual provocaría **no calidad** del producto y a su vez **quejas** del cliente. Para la obtención del producto marcador leucocitarios se identificaron *a priori* por los Expertos, **8 peligros potenciales**, determinados a lo largo de todo el proceso de obtención del producto final (**Anexo 19**), los cuales son:

- ❖ Insuficiente aprovisionamiento de insumos procesos.
- ❖ Mala calidad de materias primas, envases, etiquetas.
- ❖ No liberación del inóculo.
- ❖ Roturas o no disponibilidad del equipamiento crítico.
- ❖ Baja estabilidad de los productos intermedios.
- ❖ Baja concentración del anticuerpo conjugado.
- ❖ Demora en la liberación del producto.
- ❖ Malas Condiciones de almacenamiento.

En el siguiente análisis e implementación de un Plan HACCP, se desarrollan los primeros 5 principios del método para evaluar su utilidad en el desarrollo de este producto. Se realiza la confirmación de la existencia de pre-requisitos, consistentes en: el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Producción, la existencia de los Bancos Maestros liberados para los inóculos y el Expediente Maestro que describe en detalle el proceso productivo según el SGC LABEX (O1.PNO.02, O1.PNO.03).

Evaluada cada etapa del Flujo productivo para la obtención del reactivo de interés, se realizó el levantamiento por los Expertos de los **Puntos Críticos**, en todas y

cada una de las etapas por las que transita el producto; el mismo permite detectar peligros específicos y medidas para su control. En él se identifican, evalúan y previenen principalmente todos los riesgos de contaminación de los productos a lo largo de todos los procesos de la cadena de producción, estableciendo medidas preventivas y correctivas para su control, tendiente a asegurar la calidad. En el **Anexo 19** se describen diferencias en las etapas y sus controles, antes y después de aplicado este análisis.

El HACCP es un sistema preventivo que identifica, evalúa y previene los peligros que son importantes para la calidad del producto. Fue diseñado para evaluar y monitorear peligros potenciales de tipo biológico, químico o físico; así como, la forma de reducirlos, prevenirlos, o eliminarlos. Es un método sistemático para el control de los peligros asociados con las materias primas, ingredientes, procesos, ambiente, comercialización y su uso por el consumidor; controlando la calidad o los atributos legales del producto. (Wallace, 2014) La aplicación del Sistema es compatible con la aplicación de los sistemas de Gestión de la Calidad, como la serie ISO 9000. (Gutiérrez y col., 2010)

- **Análisis de Puntos Críticos (PC).**

Por el Grupo de Expertos se identificaron **24 puntos críticos**, en los cuales pueden evidenciarse los Peligros potenciales anteriormente referidos en el proceso de producción de los reactivos marcadores leucocitarios. De ellos, **13** son nuevos a partir de este análisis y el resto, habían sido identificados anteriormente, como parte del sistemático análisis de riesgo de la entidad. Como se muestra en el **Anexo 19**, la Etapa 3 que abarca el Proceso “*Procesamiento de IFA*” es donde se concentran la mayor cantidad de PC identificados. De igual forma, las principales mejoras declaradas por los clientes al producto, se relacionan con PC en la esta misma etapa, siendo necesario revisar la calidad de la conjugación para cumplir el requisito de “mayor fluorescencia”. El resto se declaran como entradas del Proceso “Gestión Comercial” al Proceso “Diseño y Desarrollo” (investigación): ejemplo, doble marcaje y nuevas dianas de poblaciones celulares (PPD.001).

Del resultado del análisis de los PC, el Sistema de Gestión de la Calidad en LABEX se enriquece con la propuesta de **4 controles de procesos, 1 control de la calidad para liberación y 2 nuevos registros**; constituyendo todos Mejoras al Sistema. (**Anexo 19**) En referencia a los dos primeros, se enfatiza en la necesidad de incorporar al Proceso Servicio de Control Analítico (**A5**), nuevas técnicas analíticas o microscópicas con diferentes fundamentos, lo que mejorará la

trazabilidad y la prevención para contribuir a la eficacia del sistema en el cumplimiento de los requisitos del producto (**Anexo 20**).

También se evidencia la interrelación con otros Procesos, “*Gestión comercial*” (**Proceso 07**) y “*Aprovisionamiento Logístico*” (**Proceso A4**), a través de documentos de planificación: Plan Logístico y Plan de Negocios; permitiendo reforzar la Gestión por Procesos orientado a la creación de valores para los clientes, que constituye un principio básico de la gestión de la calidad (www.iso.org.).

- **Evaluación de Riesgos y sus planes de mitigación.**

Dando seguimiento a los diferentes pasos de esta herramienta de ingeniería de calidad, el HACCP, el equipo de expertos debió enumerar todos los peligros que puede razonablemente preverse que se producirán en cada fase. Luego, deberá llevarse a cabo un análisis de peligros para identificar, en relación con el plan de APP, cuáles son los peligros cuya eliminación o reducción a niveles aceptables resulta indispensable (ISO 9000, 2015).

Como resultado del análisis del diagrama enriquecido con los PC, se procedió a enumerar los riesgos asociados, evaluar los peligros y gestionar las medidas de supervisión y/o control. Se identificaron **19 riesgos (Figura 5)**, de los cuales a 11 se les dio seguimiento con un plan de medida (PM) y a 8 por plan de vigilancia (PV) (**Anexo 21**). Estos riesgos fueron incorporados al Plan de Prevención de Riesgos de la entidad (LABEX, 2019).

Comúnmente se entiende por riesgo, la combinación de la probabilidad de que ocurra un daño y la gravedad de dicho daño. Se realizó la evaluación de los riesgos (peligros potenciales) empleando el sistema informático Quays® (<http://quays.com.sld.cu>), teniendo en cuenta la *Severidad, Consecuencia, Probabilidad y Ocurrencia*: Método SOD (WHO, 2003).

Se obtuvo como resultados que, de los 19 riesgos identificados hay 9 que fueron Críticos (47 %), 8 Moderados (42 %) y 2 Intolerables (11 %). Su distribución para seguimiento se muestra en la Figura 5. Su seguimiento se realiza a través de 30 medidas adoptadas y su ejecución por parte de los responsables, se realizó con una periodicidad de tres meses.

Una vez concluido el 2019, se evaluó el cumplimiento de estas medidas, las que se reflejan en la **Figura 6**.

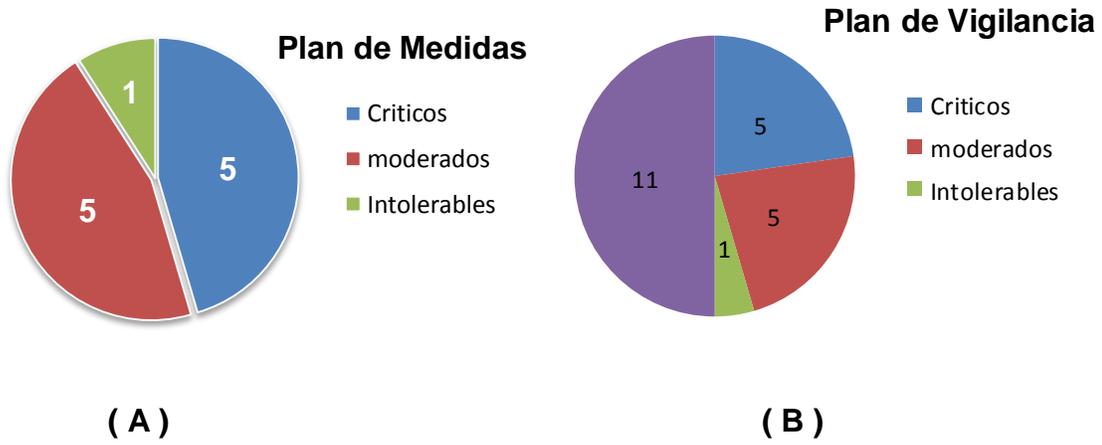


Figura 5. Evaluación de los Riesgos declarados y relacionados con el instrumento de seguimiento para la gestión de la calidad: A) Plan de medidas, B) Plan de Vigilancia.

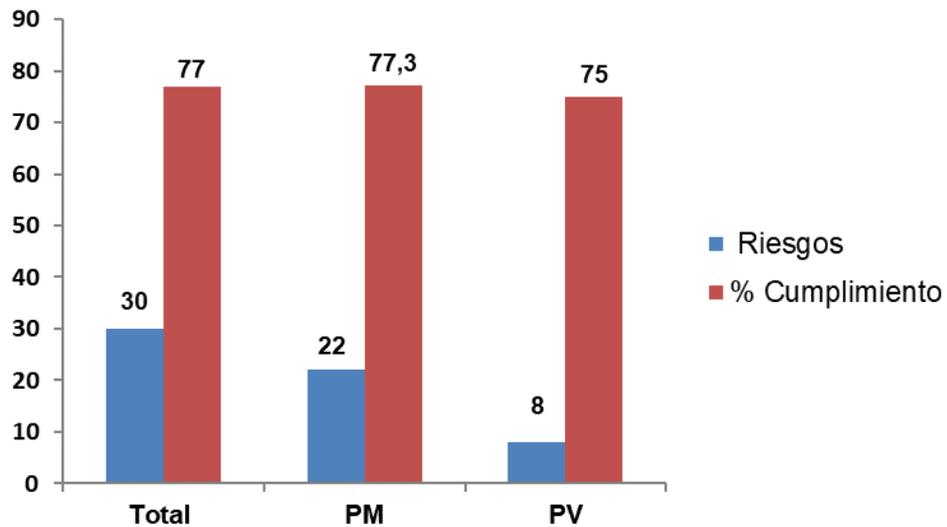


Figura 6. Representación gráfica del cumplimiento de las medidas adoptadas para la mitigación de los riesgos.

Tabla 1. Identificación de los nuevos puntos críticos para el 2020.

Riesgos/ "Peligros"	Medidas	Evaluación	
		Críticos	Moderados
5	7	3	2

Evaluando la efectividad de las herramientas de control establecidas, se obtuvo que de las tareas del plan de medidas que fueron 22, se resolvieron 16 que representa un (73 %) y de las tareas del plan de vigilancia que fueron 8, se logró gestionar 6 para un (75 %); demostrando en ambos casos altos valores de eficacia en la gestión para las mejoras de calidad del producto de interés.

De este análisis se derivaron en el 2020 nuevos PM y de PV, para darle seguimiento a los mismos (**Tabla 1**) y como se muestran, ninguno clasifica como Intolerable. En ellos, 2 de los riesgos se pueden catalogar como una debilidad del sistema ya que rondan en problemas organizativos e implementación de mejoras a procesos y a productos; mientras que los otros 3 constituyen amenazas, ya que se descargan en la logística de importaciones de la empresa CIM y la gestión de inversiones, que se logren aprobar su financiamiento (equipamiento y piezas de repuesto) (**Anexo 22**). Por lo que se alerta a la Dirección a tener más control del mismo para gestionar su solución (Proceso G3: *Gestión por la Dirección y Planificación*).

Otro paso sería el reconocimiento de los límites de los Puntos de control implementados y relacionados con los Puntos críticos. Para ello se construye un Plan o Ficha, como el que se muestra en la **Tabla 2**, para la Etapa 3; que permite alertar al personal del Proceso y a su vez, establecer correcciones con inmediatez.

Entre las mejoras que ofreció esta herramienta tenemos, que en el proceso de purificación y conjugación de los marcadores se implementará un nuevo **control de proceso** para la IFA purificada, que está basada en determinar la calidad del IFA con el AcM mediante una electroforesis. Con esa técnica incorporada, se lograría dentro del proceso verificar que el purificado presenta la pureza deseada, conservando el peso de la IgG en la banda mayoritaria y de esta forma que se entregue a control de la calidad y pueda pasar a su posterior liberación. Esta propuesta generó nuevos documentos dentro del proceso como fueron O5.PNO.17 y a su vez, una serie de registros asociados al procedimiento para su control.

Tabla 2. Ficha para la Etapa 3: *Procesamiento de IFA (Proceso O5)*.

Etapa	Controles de procesos	Método establecido	Límite de control.
3	<ul style="list-style-type: none"> Determinación de la pureza 	<ul style="list-style-type: none"> Electroforesis 	<ul style="list-style-type: none"> Banda mayoritaria a 150 kDa
	<ul style="list-style-type: none"> Determinación de la concentración del conjugado. 	<ul style="list-style-type: none"> Espectrofotometría $Conc\ Ac/FITC = \left(\frac{A_{280} - (0.35 * A_{495})}{1.4} \right) * F. Dil$ $PE = \left(\frac{A_{280} - \left(\frac{A_{545}}{5.4} \right)}{1.4} \right) * F. Dil$	<ul style="list-style-type: none"> FITC (Conc ≤ 11 mg/mL) PE (Conc ≤ 5.4 mg/mL)
	<ul style="list-style-type: none"> Determinación de la relación PE/Prot. 	<ul style="list-style-type: none"> Espectrofotometría $\frac{B - PE}{Prot} = 0.232 * \frac{A_{545}}{A_{280} - A_{545} * 0.222}$	<ul style="list-style-type: none"> Está recogiendo datos.
	<ul style="list-style-type: none"> Liberación de los conjugados mediante microscopía de fluorescencia. 	<ul style="list-style-type: none"> Microscopía de fluorescencia. 	<ul style="list-style-type: none"> Está en estudio, requiere validación.
	<ul style="list-style-type: none"> Chequeo diario de la temperatura (almacén). 	<ul style="list-style-type: none"> Temperatura 	<ul style="list-style-type: none"> (2 a 8)°C
<ul style="list-style-type: none"> Inspección. 	<ul style="list-style-type: none"> Según especificación del producto. 	<ul style="list-style-type: none"> 50% de la Fecha de vencimiento. 	

También se monitorea la **concentración del anticuerpo conjugado** y a su vez la **relación teórica fluorocromo/proteína (β -PE/P)**, realizando estudios centrado el valor en la ficoeritrina como fluorocromo, para mejoras de rendimientos en la conjugación y que podría incidir en una mejor fluorescencia del reactivo; proponiéndose, además como nuevos controles de procesos.

Otra mejora en el proceso de marcadores leucocitarios y muy solicitados por nuestros clientes (6 hospitales, 3 centros de investigación) está en el **diseño y obtención de un reactivo doble conjugado** para su uso en citometría de flujo, constituyendo una mejora del producto, para lo cual se comienza con la evaluación de la conjugación de los anticuerpos simples y luego la mezcla para la obtención del doble conjugado.

4.2.- Implementación de mejoras al producto: ior[®] antiCDs conjugados.

Como se mencionó anteriormente, el marcaje celular con AcM acoplados a fluorocromos, representa un paso crucial para la identificación de subtipos celulares mediante el uso de la técnica de Citometría de flujo. Los anticuerpos monoclonales permiten detectar y “etiquetar” poblaciones específicas de células. Esta tecnología consiste en la creación de un anticuerpo que sea capaz de unirse a una estructura específica (antígeno), mismo que se expresa en el tipo celular que se requiere identificar. Adicionalmente, este anticuerpo debe contener una unión covalente a un fluorocromo, que emitirá luz fluorescente cuando sea excitado por el láser; de este modo, la célula se “tiñe” y facilitará la identificación de las células que se unieron al anticuerpo o marcador (Pérez y col., 2018).

4.2.1.- Obtención de los Conjugados Simples antiCD.

➤ Obtención y evaluación del antiCD45 conjugado con FITC.

Para la obtención de conjugados simples, se seleccionan aquellos “marcadores” de mayor uso en el diagnóstico, como es el AcM reconocedor de las moléculas proteicas CD45 y como fluoróforo de amplio uso el FITC.

El CD45 es un antígeno común leucocitario, o llamado también pan-leucocitario, por el hecho de que la expresan todas las células hematopoyéticas salvo los eritrocitos. Se presentan en varias isoformas de distintos pesos moleculares, originadas por un proceso diferencial del ARNm. La forma de bajo peso molecular, denominada CD45RQ, constituye en los linfocitos T un marcador de memoria inmunológica; mientras que la forma de alto peso molecular CD45RA, se presenta en la membrana de las células vírgenes. Su sobreexpresión se refiere en la mayoría de los linfomas no Hodgkin, 97% de linfomas de células B y 90% de

linfomas T son positivos. Es negativo en células de RS de linfoma linfoblástico, en 30% del linfoma anaplásico y en las neoplasias de células plasmáticas (Sarmiento y col., 2012).

Para lograr un proceso de conjugación eficiente de estos Ac-fluoróforo, se debe garantizar que la proteína cumpla con los parámetros críticos que plantea el autor Roederer en 2012, para lograr la efectividad del acoplamiento entre las dos moléculas:

- Concentración del anticuerpo $\geq 5 \text{ mg/mL}$, como criterio general.
- Ausencia de Azida Sódica (NaN_3) en la solución del anticuerpo.
- pH básico ($\geq 9,5$) de la solución de anticuerpo.
- La solución del fluorocromo en el disolvente (DMSO) debe ser preparada al momento de ser utilizada para evitar la oxigenación del mismo.

Esto constituye uno de los Modos Fallas, identificados en la Etapa 3, a los cuales se le monitorea mediante PC que coinciden con ensayos de liberación del producto, estableciendo los límites de aceptación (ESP. 5027).

Al trabajar con una concentración mayor de 5 mg/mL del AcM a conjugar, se garantizó la efectividad de la conjugación, asegurando la mayor interacción entre el anticuerpo y el FITC. Esta interacción es de tipo covalente y se produce entre el grupo amino de la cadena lateral del aminoácido lisina, presente en el extremo carboxílico de la proteína, y el grupo cloruro de sulfonilo del FITC. Esta interacción ocurre a pH básico por ser la lisina un aminoácido clasificado como básico y que requiere estar cargado positivamente para la conjugación (Carballo y col., 2012).

La presencia de una sal como la azida sódica en solución con el anticuerpo, provoca que ocurra un fenómeno llamado *salting in*, donde en un medio poco salino, la solubilidad de las proteínas aumenta al incrementar la concentración de sales; además de proteger la solución de proteínas de contaminantes microbianos. Según se aumenta la fuerza iónica del medio, los iones en que éstas se disocian rodean a las proteínas e interaccionan con sus grupos ionizables; evitando así, que se establezcan interacciones atractivas entre las cadenas laterales o extremos cargados de las proteínas. Dicho fenómeno puede impedir que ocurra la interacción de la proteína con el fluorocromo por sus grupos activos (WHO, 2003).

Se revisa, evalúa y establece para los simples conjugados, las relaciones F/P constituyéndose en un parámetro de control para un mejor desempeño de los reactivos para la citometría de flujo. La relación F/P se establece para dar a conocer la cantidad de moléculas de fluorocromo que hay acopladas por molécula de anticuerpo IgG 1 murina, en un conjugado fluorescente con FITC. Los valores

de absorbancia característico de cada molécula resultó ser el parámetro de seguimiento de la FITC₄₉₅/Proteína₂₈₀, resultando a 495 nm (1.349) y a 280 nm (1.244) nm, respectivamente.

El rango de la relación F/P que se obtuvo fue de 4.84, en correspondencia con el rango de 3 a10 aplicado por los autores Harlow y Lane, validada por Xia et al. y Roederer et al, para las proteínas conjugadas con FITC; mostrando mayor cantidad de moléculas de fluoróforos por moléculas de anticuerpo. Estos resultados son también similares a los obtenidos por Rabell en 2014, donde la relación F/P que se obtuvo fue en el rango de 4,8 - 7,1. El conjugado se liberó mediante citometría de flujo, según el procedimiento **A5.PNO.30** y cumpliendo con los requisitos según la especificación **ESP. 5049**, descritos en la documentación del Sistema de Gestión de la Calidad en el LABEX. (http://cimsp/labex/DOCUMENTOS_LABEX/Forms/AllItems.aspx).

Se propone como “control de proceso”, además de la relación de absorbancias F/P (A_{495nm}/A_{280nm}), el cálculo de la concentración del anticuerpo conjugado (Conc. Ac/Conc. FITC), con un valor menor o igual a 11 mg/mL para conjugados con este fluorocromo (Rev. por la Dirección 2018). La concentración del anticuerpo conjugado para el antiCD45 conjugado con FITC fue de 5.51 mg/mL, cumpliendo con el requisito de ≤ 11 mg/mL (Whyte y Eaton, 2004).

En la tabla 2 se resumen los parámetros incluidos en los controles de procesos, como resultado de la aplicación de HACCP a la Etapa 3: *Conjugación del AcM con el fluoróforo*; para el caso específico de antiCD45 conjugado con FITC.

Determinación de la Actividad Biológica del conjugado antiCD45 con FITC.

Posteriormente al diseño, la determinación de la actividad biológica de los conjugados se realiza mediante una técnica que permita la visualización de la reacción de fluorescencia, presente luego de la reacción entre el antígeno y el anticuerpo específico. Con este fin pueden ser empleadas las técnicas de: microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (Rojas, 1995).

La actividad biológica del producto conjugado se determinó mediante la detección del porcentaje de reconocimiento leucocitario del anticuerpo fluorescente, por la técnica de Inmunofluorescencia directa, revelando por Citometría de Flujo la reacción antígeno-anticuerpo que se establece entre el anticuerpo fluorescente y el antígeno presente en la superficie celular de los leucocitos en sangre periférica humana. Esta reacción se detectó a través del Citómetro de Flujo *PARTEC*[®] y fue procesada con el programa FloMax[®] (Koller, 1975).

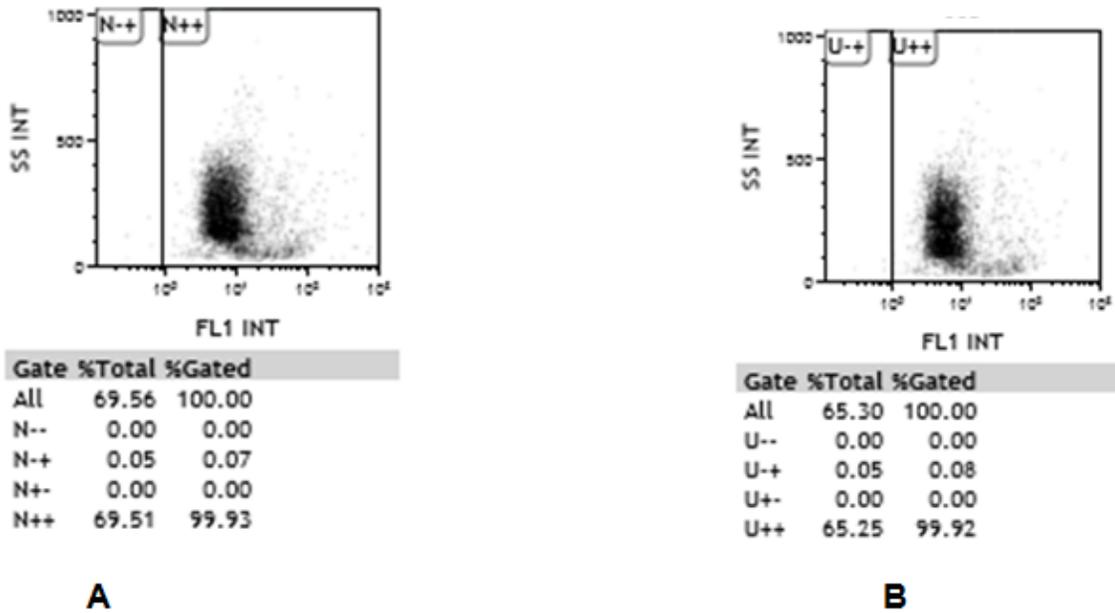


Figura 7. Histograma del porcentaje de reconocimiento del antiCD45 conjugado con FITC. Dónde: A (Referencia *PARTEC*[®]) y B (conjugado *LABEX*).

En la **Figura 7** se muestra el porcentaje de reconocimiento del conjugado antiCD45-FITC, para ser usado en citometría de flujo. Para cumplir con los estándares de calidad en sangre periférica humana, debe tener un porcentaje de reconocimiento de células leucocitarias en el rango de 90-100 %, donde se obtuvo para el reactivo del LABEX de 99.92 %. Además, presentó una intensidad de fluorescencia en correspondencia con el porcentaje de reconocimiento. Se comparó con el reactivo de referencia *PARTEC*[®], 99.93 %, observándose un comportamiento muy similar al conjugado en el histograma del reactivo de referencia.

Por lo que se puede concluir que el conjugado antiCD45 conjugado con FITC cumple con los requisitos de calidad y puede ser utilizado en la obtención de un reactivo doble conjugado.

➤ **Obtención y evaluación del antiCD4 conjugado con PE.**

Los linfocitos CD4+ también conocidos como T4, son glóbulos blancos que combaten infecciones y desempeñan un papel importante en el sistema inmunitario. Un conteo de CD4+ es una prueba que mide la cantidad de linfocitos CD4 en la sangre. El conteo de este “antígeno” marcador leucocitario, se usa para vigilar la salud del sistema inmunitario de personas inmunodeprimidas, como pacientes con VIH-SIDA y trasplantados. Cierta nivel de células CD4 sirve como referencia para iniciar profilaxis contra infecciones oportunistas y/o para iniciar tratamiento antirretroviral. El conteo de células CD4 es también un indicador de respuesta al tratamiento antirretroviral. (Noda y col., 2013)

Para la obtención de un marcador diagnóstico con este antígeno más específico, se utiliza un AcM reconocedor de esta proteína transmembrana, asociado a un fluoróforo que presente una mayor brillantez, eligiéndose la Ficoeritrina (PE).

Se conocen diferentes métodos para la conjugación con ficobiliproteínas, en los cuales se emplean reactivos heterobifuncionales (SPDP, SMCC y GMBS) que dan lugar a la formación de enlaces covalentes, permitiendo así la unión de las ficobiliproteínas a moléculas específicas. Para el desarrollo de este trabajo se utilizó el reactivo SMCC y se empleó el protocolo de Bermejo en 2002 modificado, descrito en Materiales y Métodos, generando el PNO una vez validado **O5.PNO.014** (<https://www.labclinics.com/diez-trucos-para-configurar-un-panel-de-citometria-de-flujo/>).

En la obtención del conjugado antiCD4 conjugado con PE se trabajó con una concentración del AcM de 5 *mg/mL*, para garantizar la efectividad de la conjugación, al permitir mayor interacción entre el anticuerpo y el fluorocromo.

Esta interacción es de tipo covalente y dependiente del tamaño de las moléculas implicadas. El seguimiento se realiza introduciendo fundamentalmente la electroforesis como técnica de seguimiento para el CP, pues el anticuerpo antiCD es del tipo IgG, por lo que se le refiere un tamaño molecular de alrededor de 60 kDa. Por su parte, la ficoeritrina, la cual es un polipéptido con tamaño molecular alrededor de 260-280 kDa y comparado con el FITC, la cual es una molécula orgánica de tamaño alrededor de 0.389 kDa (Koller, 1975).

Como se identificó en el análisis de HACCP, la etapa de obtención del conjugado con PE no presentaba un control de proceso y esto conlleva a un “peligro potencial” en la obtención de dicho conjugado; lo cual requiere ser evaluado para la gestión de calidad del producto intermedio obtenido, que constituye el IFA del *ior[®] antiCD4-PE*.

El fluorocromo ficoeritrina (PE) como producto intermedio tiene como inconveniente que para su almacenamiento se le debe añadir sulfato de amonio a concentración de 3M, donde este proceso es muy agresivo para la molécula y a la hora de utilizarlo para la conjugación, hay que realizar una diálisis exhaustiva para retirar todo el sulfato de amonio y dejar los sitios libres para que ocurra el acoplamiento del fluorocromo con el anticuerpo. Lo que puede resultar en una disminución de la concentración de la ficoeritrina, por pérdidas propias del proceso, por lo que podría introducirse un paso de concentración antes de la conjugación.

Por lo general la conjugación con PE, solía hacerse después que previamente se le realizaba la diálisis exhaustiva del pigmento. De ahí la importancia de que exista un proceso de preparación del fluorocromo, ya que hace menos complejo la etapa de conjugación. **Este se identifica como un punto crítico**, pues puede afectar la eficacia del proceso.

Para obtener los mejores resultados de la conjugación con este fluorocromo, lo mejor es realizarlo acabado de purificar la molécula y luego preparar el conjugado para la conservación, de esta manera se minimiza el efecto del preservante. Esta etapa también es considerada como un “peligro potencial”, estableciéndose como punto crítico y la necesidad de realizarle a los productos intermedios (purificados, conjugados, biomasa, ficoeritrina) el estudio de estabilidad de los mismos, para tener seguridad de la vida útil de estas materias primas.

El análisis de peligros, requiere la determinación de límites de control, para poder establecer el **control de proceso** en la etapa de conjugación del anticuerpo con el

fluorocromo ficoeritrina (PE), donde se realizó una revisión histórica de datos por cada lote de producto obtenido, para poder determinar si puede ser utilizado.

Se calculó la concentración del fluorocromo conjugado ya que este parámetro incide en una de las mejoras sugeridas por nuestros clientes, por estar relacionado con la intensidad de la fluorescencia. El resultado que se obtuvo fue de 4.4 *mg/mL* de PE, similares a los referidos por Bermejo en 2003. Se cumple con el parámetro reportado por los autores anteriormente citados, que plantean que la concentración del fluorocromo PE tiene que ser menor de 5.4 *mg/mL*.

Aunque se recomienda trabajar con concentraciones del fluorocromo mayores de 10 *mg/mL*, para tratar de evitar la dilución del mismo en el proceso de purificación del conjugado, el contar con una técnica sensible de detección del reconocimiento celular y de una alta especificidad por la presencia del Ac, reduce la influencia negativa que puede tener el exceso de fluorocromo. Esto constituye otro de los peligros potenciales para la obtención del conjugado, a los cuales se le incorpora un monitoreo por resultar un PC que coincide con el ensayo de liberación del producto conjugado (ESP. 5073).

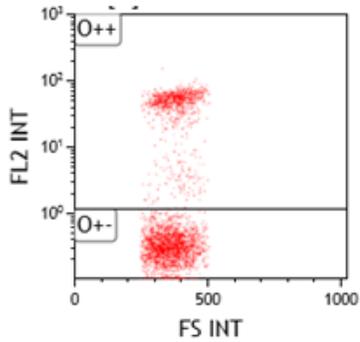
Por lo que en el “enfoque a mejoras” se realizó además la determinación de la concentración del anticuerpo conjugado, la relación molar (β -PE/P) mediante la ecuación utilizada por Bayardo 2017 (ecuación 2), dando como resultado **0.331** el que es similar al 0.299 obtenido por Bermejo en 2003. Los valores de absorbancia obtenidos en la conjugado del anti-CD4 conjugado con PE, fueron 0.379 y 0.381, a 280 *nm* y 545 *nm* respectivamente; por lo que calculando la relación molar de β -PE₅₄₅/P₂₈₀ resultó en **0.301**, resultados similares a lo aplicado por los autores antes citados.

En la **Tabla 2** se resumen los parámetros incluidos en los controles de procesos, como resultado de la aplicación de HACCP a la Etapa 3: *Conjugación del AcM con el fluoróforo*; para el caso específico de antiCD4-PE.

Determinación de la Actividad Biológica del conjugado antiCD4 conjugado con PE.

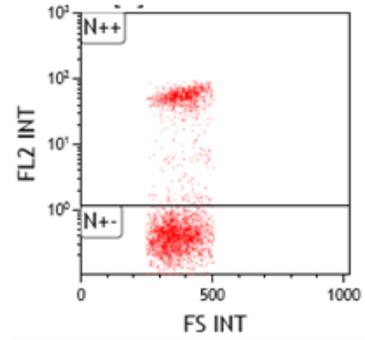
La actividad biológica determinada mediante el % de reconocimiento leucocitario del T4 en muestras de sangre periférica humana, por el anticuerpo fluorescente antiCD4, fue procesada con el programa *FloMax*[®] en un citómetro de flujo *PARTEC*[®] (Wallace, 2014).

En la **Figura 8** se muestran los resultados del uso del conjugado antiCD4 conjugado con PE y se comparó con el reactivo de referencia *PARTEC*[®].



Gate	%Total	%Gated
All	27.13	100.00
O--	0.00	0.00
O-+	0.00	0.00
O+-	18.50	68.17
O++	8.64	31.83

A



Gate	%Total	%Gated
All	24.88	100.00
N--	0.00	0.00
N-+	0.00	0.00
N+-	16.94	68.07
N++	7.95	31.93

B

Figura 8. Histograma del porcentaje de reconocimiento del conjugado antiCD4 conjugado con PE. Dónde: A (Referencia *PARTEC*[®]) y B (conjugado LABEX).

El porcentaje de reconocimiento del primero fue de 31.93 % para el conjugado de LABEX y 31.83 % para el de referencia, no existiendo diferencias significativas; además de presentar la intensidad de fluorescencia acorde al patrón y a las regulaciones de calidad. Para un marcador leucocitario de sangre periférica humana, específicamente para linfocitos CD4+, el porcentaje de reconocimiento debe estar en el rango de 30-51 %. Por lo que este conjugado cumple con los requisitos de calidad y puede ser utilizado para la obtención de un reactivo doble conjugado. Aunque ha de reflejarse para ambos reactivos, el valor cercano del % de reconocimiento, al límite inferior aceptado.

De manera general, con estos dos AcM para subpoblaciones CD45 y CD4 conjugados con fluoróforos de distintos espectros de excitación y emisión, la calidad de los antiCD simples conjugados que se producen en LABEX cumplen los requisitos de usos según regulaciones, permitiendo explorar las combinaciones de los mismos para incrementar las expectativas de los clientes.

4.2.2.- Influencia del fluorocromo en la conjugación con el anticuerpo antiCD4.

Los fluorocromos son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda y emiten a otra diferente. El espectro de excitación y emisión varía con los diferentes fluorocromos, por lo que su utilización está condicionada por el tipo de láser del que disponga el citómetro y de la longitud de onda a la que se exciten ellos mismos (Mao y Mullins, 2010).

Si disponemos de una láser con una longitud de onda de 488 *nm*, *ej. PARTEC®*, los fluorocromos que utilicemos deberán ser capaces de ser excitados a esta longitud de onda y además emitir en longitudes lo más lejanas posibles entre ellas. En CF, los anticuerpos están conjugados con fluorocromos, siendo la intensidad de fluorescencia detectada por el citómetro directamente proporcional al número de moléculas unidas al antígeno. La intensidad de fluorescencia también depende del fluorocromo utilizado, ya que hay fluorocromos que emiten con mayor intensidad que otros (Golim y col., 2007).

Se realizó una comparación del anticuerpo purificado antiCD4 obtenido a partir del LAM procedente del mismo Lote 02P1801, y que fue conjugado con los fluorocromos FITC y PE, para evaluar la influencia del fluorocromo en el reconocimiento de los anticuerpos.

En la **Tabla 3** se representa el porcentaje de reconocimiento del antiCD4, con los fluorocromos PE y FITC; cumpliendo en ambos casos con el rango establecido para el CD4 de 30-51%. Los valores marcados en círculo, resultan el porcentaje de liberación de los conjugados donde se logra **la mayor intensidad del fluorocromo** en el rango de reconocimiento.

Aunque ambos conjugados antiCD4 cumplen requisito de actividad biológica, en este caso, se aprecia con FITC un 44.3 % que resulta mayor al 31.93 % de PE; pero a una dilución menor 1/5 comparado con 1/20, respectivamente, evidenciándose que el PE resulta el fluoróforo más brillante.

Esto se debe a que el fluorocromo FITC al igual que la cianina, son moléculas orgánicas muy pequeñas y además generan una intensidad de fluorescencia relativamente baja; con respecto al fluorocromo PE y APC que son moléculas muy grandes, pero cuya utilización se ve muy limitada por problemas de conjugación, solapamiento y estabilidad. Se reconoce además en literatura, que el fluoróforo PE presenta mayor intensidad de fluorescencia (brilla más) que el FITC, pues el “**Índice de tinción**” de antiCD4 es 68.9 usando FITC y con PE es de 356.3. El índice de tinción es una medida del brillo del marcaje en citometría de flujo (Flores, 2016).

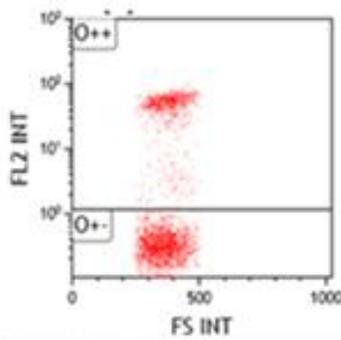
En la **Figura 9** se representa el gráfico de los conjugados con los dos fluorocromos PE y FITC y los porcentos de reconocimiento, en las diluciones recomendadas; donde en todos los casos se cumple con el rango del porcentaje de reconocimiento para los linfocitos CD4 que es 30-51 %. Se compararon con el reactivo de referencia *PARTEC*[®] (antiCD4-PE), donde la liberación por citometría de flujo se montó a un volumen del reactivo de 5 *uL* y se obtuvo 31.83 % de reconocimiento. En la propia figura, se muestran los gráficos de los conjugados, donde en las muestras de ambos conjugados se presentan la nube a una intensidad de 10² en forma alargada, con un patrón homogéneo, discriminando muy bien las células negativas de las positivas, comportamiento similar al obtenido con el reactivo de referencia (ver **Figura. 9 A**).

No obstante, no se puede perder de vista que para establecer la mejor dilución para su liberación hay que tener en cuenta el comportamiento del patrón de reconocimiento, la intensidad de fluorescencia, el porcentaje de reconocimiento e influye mucho la experticia que tenga el personal de liberación en la técnica de citometría de flujo.

Tabla 3. Por ciento de Reconocimiento del antiCD4 con los dos fluoróforos ensayados PE y FITC.

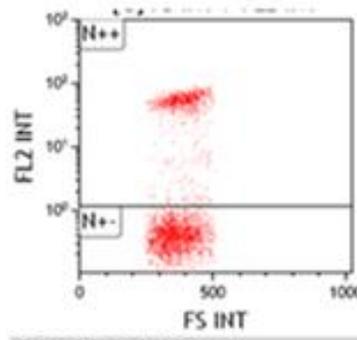
% Reconocimiento		
Dil	CD4-PE	CD4-FITC
2	44.06	44.71
5	39.44	44.3
10	31.43	45.04
20	31.93	32.26

Parámetro aceptable: 30 - 51 %



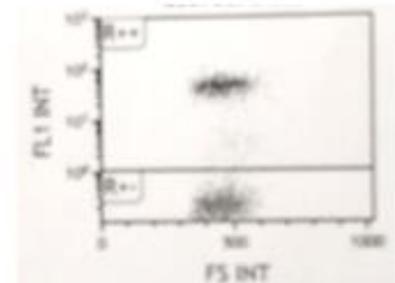
Gate	%Total	%Gated
All	27.13	100.00
O--	0.00	0.00
O+-	0.00	0.00
O+-	18.50	68.17
O++	8.64	31.83

A



Gate	%Total	%Gated
All	24.88	100.00
N--	0.00	0.00
N+-	0.00	0.00
N+-	16.94	68.07
N++	7.95	31.93

B



Gate	%Total	%Gated
All	22.63	100.00
R--	0.00	0.00
R+-	0.00	0.00
R+-	12.60	55.70
R++	10.02	44.30

C

Figura 9. Histogramas de los porcentajes de reconocimientos de: (A) Reactivo Comercial *PARTEC*[®], (B) el porcentaje de reconocimiento del antiCD4 conjugado con PE y (C) el porcentaje de reconocimiento del antiCD4 conjugado con FITC.

Por lo que se puede concluir que con ambos fluorocromos se obtiene un reconocimiento de los CD4 con el rango establecido y con buena intensidad, y que para el conjugado con PE presenta mayor brillantez, lo que favorece la identificación del antígeno celular en las subpoblaciones sanguíneas, a una menor concentración del AcM.

4.3.- Obtención de reactivos Dobles Conjugados para su reconocimiento por Citometría de Flujo.

Se tomaron como muestras los reactivos antiCD4 conjugado con PE y el reactivo antiCD45 conjugado con FITC, debido a que se quiere sustituir importaciones a nuestro sistema de salud nacional y este reactivo es el más utilizado en los hospitales para citometría de flujo en el seguimiento de pacientes con VIH-SIDA, para el Programa Nacional de SIDA en Cuba; además de algunos centros de investigación que lo solicitan, para análisis inmunológicos. Este Programa cuenta como soporte técnico con 6 citómetros *PARTEC*[®] distribuidos por todo el país, desde la zona oriental hasta el occidente, que permite el acceso al seguimiento diagnóstico de pacientes incluidos (Información del Dpto. Comercial).

Un reactivo que reconozca el antígeno CD4+/CD45+, permite identificar y estudiar las poblaciones de los linfocitos T cooperadores (CD3+, CD4+), aunque el antígeno CD4 también se expresa en la población de monocitos (CD3-CD4+). Por su lado, el antígeno CD45+ pan-leucocitario, se expresa en todas las células del sistema hematopoyético (linfocitos, monocitos, granulocitos) y sus precursores (Biosud, 2015).

Este reactivo puede utilizarse en los estudios de caracterización inmonofenotípicas de linfocitos que se utilizan habitualmente en la monitorización del estado inmunológico de pacientes después de un trasplante y en la caracterización y el seguimiento de inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes, leucemia etc. Por ejemplo, los pacientes con SIDA típicamente muestran niveles reducidos de linfocitos T4 cooperadores que se van haciendo menores, a medida que progresa la infección (Stelter-Stevenson, 2001; Biosud, 2015).

Por lo que, comenzando con esta variante para el doble marcaje de poblaciones linfocitarias, en este trabajo se realizaron 55 combinaciones de reactivos conjugados, evaluando diluciones desde 1/5 hasta 1/40 de antiCD4-PE y de antiCD45-FITC. Se calculó la variación del porcentaje de reconocimiento de las combinaciones, donde se observaron diferencias significativas para la obtención del doble marcaje, favoreciendo la dilución 1/10 del antiCD4-PE (CV<10%) que resulta las dos primeras diluciones ensayadas, las que cumple con los requisitos

de calidad para este antígeno específico (30-51 %), para las condiciones evaluadas (**Tabla 4, 5**).

Las variaciones en la relación del conjugado antiCD45-FITC por las diluciones ensayadas, no influyen significativamente en el desempeño de los dobles conjugados (**Tabla 5**). Por lo que, se percibe que el antiCD4-PE resulta en la combinación, el ingrediente farmacéutico activo crítico para el reactivo doble conjugado que se propone; en el cual se asegura un porcentaje de reconocimiento adecuado para los leucocitos, cuyo promedio es de 33% (30-51 %). Ambos reactivos por separados, en el rango de dilución recomendada, cumplen con el porcentaje de reconocimiento para su desempeño. (**Tabla 4,5**).

Para evaluar la mezcla de ambos reactivos en el doble conjugado, y poder ajustar sus mediciones por citometría, se selecciona la dilución 1/10 para ambos antiCD4-PE y antiCD45-FITC; evaluándose su desempeño de manera combinada, lo que se muestra en la **Figura 10**. Las diferentes réplicas realizadas se comportan en rangos de 33.00 ± 3.08 % y 99.82 ± 0.22 %, respectivamente.

Se observa como resultado de las combinaciones de reactivos, a diferentes diluciones, el comportamiento del antiCD45 conjugado con FITC fue estable, cumpliendo con el porcentaje de reconocimiento que se encuentra en un rango de 90-100 %, lo que sugiere que las variaciones en concentraciones no afectan su desempeño como marcador de esta población linfocitaria. Mientras que para el antiCD4 conjugado con PE, si resulta más sensible a las variaciones de concentraciones de sus anticuerpos conjugados (**Figura 10**), pero se prevé mejoras por la incorporación de PE partiendo de que el fluoróforo admite diluciones hasta 1/20 manteniendo su índice de brillantez, que podría compensar la reducción del marcaje específico Ac-Ag por la dilución utilizada (**Tabla 3**).

En los manuales de citometría se recomiendan, que los fluoróforos con índice de tinción más brillante (como la β -PE) funcionan mejor para células con menor expresión del antígeno o en la subpoblación más pequeña, mientras que los fluoróforos más tenues están más recomendados para antígenos más expresados. Sin embargo, cuando utilizamos diferentes colores, es posible que sea necesario hacer concesiones debido a la disponibilidad de fluoróforos, anticuerpos y/o la configuración del citómetro de flujo (SIGMA. P7562).

Tabla 4. Porciento de reconocimiento del antiCD4-PE en función de las diluciones de trabajo realizadas para el antiCD45-FITC.

% Reconocimiento del antiCD4-PE							
Diluciones del antiCD45-FITC	Diluciones del antiCD4-PE						
	5	10	15	20	30	35	40
10	30.5	32.5	32.2	28.6	13.3	27.2	33.1
15	30.3	35.2	26	29	14	31	32.1
20	30.2	35.9	30.9	29.9	21.9	30.4	28.2
30	31.4	31.9	28.6	28.8	17.1	29.6	26.4
35	29.4	34.9	28.6	25.3	30.7	21.4	23.1
40	30.6	27.6	27.9	21.3	20.2	25.3	30.6
Promedio	30.40	33.00	29.03	27.15	19.53	27.48	28.92
DS	0.65	3.08	2.21	3.27	6.42	3.67	3.77
CV	2.13	9.34	7.60	12.04	32.87	13.34	13.05
Rango de aceptación		CD 4					
		30-51 %					

Tabla 5. Porciento de reconocimiento del antiCD45-FITC en función de las diluciones de trabajo del antiCD4-PE.

% Reconocimiento del antiCD45-FITC							
Diluciones antiCD4-PE	Diluciones del antiCD45						
	5	10	15	20	30	35	40
10	100	100	100	99.9	99.7	96.8	99.9
15	92.2	99.4	92.7	98.8	75.7	92.9	90.8
20	99.3	99.8	99.5	95.9	95.7	92.4	99.4
30	99.9	100	98.2	100	98.8	99.2	97.5
35	100	99.9	100	100	100	100	100
40	100	99.8	100	100	100	99.9	100
Promedio	98.57	99.82	98.40	99.10	94.98	96.87	97.93
DS	3.13	0.22	2.88	1.64	9.59	3.47	3.62
CV	3.18	0.22	2.92	1.65	10.09	3.58	3.70
Rango de aceptación		CD 45 %					
		90-100					

Cuando se trata de una mezcla doble conjugada del reactivo para citometría, influyen muchos factores, como el proceso de preparación de la muestra, máxime cuando es mediante el empleo del método de lisis-lavado ya que con este método se manipula mucho la muestra y puede haber pérdida de célula. Por otro lado, los reactivos que se utilizan en la solución de lisado, tienen un efecto rápido y completo, pero tienen un efecto tóxico sobre los leucocitos. (Van Agthoven y col., 2010). Otro aspecto a considerar es que además del trabajo técnico que lleva el ajuste de la plantilla de análisis, específica para cada equipo citométrico, se introduce otro parámetro que es la compensación de fluorescencia; que requiere del conocimiento del método por el analista, ya que se incorporan dos fluoróforos que tienden a solaparse o producir el llamado “*quenching*” (**Anexo 23**).

En la **Figura 11**, donde se observa el doble marcaje de la mezcla realizada en la variante anteriormente discutida, se refiere la actividad biológica en el rango reportado por la literatura, según la norma de calidad para un marcador leucocitario de sangre periférica humana: 90-100 % para el CD45 y de 30-51 % para el CD4. (Domínguez, 2011). Es válido esclarecer que en el tratamiento a la lectura por citometría, en un reactivo doble conjugado antiCD45/antiCD4, se le suma el porcentaje de reconocimiento de los CD4 al CD45, ya que este último es un marcador pan leucocitario. Por ejemplo, en este caso para el antiCD4-PE se obtuvo 30.37 % y para el antiCD45-FITC de 99.47 %.

En la **Figura 11 (A)** se representa el porcentaje de reconocimiento del reactivo de referencia *PARTEC*[®] antiCD4-PE/antiCD45-FITC; evaluándose bajo requerimientos técnicos y tratamientos de estos, según el método utilizado en su protocolo.

En el mismo se obtuvo un reconocimiento de un 32.17 % de los CD4 y un 41.13 % de los CD45; por lo que no cumple con los requisitos de calidad para el CD45, sin embargo, el reconocimiento del CD4 cumple especificaciones, pero además se observa una buena intensidad de fluorescencia en el marcaje y un buen agrupamiento de la nube. Se debe resaltar que por el canal de FL1 para FITC (con CD45) se observan células enterradas (agrupadas en el borde inferior), lo cual puede deberse al **ajuste de la plantilla** que requiere mejoras y no a la pérdida de células marcadas. En el protocolo usado por *PARTEC*, para las muestras se usa el método no lisis-no lavado.

En la **Figura 11 (B)** se observa el doble marcaje de la propuesta doble conjugado del LABEX, antiCD4-PE/antiCD45-FITC, realizada en la dilución 1/10 y bajo las condiciones de ensayo establecidas para estos reactivos. Para el CD45 por FL1 para FITC fue de 99,47 % el reconocimiento, por lo que se encuentran en el rango.

Se recomienda el uso del FITC como fluoróforo para reconocer antiCD45, ya que este tiene bajo índice de tinción lo cual se prefiere en Ac con altos reconocimientos antigénico, como este pan-leucocitario (<https://www.labclinics.com/diez-trucos-para-configurar-un-panel-de-citometria-de-flujo>). Para el CD4 detectado por el canal FL2 para PE el porcentaje de reconocimiento fue de 30,37 %, cercano al límite inferior; evidenciándose baja intensidad de fluorescencia, ya que la nube no se resuelve de 10-100 por FL2, lo que puede ser causado **por falta de compensación**, como parte del ajuste de la plantilla para estos nuevos conjugados (**Anexo 24**).

Desde que se empieza a utilizar marcaje simultáneo con dos o más fluorocromos es necesario la **compensación de la fluorescencia**. En este sentido, cuando se utilizan dos fluorocromos que se pretende que sean excitados con una misma fuente de luz (un láser), es casi obligatorio que los espectros de excitación de ambos sean similares, pero que cada uno muestre un espectro de emisión suficientemente separados del otro. Esto permitirá discriminar entre la fluorescencia perteneciente a cada fluorocromo, con la interferencia mínima entre ambos, pues uno de los fluoróforos podría ser detectado dentro del canal de detección vecino (ej. para el FITC y el PE); dificultando la identificación de las poblaciones que son marcadas individualmente por los diferentes fluorocromos. (<https://www.thermofisher.com/antibody/product/CD20-Antibody-clone-2H7-Monoclonal/12-0209-42>).

A modo de ejemplo tanto el FITC como el PE son fluorocromos excitados de forma específica por la luz azul (488 nm) como pico máximo de la emisión suficientemente separados (530 nm y 570 nm respectivamente); esto permite que la fluorescencia del FITC y de la PE sean recogidas por detectores diferentes. Sin embargo, una cantidad relativamente pequeña de fluorescencia generada por el FITC contamina la luz recogida por el detector del PE, provocando el *Quenching* o **desactivación fluorescente** (**Anexo 25**) (Figuerola, 2016).

Esto en la práctica es bastante difícil, por la propia naturaleza y características de cada fluoróforo y no siempre es posible realizar la compensación. Se recomienda utilizar para diferentes marcadores, fluoróforos que no se solapen, para prevenir la pérdida de sensibilidad o fluorescencia. Todo esto lleva un ajuste muy fino de la plantilla que si no está bien definida introduce otros errores (**Anexo 25**), principalmente en citómetros que utilizan un solo láser, como los modelos CyFlow™ Space PARTEC® existente en nuestro SNS. Ello permitirá, además una visualización e interpretación de los datos adecuados y más objetivas por parte del

experto (<https://www.thermofisher.com/antibody/product/CD20-Antibody-clone-2H7-Monoclonal/12-0209-42>).

No obstante, y contrastando con el ensayo del conjugado simple antiCD4 con ambos fluoróforos (**Tabla 3**) la dilución que admitía el conjugado es 1/20, lo que habla a favor del índice de brillantez de este fluoróforo. Sin embargo, en comparación con el reactivo de referencia *PARTEC*[®], este marcador antigénico de T4 diseñado en LABEX, tiene el más bajo comportamiento del requisito para su liberación por actividad biológica (30,37 %). Esto apunta a fenómenos de reconocimientos Ag-Ac, que pueden afectarse por la disponibilidad del Ac y/o configuración de los canales del citómetro de flujo para la lectura del fluorocromo acompañante.

La ficoeritrina es un polipéptido con tamaño molecular alrededor de 260-280 kDa, que comparado con el FITC de tamaño alrededor de 0.4 kDa, resulta extremadamente grande al igual que otros fluoróforos naturales como el APC (Koller, 1975). Por lo que su utilización en conjugación con los Ac se ve muy limitada por problemas de conjugación, solapamiento y estabilidad. Es por lo cual, en determinados casos se llega a un compromiso entre las ventajas en la intensidad del marcaje del fluoróforo y los valores de reconocimientos antigénicos.

También existen diferencias entre los métodos de lavado de las muestras de sangre periférica a estudiar. Los reactivos *PARTEC*[®] utilizan el método de no lisis-no lavado y para los reactivos marcadores leucocitarios de LABEX, se utiliza el método de lisis-lavado. Esto se agrava debido al poco suministro de reactivos de importaciones (ej. stock de soluciones *PARTEC*), por las condiciones del bloqueo económico férreo al que se encuentra sometido nuestro país, no teniendo acceso a los reactivos para la realización de métodos no lisis-no lavado.

Se ha encontrado que una solución de lisis de eritrocitos muy fuerte puede causar la pérdida de cerca del 50 % de leucocitos, y una lisis débil deja intactos los leucocitos, pero utilizándose el mismo tiempo, podrían permanecer intactos los glóbulos rojos. Adicionalmente se ha reportado que diferentes soluciones de lisis tienen diferentes efectos sobre las señales SSC (*Side scatter*) y el FSC (*Forward scatter*) que identifican las poblaciones celulares. (Vásquez, 2009; Pérez y col., 2018).

Esta solución de lisis diseñada en LABEX, constituye otro de los elementos innovadores de los kits para Citometría de Flujo, lo que no será discutido en este trabajo.

Para tratar de dilucidar el efecto de estas soluciones de lisis (métodos) en las lecturas realizadas, se procede a ensayar el reactivo doble conjugado *PARTEC*[®] de referencia usando el método propuesto para el reactivo del LABEX- lisis y lavado-. En la variante 1 se ensaya el método de lisado, según el procedimiento **A5.PNO.30**; empleando como sangre periférica humana a un individuo supuestamente sano y la técnica fue desarrollada por el técnico #1 (**Tabla 6**).

En esta experimentación los resultados obtenidos en función del % de reconocimiento no fueron los mejores, ya que las evaluaciones no cumplieron para ninguno de los marcadores poblacionales: para el antiCD4-PE, como promedio en 27.15 ± 2.58 %; para el antiCD45-FITC, de 77.76 ± 13.82 % (deben estar 30-51% para antiCD4 y para antiCD45 de 90-100%). El método de lisado que se utilizó fue -lisis y lavado-, un método que requiere mucha manipulación de la muestra con la consecuente pérdida de células en los lavados sucesivos que se realizan; pudiendo haber influido en los resultados de reconocimientos. Lo más aconsejable, en la preparación de estos reactivos es el uso de un método -no lisis, no lavado- donde la intervención del técnico es mínima, reduciendo las pérdidas y constituye el método tradicional usado en los reactivos *PARTEC*[®].

En el marcaje de ambos reactivos (**Figura 12**), se observa el comportamiento del reactivo comercial comparado con la propuesta de mezclas conjugadas de reactivos *LABEX*[®]. Se reconoce que, a pesar de la afectación de la lectura de la actividad biológica, se reconoce que hay presencia de un reactivo doble conjugado, con marcaje en ambas regiones FL1-FITC y FL2-PE, además de una separación de las nubes entre los CD4 y los CD45, pero falta la intensidad de fluorescencia de ambos antiCDs para lograr los porcentos de reconocimientos establecidos por calidad. Esto demuestra lo agresivo que resultan las soluciones de lisado.

La dispersión de la nube puede ser el resultado de tener una plantilla no ajustada eficientemente, esto conlleva a falta de compensación entre fluorocromos excitados y por consecuente, la reducción de la fluorescencia principalmente para PE y una deficiente separación. Nótese que se mantiene la intensidad de la fluorescencia del PE por FL2, por debajo de 100, restándole intensidad y, por tanto, porcentaje de reconocimiento para este marcador. Se ha de tener mayor seguimiento y evaluación, para mejoras del antiCD4-PE, por cuanto resulta el reactivo más sensible en los límites de seguridad de uso del doble conjugado.

Tabla 6. Actividad biológica del reactivo doble conjugado *PARTEC*[®] para marcaje de poblaciones leucocitarias: antiCD4-PE/antiCD45-FITC (tratado con soluciones de lisis-lavados).

Dil	% Reconocimiento	
	CD4-PE	CD45- FITC
1:10	29.94	93.62
	26.68	71.35
	24.84	68.31
Promedio	27.15	77.76
DS	2.58	13.82
CV	9.51	17.77

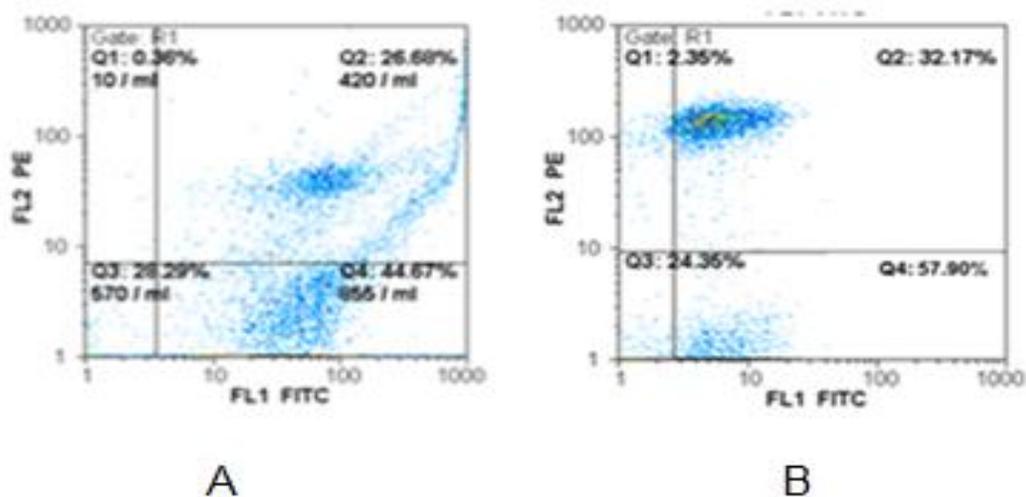


Figura 12. Representación del reconocimiento de los reactivos de la mezcla doble conjugada (A) y de referencia *PARTEC*[®](B).

Los diferentes protocolos de procesamiento de muestra, las condiciones en las que se almacenan los reactivos o en que se realizan las mediciones, o incluso las interrelaciones que pueden existir entre los fluorocromos y las células o los elementos de las células marcadas, pueden potencialmente cambiar el perfil de fluorescencia emitido por el detector del fluorocromo, debiendo tenerse en cuenta estas variables adicionales en el cálculo y evaluación de la compensación de fluorescencia. En este sentido, merece destacar que, en ocasiones el deterioro del reactivo, puede hacer imposible mantener una compensación de fluorescencia adecuada para la medición (<https://www.thermofisher.com/antibody/product/CD20-Antibody-clone-2H7-Monoclonal/12-0209-42>)

Se recomienda, seguir el monitoreo de la estabilidad del reactivo conjugado y la eficiencia de la conjugación, dos aspectos que se declaran como **puntos críticos** en el análisis de riesgos y de evaluación de clientes. También sería bueno trabajar en la concentración del antiCD4 conjugado con PE para lograr mayor intensidad de fluorescencia y separación de la nube; parámetro ya identificado como “punto crítico” para la obtención del reactivo doble conjugado.

Por lo que se puede concluir que el reactivo doble conjugado obtenido en LABEX, comparándolo con el comercial *PARTEC*[®], detecta de manera específica los determinantes antigénicos seleccionados en ambos casos: CD4, CD45; pero se debe trabajar en la limpieza del marcaje de los perfiles que se leen en el citómetro, lo cual puede ser mejorado a través del trabajo con la plantilla y a su vez, la compensación de la fluorescencia.

Se sugiere de igual forma trabajar en la conjugación con otros fluorocromos (ej. APC y también PE/cianina5) que reduzcan las interferencias, para mayor separación de la nube y en el desarrollo de soluciones de lavado-lavado; aspectos que se incorporan como nuevos objetos de investigación.

4.3.- Análisis de la variabilidad del reactivo doble conjugado de LABEX por citometría de flujo.

La variabilidad de factores que afectan el “marcaje” de un reactivo para citometría, inciden en el logro de un producto comercialmente exitoso, lo que hace de esta línea de producto todo un reto para la obtención de diagnosticadores fiables. A eso se suma la experiencia del personal técnico, que es incluida como una variable externa a minimizar, convirtiéndose en pre-requisito para poder llegar al registro de los mismo. De ahí que sea preciso incluir en este estudio, la evaluación de la variabilidad de lecturas atendiendo a los requerimientos técnicos y de

conocimiento que requiere la tecnología, sirviendo como patrón de variabilidad para los ensayos.

Para ello se realizaron tres réplicas a la dilución 1/10 de AcM marcadores, buscado la reproducibilidad del ensayo, además de buscar la sensibilidad del mismo al ser desarrolladas la técnica con dos donantes supuestamente sanos y con tres técnicos diferentes, teniendo como antecedente la evaluación de las diluciones apropiadas del IFA. Esto no constituye un ejercicio de validación de técnicas / reactivos, pero se exponen resultados *a priori* sobre estos parámetros.

Para ellos se seleccionan las variantes (muestras) con resultados subóptimos. No obstante, tener un reconocimiento por debajo de los parámetros establecidos, se realiza un análisis de datos, de manera relativa, que permita visualizar comportamientos en el doble conjugado. Se hizo una comparación de la combinación obtenida con el respecto al patrón comercial, empleando las mismas condiciones en cuanto a paciente (sangre periférica humana), técnico y empleando la plantilla diseñada para evaluación en Citómetros Flow-*PARTEC*, con el reactivo propuesto, teniendo en cuenta las recomendaciones por Labclinics (<https://www.labclinics.com>).

En la **Figura 13**, se puede observar que el antiCD4-PE es el reactivo con mayor variabilidad en todos los ensayos, aún para con el de referencia de *PARTEC*[®], superando el CV $\geq 15\%$ recomendado para estos tipos de técnicas de análisis.

Esto no se evidencia para el antiCD45-FITC cuyos CV para ambos conjugados (*PARTEC*[®] vs *LABEX*[®]) se mantienen por debajo del 10%. Este comportamiento estaba afectado fundamentalmente por el ajuste de la plantilla, donde se resumen las principales diferencias entre ambos, favoreciendo las lecturas de los reactivos *LABEX*[®] y afectando en mayor medida a *PARTEC*[®]; demostrando la incidencia que se reduce en el caso del antiCD45, al compensarse por la fluorescencia sumada de este antígeno marcador presentes en todas las células hematopoyéticas, excepto los eritrocitos.

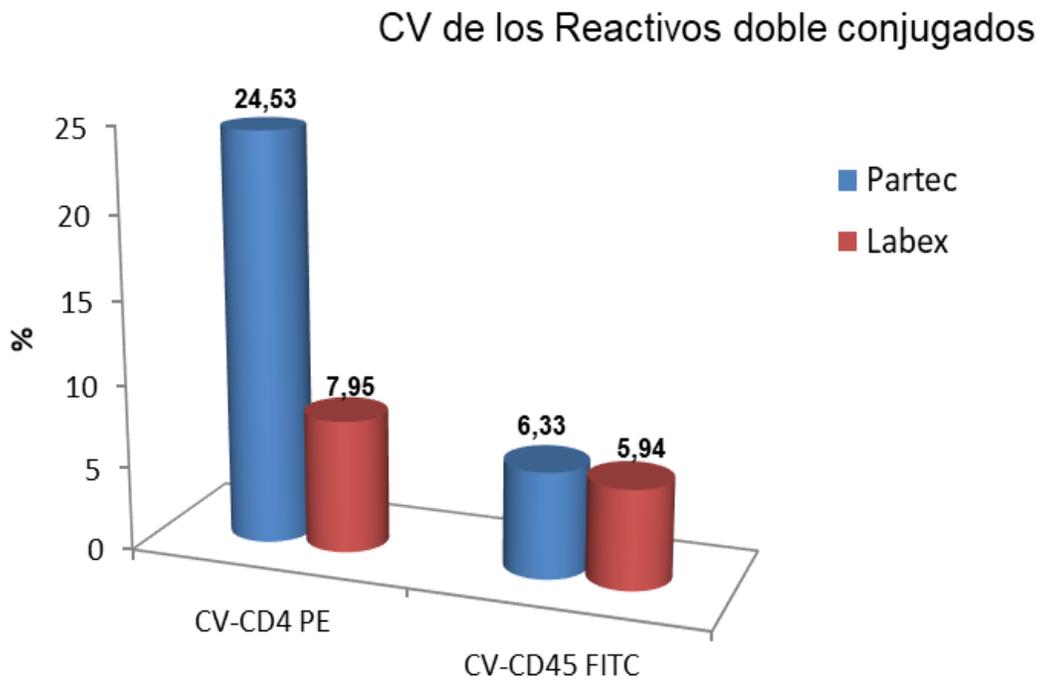


Figura 13. Comparación del reactivo *LABEX*[®] vs *PARTEC*[®] en base a sus Coeficientes de Variación para los resultados del ensayo, en las condiciones probadas.

4.3.1. Análisis de la variabilidad del reactivo de LABEX por diferencias entre técnicos (analistas).

No se puede dejar de mencionar que la tecnología de citometría de flujo es una técnica de punta, pero requiere de mucha experiencia y preparación del técnico, una elaboración y ajuste fino de la plantilla de adquisición, análisis de los resultados y una buena compensación a la hora de trabajar con dos fluorocromos; un buen análisis de los resultados procesados, además de un buen método de lisado de la muestra para lograr obtener los reactivos con la calidad requerida. Es por eso que se requiere evaluar la incidencia en dependencia del personal que asista la misma: técnico, paciente.

Se tomaron muestras de sangre periférica humana de dos individuos supuestamente sanos, se realizó el montaje de la técnica de citometría de flujo por tres técnicos diferentes, donde: el **técnico 1** presenta un mayor adiestramiento en la técnica, el **técnico 2** reproduce el método según procedimiento y el **técnico 3** se le explicó el procedimiento y conoce el manejo del equipo.

Entre los resultados obtenidos (**Tabla 7**) se puede decir que en el caso de los tres técnicos hubo reconocimiento del marcaje, aunque no cumplieron con el rango establecidos para ambos anticuerpos: 7,4-20,5 % para antiCD4-PE y 28,2-64,4 % para antiCD45-FITC. Se recuerda que se trabaja con muestras subóptimas en los % de reconocimientos.

En cuanto a los individuos se puede observar como para los técnicos 1 y 3 los resultados del promedio del % de reconocimiento para el antiCD4, los más elevados los tiene el individuo 1; no así para el resultado obtenido con el técnico 2, siendo el que obtiene los valores menores de reconocimiento. En cuanto a la variabilidad del ensayo por técnicos se ve que el que menor variabilidad obtuvo fue el técnico 1, confirmando la importancia del entrenamiento en los procedimientos técnicos y manejo del equipo específico.

Los resultados expuestos en la tabla 7 son también un análisis del promedio de las réplicas de los porcentos de reconocimientos de cada técnico por individuo “supuestamente sano”.

Como se observa, no existen diferencias estadísticas entre individuos, al ser tratadas por el mismo técnico; pudiendo asumir que las muestras son de pacientes supuestamente sanos y que el incumplimiento de los valores de % reconocimiento, para su liberación, resultan del tratamiento o manipulación de las muestras. Este comportamiento se observó también con la referencia *PARTEC*[®], donde el valor también se muestra en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Promedio del % de reconocimiento obtenido en el análisis de la variabilidad del reactivo de LABEX.

Porcentaje de Reconocimiento		LABEX		PARTEC®	
		Promedio CD4-PE	Promedio CD45-FITC	Promedio CD4-PE	Promedio CD45-FITC
Técnico 1 (c/entren)	Individuo 1	20.96	63.34	32.17	57.90
	Individuo 2	20.12	65.53		
	X	20,54	64,44		
	SD	0,59	1,55		
	CV	2,89	2,40		
Técnico 2 (s/entren**)	Individuo 1	5.89	25.20	22.66	40.67
	Individuo 2	8.91	30.83		
	X	7,40	28,02		
	SD	2,14	3,98		
	CV	28,86	14,21		
Técnico3 (s/entren*)	Individuo 1	10.17	35.15	32.17	41.13
	Individuo 2	9.70	41.17		
	X	9,94	38,16		
	SD	0,33	4,26		
	CV	3,35	11,16		

**sin entrenamiento en la técnica; *sin entrenamiento en los reactivos LABEX.

Si analizamos los resultados obtenidos mediante la representación gráfica de la **Figura 14**, se puede apreciar como para el reactivo de referencia *PARTEC*[®], se presenta buena separación de las nubes, además de buena intensidad de fluorescencia por FL2 PE (antiCD4). Se observa que el marcaje del antiCD45-FITC por FL1 presenta células enterradas en el eje y eso es debido a que el método utilizado para procesar este reactivo fue el -lisado y lavado- no siendo lo más apropiado para este reactivo, ya que el fabricante lo diseñó para el método de -no lisado, no lavado- pero de igual forma, se observa reconocimiento para ambos fluorocromos. Hay que seguir trabajando en el ajuste de la plantilla para mejorar los porcentos de reconocimiento, mediante la detección de todas las células marcadas.

Si hacemos una comparación entre técnicos según la **Figura 14**, se puede apreciar que los tres técnicos obtuvieron marcaje por ambos canales por lo que hay evidencias de la utilidad del doble conjugado, pero se demuestra que la experiencia del **técnico 1** influye mucho en la lectura de los resultados; resultando en una menor variabilidad en los datos brindados como resultados, vistos en su CV (Figura 15).

El técnico que presentó los peores resultados fue el técnico 2, que conoce los fundamentos de la citometría y el procedimiento específico (**A5.PNO.30**), pero le falta experiencia en el desarrollo de la técnica; lo que previene de la necesidad de un entrenamiento del personal de salud que utilizará el reactivo marcador leucocitario que se propone: *ior*[®] antiCDs (**Figura 15**).

Se puede concluir que la técnica de citometría de flujo es muy vulnerable a cambios, se necesita de reactivos con la concentración de fluorescencia necesaria, seguir ajustando la plantilla de análisis y la compensación, así como trabajar en el método para lograr un método que sea lisado no lavado para así evitar que se pierdan células marcadas y disminuir el error por manipulación del técnico.

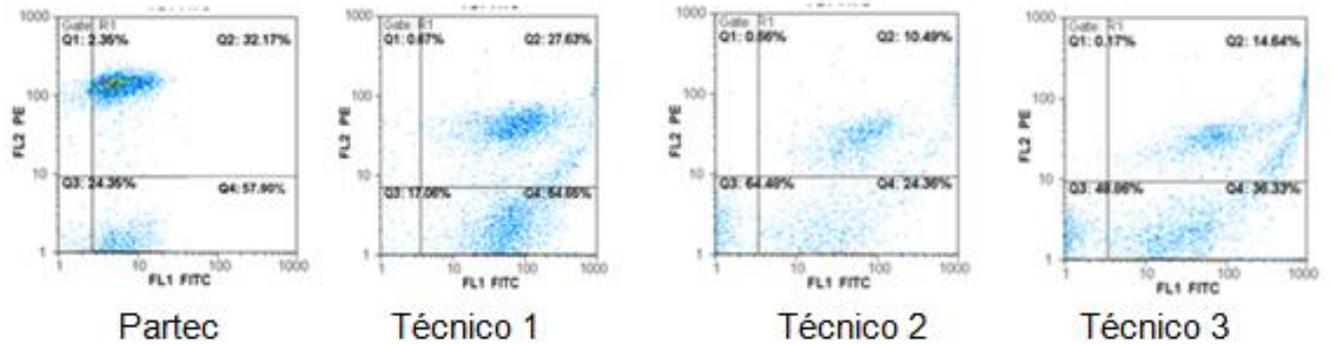


Figura 14. Representación gráfica del marcaje citométrico obtenido por los tres técnicos participantes del ensayo, con muestras del **individuo 1** supuestamente sano, comparado con el marcaje por uso del *PARTEC*®.

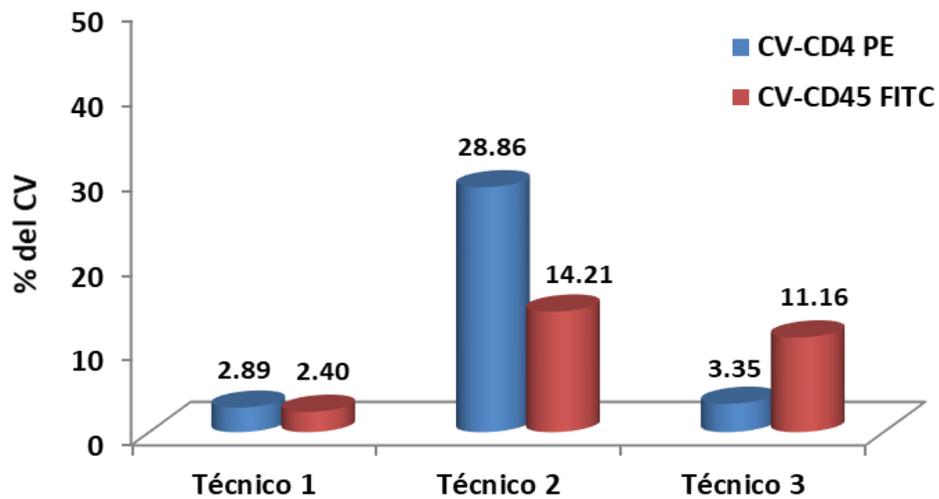


Figura 15. Variabilidad del Reactivo LABEX antiCD4-PE/antiCD45-FITC (ensayos realizados con muestras de dos individuos sanos y tres analistas).

4.4. Evaluación de un reactivo doble conjugado, antiCD4-PE/antiCD3-FITC para inmunofenotipaje de linfocitos T.

Aunque la combinación más solicitada por los clientes en los Talleres realizados, como parte de la estrategia de mejoras, es el antiCD4-PE/antiCD45-FITC, utilizando el reactivo en citómetros de flujo marca *PARTEC*[®] y principalmente para seguimiento de pacientes en el programa VIH-SIDA; se decide probar otras mezclas, para seguir el comportamiento del antiCD4-PE combinado con otros anticuerpos, y ver si presenta el mismo comportamiento que con la mezcla anterior.

Se escogió el antiCD4-PE/antiCD3-FITC como combinación de reactivo doble conjugado, pues resulta muy útil para los centros de investigación que se dedican a la evaluación de protocolos de abordaje a pacientes, resultando en otro ámbito comercial, ya que permite la identificación y cuantificación del % de linfocitos T en muestras de sangre o preparaciones celulares. Se utilizan frecuentemente para la clasificación clínica de muestras hematológicas en pacientes con leucemias, linfomas o inmunodeficiencias (Biosud, 2015).

Los linfocitos T son un grupo heterogéneo de células específicas para el reconocimiento de antígenos, que expresan marcadores comunes como CD3 y el receptor específico para antígenos TCR; además de los marcadores de superficie que definen subpoblaciones como CD4, para linfocitos T cooperadores (Th) y CD8 para T citolíticos (CTLs). Sus determinaciones son de importancia en el diagnóstico, el pronóstico y el esclarecimiento de la fisiopatología de ciertas enfermedades que se caracterizan por alteraciones en el número de linfocitos, como enfermedades crónicas, enfermedades autoinmunes, e inmunodeficiencias principalmente en el SIDA (Villegas, 2019).

Esta mezcla se desarrolló por el **técnico 1**, ya que se constata que es el que presenta mejor entrenamiento en la técnica. Se utilizó como sangre al **individuo 1**, debido a que fue con el que se obtuvo los mejores marcajes antiCD4-PE/antiCD45-FITC. Se realizó por triplicado buscando la reproducibilidad del ensayo, en el citómetro *PARTEC*[®] y se analizaron los datos en el programa *FloMax*[®], empleando la misma plantilla anteriormente creada para el antiCD4-PE/antiCD45-FITC.

En la **Tabla 8** se puede observar como para el caso del antiCD4-PE no cumplió con el porcentaje de reconocimiento para este anticuerpo que es de 30-51%, presentando resultados muy similares a los obtenidos en la mezcla anterior antiCD4-PE/antiCD45-FITC para los diferentes ensayos con reactivos de referencia y los propios del LABEX dilución 1/10: **27.15%** y **20.54%**, respectivamente (**Tabla 6 y 7**).

Esto confirma la necesidad de revisar aspectos técnicos como la compensación en reactivos con PE y el método de lisado para reducir pérdida de células. También se sugiere revisar los rendimientos de conjugación del AcM con la PE, aunque como se evalúa en el **Capítulo 4.2.1**, este se presenta en el rango propuesto por los protocolos de referencia.

En cambio, para el antiCD3-FITC si se cumple con los estándares establecidos para el cumplimiento del porcentaje de reconocimiento de los leucocitos CD3+, que en este caso es de 63-76 % en sangre periférica para un individuo sano; resultando favorable para el desarrollo de marcadores de poblaciones linfocitarias en general.

Se realizó un ensayo de la reproducibilidad a modo comparativo con un patrón *PARTEC*[®], determinando los coeficientes de variación, donde se pudo observar que para ambos anticuerpos se cumple con el rango aceptable para métodos de ensayo en laboratorios, como la citometría, que refiere de 5-15 % de variabilidad.

Analizando la **Figura 16**, en el histograma se observa que el reactivo antiCD3-FITC/antiCD4-PE propuesto en LABEX, reconoce los antígenos CD3 y CD4 presentes en los linfocitos T cooperadores. Pero para mejoras del mismo, se debe trabajar en la intensidad de la nube para el antiCD4-PE (canal FL2) y en la compensación para lograr una mejor separación del marcaje, reduciendo o eliminando las fluorescencias que se detectan en las zonas límites de ambos fluorocromos; lo cual se atribuye al solapamiento en la lectura e intensidad del PE y FITC. La mejora en la compensación propiciará de igual manera que las lecturas en FL2 para el antiCD4, se detecten cercanos a 100; influyendo las concentraciones del fluorocromo que se utilicen, permitiendo que estos reactivos tengan un marcaje más limpio y separado.

En la lectura del reactivo doble conjugado *PARTEC*[®] de referencia, se visualiza nuevamente un enterramiento de fluorescencia por el canal FL1 para FITC, confirmando distorsiones en la plantilla propuesta; pero nótese la excelente separación de las nubes y es significativo que estos reactivos no requieren compensación.

Tabla 8. Actividad biológica del doble conjugado propuesto antiCD4-PE/antiCD3-FITC en muestras de sangre periférica de un individuo sano.

AcM conjugado	% Reconocimiento	
	antiCD4-PE	antiCD3-FITC
Réplicas de muestras del individuo 1	23.84	73.05
	23.49	72.7
	22.22	71.43
Promedio (X)	23.18	72.39
Desv. Est. (DE)	0.85	0.85
Coef. Var. (CV)	3.68	1.18
Requisito aceptable	30-51%	63-76 %

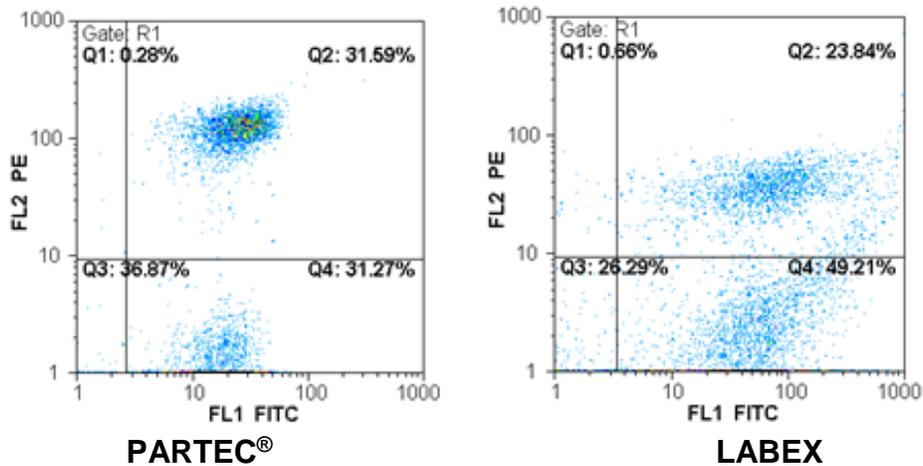


Figura 16. Representación gráfica de los marcajes del reactivo antiCD4-PE/antiCD3-FITC de *PARTEC*® y LABEX.

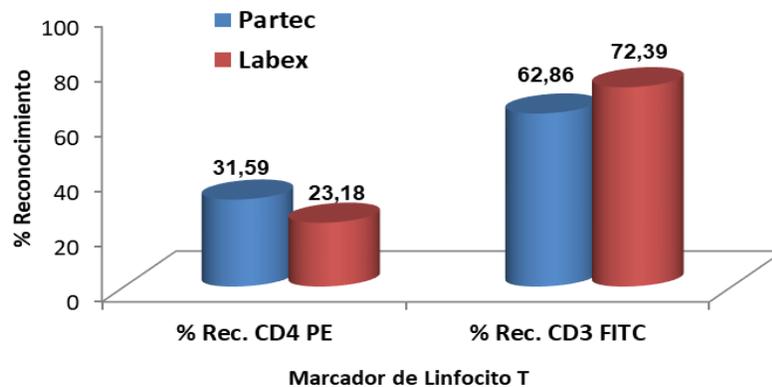


Figura 17. Comparación de la actividad biológica del reactivo *PARTEC*® con el reactivo LABEX para el marcaje de linfocitos T.

Comparando esta mezcla obtenida en LABEX con el patrón comercial *PARTEC*[®], se puede observar en la **Figura 17** que el reactivo de referencia cumplió con los estándares establecidos para CD4, sin embargo, quedan los valores por debajo del límite inferior para el CD3. El reactivo antiCD3-FITC de LABEX presenta mejor por ciento de reconocimiento que el comercial, usando la plantilla diseñada para el uso de los *ior*[®] *antiCD*.

Se insiste en la necesidad del ajuste de la plantilla creada por LABEX por los analistas, para obtener mejores resultados en la interpretación de las mediciones, cuando se usan reactivos de diferentes proveedores.

Este reactivo antiCD3-FITC/antiCD4-PE puede utilizarse en los estudios de caracterización inmunofenotípica de linfocitos T que se utilizan habitualmente en la monitorización del estado inmunológico de pacientes después de un trasplante y en la caracterización y seguimiento de inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes, leucemia, entre otras. Los pacientes con SIDA típicamente muestran niveles reducidos de linfocitos T cooperadores haciéndose menores, a medida que progresa la infección. El antígeno CD4 también se expresa en la población de los monocitos (Villegas C. 2019).

4.5. Evaluación de un reactivo doble conjugado para reconocimiento de linfocitos B.

Teniendo en cuenta, los inconvenientes detectados en los reactivos antiCD4 marcados con PE, se utilizó otro anticuerpo conjugado con el mismo fluorocromo – Ficoeritrina- para evaluar la incidencia de un anticuerpo con diferente reconocimiento, para la misma fluorescencia y, por tanto, intensidad similar. Ambos anticuerpos reconocen células inmunes de diferentes linajes, por lo que en su reconocimiento por citometría sus marcajes serán excluyentes.

Se decidió que fuera el antiCD20-PE debido a que es uno de los marcadores más utilizados en el diagnóstico de pacientes con cáncer, línea principal de trabajo para el Centro de Inmunología Molecular. El CD20 se encuentra en la superficie celular de los linfocitos B normales y neoplásicos, con diferentes niveles de expresión, pero está ausente en los monocitos y granulocitos. CD20 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que actúa como una molécula de transducción de señales crítica y reguladora del desarrollo, diferenciación y activación de linfocitos B. Se expresa en las células dendríticas foliculares y linfocitos B, desde los primeros estadios reconocibles del linaje B, y su expresión se pierde en la maduración a plasmocitos. CD20 es un marcador de linfocitos B comúnmente utilizado.

El reactivo antiCD3-FITC/antiCD20-PE reconoce los antígenos CD3 presentes en los linfocitos T cooperadores y el CD20 presente en los linfocitos B. Este reactivo puede utilizarse en los estudios de caracterización inmunofenotípica de linfocitos que se utilizan habitualmente en la monitorización del estado inmunológico de pacientes después de un trasplante y en la caracterización y seguimiento de inmunodeficiencias, provocadas por enfermedades autoinmunes o en pacientes oncológicos (Kokuima y col., 2019).

La mezcla establecida fue antiCD20-PE/antiCD3-FITC. Se realizó bajo las mismas condiciones de ensayo, que las evaluaciones anteriormente realizadas (técnico 1, individuo 1, método lisado y lavado, plantilla propuesta). Los resultados se muestran en la (**Tabla 9** y la **Figura 18**).

En la **Tabla 9** se observa el cumplimiento del porcentaje de reconocimiento en individuos sanos de ambos parámetros según regulaciones de calidad: para el CD20 es de 3-25 % y para el CD3 de 63-76 %.

También se visualiza en la **Figura 18 (A)** la separación de las nubes, con características similares discutidas en anteriores reactivos que son propuestas de doble marcaje, que requieren diseñar mejoras de estos. Se observa en el marcaje por el canal de FL1 que es el CD3 FITC, está muy disperso y requiere ajustar para poder incrementar la intensidad de lectura y reconocer el patrón característico. El desarrollo de métodos lisado-no lavado para estos reactivos permitirá incrementar los valores de % reconocimiento haciendo la técnica más sensible para los dobles conjugados y la menor confluencia de la variabilidad por la manipulación que recibe el material biológico.

En la **Figura 18 (B)** se observa el marcaje óptimo del antiCD20-PE por el canal FL2 donde se aprecia una buena intensidad de fluorescencia, además de una buena separación con el marcaje del antiCD3-FITC por el canal de FL1 también con buena intensidad y limpieza del marcaje. El marcaje que se observa por debajo a la izquierda del marcaje del antiCD20 son las células negativas a ambos marcajes. Comparándola con la **Figura 18 (A)**, la primera diferencia es la escala empleada donde para la **Figura 18 (B)** está a escala logarítmica, en cambio la **Figura 18 (A)** está a escala lineal, esta diferencia determina mucho la posición de la nube. Por lo que se evidencia notablemente el ajuste de la plantilla diseñada para estos reactivos. No obstante, se logra marcajes específicos para cada subpoblación linfocitaria.

Tabla 9. Actividad biológica del doble conjugado antiCD20-PE/antiCD3-FITC en el marcaje por citometría de linfocitos.

AcM conjugados	% Reconocimiento	
	antiCD20-PE	antiCD3-FITC
Réplicas del Individuo 1	6.25	75.46
	6.37	71.89
	6.44	73.72
Promedio	6.35	73.69
Desv. Est. (DE)	0.10	1.79
Coef. Var. (CV)	1.51	2.42
Límites de reconocimientos	3-25 %	63-76 %

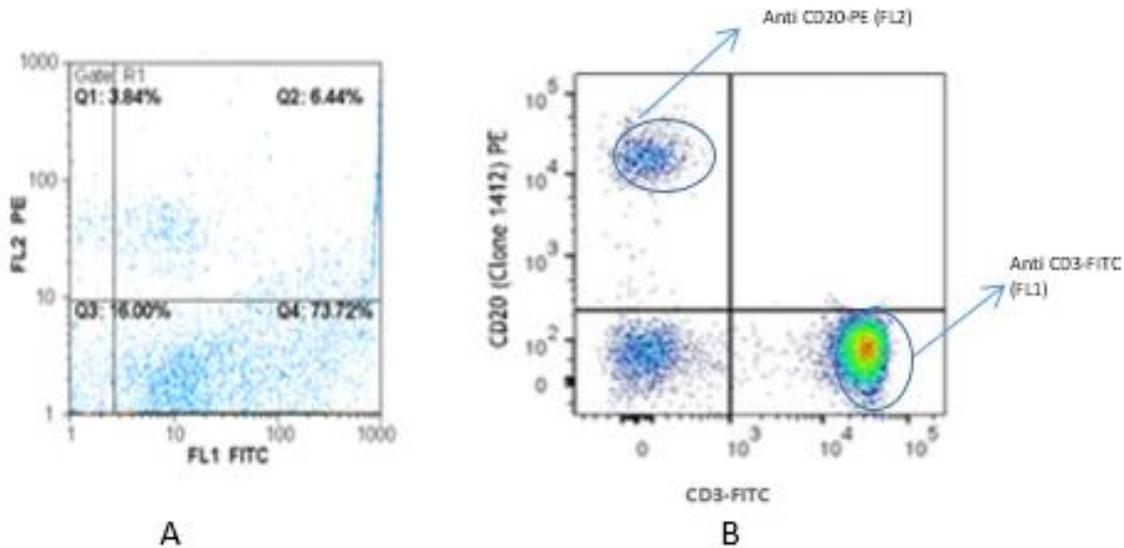


Figura 18. Representación gráfica del marcaje de reactivos para citometría antiCD20-PE/antiCD3-FITC de LABEX (A) y comercial de referencia (B). (<https://www.thermofisher.com/antibody/product/CD20-Antibody-clone-2H7-Monoclonal/12-0209-42>).

4.6. Valoración Económica de la obtención de los conjugados para citometría de flujo.

Se realizó una valoración económica en función del costo de producción de los reactivos dobles conjugado obtenido en LABEX; según lo calculado en las fichas de costo, mediante el uso del programa Microsoft Office Excel® 2020. Para realizar el análisis de costo se partió de determinar el costo en cada una de las etapas por las que pasa el producto: el cultivo celular, obtención del inóculo, purificación y conjugación de la IFA; así como, su llenado y etiquetado para su posterior comercialización.

Este análisis se realizó bajo la consideración de un volumen de producto de 453 mL como producción anual; teniendo en cuenta que a cada frasco se le añade un volumen de 1 mL, suficiente para 100 determinaciones, si se fija en el uso un volumen de 10 μ L del reactivo por determinación, como recoge su prospecto para su uso en citometría de flujo. Se determina que el reactivo antiCD4-PE es el que ofrece mayores gastos de producción; mientras que los otros reactivos antiCD3 y el antiCD45, ambos conjugados con FITC, tienen costos de producción muy similares y menores que el antiCD4-PE (**Anexo 26**). Teniendo en cuenta el producto de mayor costo, para resumir, se presenta el cálculo del costo total en la (**Tabla 10**).

Para el ejemplo en cuestión recogido en la **Tabla 10**, se observa que el Proceso de “Obtención del IFA” a partir de la inoculación en ratones Balb/c y extracción del anticuerpo generado presente en el Líquido Ascítico Murino, resulta en el mayor costo llegando a ser el 71 %; permitiendo dirigir la atención de cualquier mejora o cambio en el proceso que facilite reducir los costos que se incurren. Por su parte, son las Materias Primas la fuente principal de los costos (84,9 %), estando en correspondencia al comportamiento de los costos productivos en producciones biotecnológicas, ya que algunos de los insumos consumidos durante la elaboración del producto de interés, son importados o resultan de altos precios en el mercado nacional. Para el cálculo del costo en los reactivos dobles conjugados, se realizó primeramente la determinación del correspondiente a los conjugados simples (antiCD4-PE, antiCD45-FITC, antiCD3-FITC) como se ejemplifica con la tabla 10, que sirvió para luego obtener el costo del reactivo doble conjugado. Para ello, se realizó la suma de los costos de los reactivos simple que conforman el doble conjugado teniendo como base que constituyen variantes de mezclas y no “tándem”, antiCD4-PE (antiCD4-PE/antiCD45-FITC; antiCD4-PE/antiCD3-FITC). Se ejemplifica en la **Tabla 11** estos cálculos, con la primera variante, teniendo en cuenta las tareas comunes y las específicas para cada una de las producciones.

Tabla 10. Resumen del costo total de Producciones del antiCD4-PE.

Resumen de costo por Proceso (etapa) del antiCD4-PE.			
Etapas/Procesos	CUC	CUP	Total
Costo Total Cultivo Celular	216.88	260.31	477.19
Costo Total Obtención IFA LAM	53.04	2962.33	3015.37
Costo Total Purificación y Conjugación	209.11	308.95	518.06
Costo Total Llenado, etiquetado	176.91	57.67	234.57
Costo Total Producto	655.93	3589.26	4245.19
Costo Unitario (mL)	1.4480	7.9233	9.3713
Resumen de costo total por elemento de costo			
Elemento de Costo	CUC	CUP	Total
Materia Prima Directo Total	559.03	3044.41	3603.44
Mano de Obra directa Total	0.00	205.69	205.69
Costo Indirecto de Fabricación Total	96.90	339.16	436.06
Costo Total Producto	655.93	3589.26	4245.19
Costo Unitario (mL)	1.4480	7.9233	9.3713

Tabla 11. Resumen del costo total de Producciones del antiCD4-PE/ antiCD45-FITC.

Resumen de costo unitario total del reactivo doble conjugado (antiCD4-PE/antiCD45-FITC)			
Etapas/Procesos	CUC	CUP	Total
Costo Total Cultivo Celular	426.73	517.36	944.09
Costo Total Obtención IFA LAM	106.08	5924.65	6030.73
Costo Total Purificación	387.92	692.34	1130.80
Costo Total Producción terminada	360.43	115.41	475.83
Costo Total Producto	1281.16	7249.75	8581.45
Costo Unitario (mL)	2.83	16.00	18.94
Resumen de costo total por elemento			
Elemento de Costo	CUC	CUP	Total
Materia Prima Directa Total	1137.90	6160.06	7297.95
Mano de Obra directa Total	0.00	411.38	411.38
Costo Indirecto de Fabricación Total	193.80	678.32	872.12
Costo Total Producto	1331.70	7249.75	8581.45
Costo Unitario (mL)	2.9397	16.0039	18.9436

Del análisis se generaron las fichas de costo para los reactivos y se obtuvo un estimado de precio de cada reactivo doble conjugado, según metodología de precios por costo (**Anexo 27**). En este sentido se revisaron las fichas de costo actualizadas en aras de garantizar que el precio propuesto cubra los costos del proceso productivo y garantice un margen de utilidades conforme a lo dispuesto en la **Resolución 21 de 1999 del Ministerio de Finanzas y Precios** (MFP, 1999).

En la **Figura 19** se observa el costo unitario de la obtención del reactivo doble conjugado en las variantes del antiCD4-PE combinado con el antiCD45-FITC y con el antiCD3-FITC, respectivamente (**Anexo 28**); donde se puede observar que en ambos reactivos el costo aproximado es de **\$ 19 - 20 CUP**, no presentando diferencias significativas en su costo, lo que permite evaluar un Precio por familia de productos en base a los AcM conjugados y despreciando la afectación del costo por el fluoróforo conjugado.

El impacto que se produce en lograr esta sustitución de importación, reviste especial importancia y beneficio para el Sistema Nacional de Salud, haciendo notar que la obtención del producto *per se* reporta beneficios a nuestro país ya que no se dispone de un marcador doble conjugado, siendo la única vía de adquisición la compra del producto importado. A esto se le añade que en el mercado de estos productos se encuentran muy bien posicionadas con firmas norteamericanas, que reduce la accesibilidad de nuestro Sistema Nacional de Salud a un flujo regular de compra de los mismos, constituyendo un riesgo elevado.

Se revisaron los precios de cotización en el mercado internacional de un reactivo doble conjugado con características similares a los que se producen y comercializan por LABEX, escogiéndose la firma *Thermo Fisher*TM, pudiéndose constatar que el precio promedio para 100 determinaciones oscila alrededor de 380 *EUR* por frascos de 1 *mL* (<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/flow-cytometry-market-65374584.html>).

En la **Figura 20** se observa una comparación de precios, entre los reactivos dobles conjugados obtenidos en LABEX con los reactivos comercializados por la empresa *Thermo Fisher*TM, en mercados con monedas convertibles (se toma el euro como referencia); aun si se tiene en cuenta coeficientes altos para la propuesta de los precios de reactivos nacionales, promoviendo ganancias a la empresa.

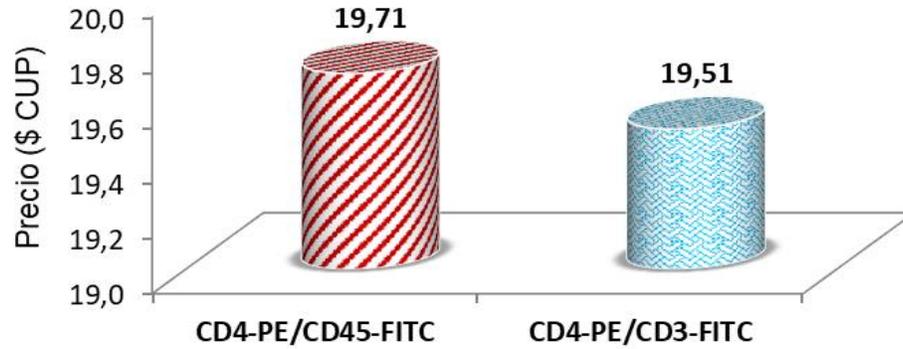


Figura 19. Precio de los reactivos dobles conjugados en variantes de antiCD4-PE propuestos en LABEX.

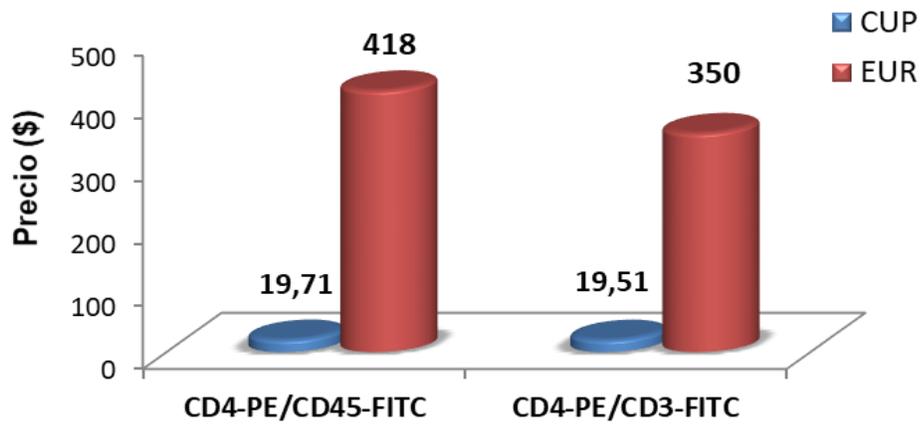


Figura 20. Comparación entre el precio unitario de los reactivos para doble marcaje por citometría producidos en LABEX (CUP) y los producidos por *Thermo Fisher*TM (EUR), con base a CD4-PE.

La obtención del reactivo en LABEX se logra obtener a bajo costo (**Figura 20**), demostrando con esto la posibilidad de sustituir las importaciones para nuestro país; redundando en mejoras de atenciones a grupos de pacientes vulnerables y contribuyendo a la soberanía en materia de servicios de salud.

Sus principales aplicaciones son para el conteo de poblaciones linfocitarias durante la evaluación de pacientes con leucemias, linfomas, inmunodeficiencias provocadas o hereditarias y otras enfermedades del Sistema Inmune; así como, en el monitoreo del sistema inmune de pacientes sometidos a cualquier tipo de inmunoterapia, ejemplo a pacientes oncológicos.

Se permite mediante correlación con los mercados proponer un precio para estos reactivos de citometría, para dobles marcajes de poblaciones linfocitarias, que oscila entre \$ 300 - \$ 350 CUP en mercado nacional; permitiendo márgenes de recuperación y ganancias mínimas, en caso de unificación monetaria en el país, que permita recuperación de los costos y a su vez, mantener la competitividad en el mercado.

En comunicación personal con la Jefa del Programa Nacional de Pacientes con VIH- SIDA, Dra. Martha Lantero, se conoció que en cierre estadístico del 2018 en Cuba se contabilizaban 26 952 pacientes infectados con el virus VIH (<https://salud.msp.gob.cu/cuba-muestra-positivos-resultados-en-la-prevencion-y-control-del-vih-sida/>).

Estimando el crecimiento de estos para el 2020, un aproximado de 27 000 personas infectadas, la cantidad de reactivo necesarios para cubrir esa demanda, conociendo que por regulaciones de salud a los pacientes de VIH se le debe realizar la prueba como mínimo dos veces al año, resultan en la necesidad de 54 000 dosis para diagnóstico para suplir la demanda anual del MINSAP si se sustituyen los reactivos importados de la OPS (<https://www.efe.com/efe/america/sociedad/mas-de-25-400-personas-viven-con-vih-en-cuba-2-200-nuevos-casos-2018/20000013-3962171>).

Se realizó el análisis para evaluar el ahorro que se incurre con la sustitución de importaciones, para la demanda calculada, usando el reactivo doble conjugado elaborado en LABEX. Para suplir como mínimo las necesidades de seguimiento, para evaluar calidad de vida de los pacientes bajo este esquema de monitoreo en el país, se han de producir **540 frascos**, lo que costaría al MINSAP \$ **162 000 CUP**, asumiendo que cada frasco cuesta \$ **300 CUP** (precio máximo a comercializar en mercado nacional). Por otro lado, producir los 540 frascos bajo esquema productivo diseñado y teniendo en cuenta como costo unitario \$ 19.71

CUP, sería un gasto de \$ **10 643.40 CUP** a la empresa; dando sustanciosas ganancias, por comercialización de estos productos biotecnológicos.

Realizado el análisis del ahorro para el país en función de la sustitución de importaciones, para poder atender a los 27 000 pacientes que se presumen, se necesitan importar por tanto 540 frascos de reactivo doble conjugado. Si cada frasco cuesta aproximadamente en el mercado internacional de acceso, **350 EUR**, se necesitarían \$ **189 000 USD** (bajo tasa 1 *EUR*~1*USD*) a los que se le debe sumar los costos de transportación, asumiendo un 7 % por concepto de importación de mercancía; importar cada frasco del reactivo costaría al país \$**202,230.00 USD**. Entonces, en condiciones actuales de cotización a mercado interno, el país se ahorraría \$40,230 *MLC* si el reactivo se lo proporciona LABEX, con la consiguiente disponibilidad para ofrecer coberturas en todo el año.

En la **Figura 21** se representa la diferencia entre precios que existe para un reactivo doble conjugado comercializado por LABEX con respecto a un reactivo que se necesite importar, haciéndose evidente la diferencia de precio y a su vez, el impacto por la sustitución de importaciones con la obtención y posterior comercialización de un reactivo doble conjugado para el país.

Resulta atractivo tanto para la Empresa, como para el SNSP de nuestro país la producción-comercialización de reactivos dobles conjugados para ser usados en el monitoreo de poblaciones leucocitarias de pacientes con VIH-SIDA, por una empresa nacional como propone LABEX-CIM.

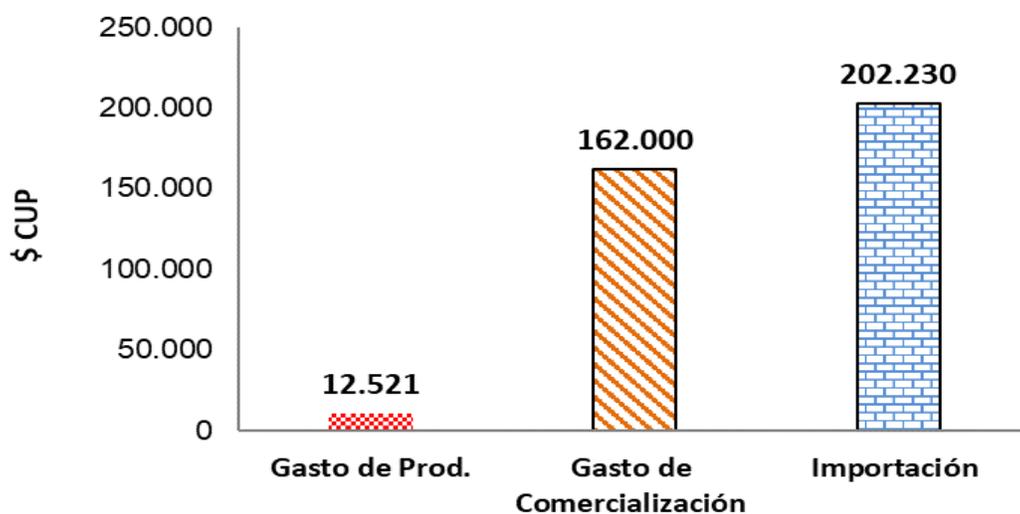
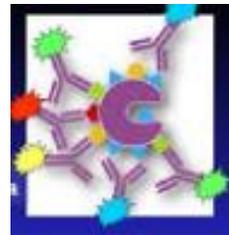


Figura 21. Comparación entre precios de un reactivo doble conjugado producido por LABEX e importado.



Conclusiones

V. Conclusiones

- Para la obtención del producto *ior*® antiCD se identificaron 8 peligros potenciales y 24 puntos críticos en todo el proceso productivo, como resultado de la aplicación del método HACCP, concentrándose estos fundamentalmente en el proceso de “Procesamiento de IFA”. La prevención de riesgo del SGC LABEX se enriquece con la nueva propuesta de 4 controles de proceso, 1 control de calidad para la liberación y 2 registros.
- En el análisis específico de los 19 riesgos identificados para el cumplimiento de los requisitos de calidad del producto, a 11 se les dio seguimiento por control interno y a los 8 restantes, por aseguramiento de la calidad; descargándose estos riesgos en el plan de prevención de la entidad, con los planes de medidas asociados. Del plan de medidas fueron cumplidas más del 70 %, en el 2019, demostrando eficiencia en la gestión para las mejoras de calidad del producto de interés.
- En la obtención de los simples conjugados se establece como requisito para la concentración del AcM antiCD mayor de 5 mg/mL, para los conjugados con FITC y de 10 mg/mL, para los conjugados con PE, asegurando un marcaje específico en todas las variantes de reactivos. Por su parte, para los anticuerpos conjugados con FITC se propone una relación de concentración Ac/fluorocromo $\leq 11\text{mg/mL}$ y para los conjugados con PE se establece una relación igual a 0.3.
- Se demostró que la actividad biológica del conjugado simple antiCD4 no presenta diferencias en base al Fluorocromo utilizado (FITC, PE); cumpliendo en ambos casos con el rango de reconocimiento de 30-50 %, establecido como requisito de calidad.
- En las propuestas de reactivos dobles conjugados antiCD45-FITC/antiCD4-PE, las diluciones realizadas para el antiCD4-PE, influyen de manera significativa en el comportamiento del reactivo, recomendándose trabajar con la dilución 1/10; sin embargo, el antiCD45-FITC permite mayores diluciones con reconocimientos en rangos de 90-100 % como requisito de calidad.
- De la comparación entre los reactivos del LABEX y *PARTEC*® se observó que el reactivo antiCD4-PE es el de mayor variabilidad ($CV > 15\%$), requiriendo mejoras en su diseño y mayor cuidado en el ajuste de la plantilla por parte del analista.

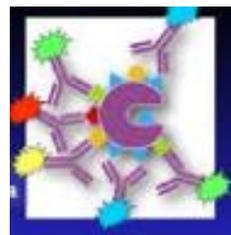
- Del análisis de las combinaciones realizadas con marcadores de linfocitos de distintos linajes, antiCD4-PE/antiCD3-FITC y antiCD20-PE/antiCD3-FITC, en ambos se cumple con el porcentaje de reconocimiento de 63-76 % para el anti CD3-FITC con un promedio de 73.04 % y para el antiCD20-PE, se cumple igualmente el requisito de calidad (3-25 %), con un promedio de 6.35%. Esto permite la propuesta de dobles conjugados para estas dianas moleculares.
- El costo para producir un reactivo doble conjugado en LABEX es de aproximadamente \$20/mL; por lo que cubrir la demanda calculada requiere un gasto de \$10 643.40 CUP para la empresa. Importar cada frasco del reactivo le costaría al país \$ 202 230.00 USD, que si el reactivo lo proporciona LABEX al MINSAP le ahorraría \$ 40.230 MLC/año.



Recomendaciones

VI. Recomendaciones

1. Procesar con inmediatez la conjugación del AcM con el fluorocromo ficoeritrina, reduciendo las pérdidas por inestabilidad de la ficocianobilina o la necesidad de estabilizar con sales.
2. Se debe establecer la relación de la concentración del conjugado con PE una vez obtenida suficientes datos para lograr un intervalo de confianza de 90 %.
3. Ajustar la plantilla para mejorar la separación del marcaje de las poblaciones linfocitarias y la calidad del diagnóstico en el Citómetro de Flujo PARTEC para todo el sistema de salud.
4. Se debe trabajar en las soluciones de lisado hasta obtener un método de – lisado no lavado-, o mejor aún –no lisis no lavado-, para de esta forma reducir la manipulación del técnico en la muestra y con ello aumentar los rendimientos del reactivo.
5. Se debe incluir en los dobles conjugados otros fluoróforos sustituyendo al FITC para reducir las interferencias a las lecturas con PE y, por tanto, la necesidad de compensación o los subóptimos para los reactivos antiCD4-PE.



Bibliografía

VII. Bibliografía.

Abbas A. K., Lichtman AH., Pober JS. **2010**. Inmunología Celular y Molecular. Tercera Edición. McGraw-Hill-Interamericana, USA.

Abbas A. K., Lichtman A. H. **2004**. Basic Immunology. Functions and Disorders of the Immune System. s.l.: Elsevier Inc.

Acuña A., Amat-Guerri U., Morcillo F., Liras M., Rodríguez B. **2009**. Structure and Formation of the Fluorescent Compound of Lignum nephriticum. Organic Letters, 11 (14): 3020–3023.

Androulla M., Lefkothea P. **2018**. CAR T- Cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. Current Pharmaceutical Biotechnology, 19 (1): 5-18.

Arango M.C., Villegas C., Soto P., Torres G., Morejón A., Faxas M.E. **2020**. Caracterización de los inmunofenotipos linfocitarios de sangre periférica en pacientes con cáncer. Rev. Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia, vol. 36 (2): 15-23.

Barry S. M., Anossy G. **2004**. Optimal Gating Strategies for Determining Bronchoalveolar Lavage CD4/CD8 Lymphocyte Ratios by Flow Cytometry. J Immunol Methods, 285:15-23.

Barcarizo J. **2012**. Cambios conformacionales de la β -Ficoeritrina de *Porphyridium Cruentum* en función del pH. Tesis de Maestría, Universidad de Hamburgo, Alemania.

Bermejo R., Acién–Fernández FG, Molina E. **2002**. Recovery of pure β -phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. J Biotechnol.; 93:73–85.

Bermejo R, Talavera EM, Álvarez-Pez JM. **2003**. Chromatographic purification and characterization of β -phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. Semipreparative HPLC separation and characterization of its subunits. J. Chromatogr. No. 917: 135–145.

Biosud S. A. **2015**. Registro de Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Expediente N0 1-47-3110-557/15-6. Buenos Aires, Diciembre.

Burtis C. A, Ashwood E. R., Burns D. E., Sawyer B. G., **2008**. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, Saunders (Elsevier) 6^o ed., ISBN 978-0-7216-3865-2.

Carballo G. O.; Ingenito B. F; Ginaca A. A.; Carabajal. P; Costa A. M.; Balbarys J. **2012**. Primer Consenso Argentino para la Estandarización de la Determinación de Anticuerpos Anti-Nucleares por Inmunofluorescencia Indirecta. vol.46 no.1.

Carey J., McCoy J., Keren D. **2007**. Flow Cytometry in Clinical Diagnosis, Vol. 4, ASCP Press, ISBN 0-89189-548-5.

CECMED, **2004**. Buenas Prácticas de fabricación para diagnosticadores. Regulación 20-2004. La Habana, Cuba.

CECMED, **2005**. Buenas Prácticas para operaciones con diagnosticadores. Regulación 42-2005. La Habana, Cuba.

CECMED, **2008**. Clasificación de los diagnosticadores por categorías de Riesgos. Regulación No. 50-2008. La Habana, Cuba.

CECMED **2017**. *Buenas Prácticas de Fabricación para Diagnosticadores*. Resolución No. 57 -2017. La Habana, Cuba.

CECMED, **2020**. Licencia Sanitarias de Fabricación de Diagnosticadores (001-10-1D/2018).

Dai S. M., Matsuno H., Nakamura H., Nishioka K., Yudoh K., **2004**. Interleukin-18 Enhances Monocyte Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-1Beta Production Induced by Direct Contact with T Lymphocytes: Implications in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*, vol. 50:432-443.

Directriz ICH-Q9, **2008**. Guía de Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano y Veterinario, Anexo 20: Gestión de riesgos para la calidad. 2008. <http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index>.

Directriz ICH-Q9. **2016**. Grupo de Trabajo de Expertos. Gestión de Riesgos de Calidad. Conferencia Internacional sobre armonización de normas técnicas para el riesgo de farmacéuticos para uso humano, Octubre: 1-15.

Domínguez E., **2011**. Desarrollo de una técnica de citometría de flujo multiparamétrica que permite detectar Enfermedades mínimas residuales por debajo de los límites establecidos. Tesis Doctoral. Pamplona.

Fernández G., Gutiérrez E., García M. **2017**. Obtención de α -Ficoeritrina y su uso en la conjugación de anticuerpos murinos. *Rev. Cubana de Química*, vol. 29 (2) mayo-agosto, 212-228.

Fernández J. **2007**. Obtención de β -ficoeritrina a partir del *Porphyridium cruentum* y su uso en el inmunodiagnóstico. Tesis de Maestría. Santiago de Cuba.

Figuerola A., **2016**. Escuaramidias como agentes de “Quenching” de fluorescencia. Tesis de Licenciatura, Universidad de Islas Baleares, España.

Flores. J. **2016**. Nuevas estrategias metodológicas y de análisis de datos de citometría de flujo aplicada al diagnóstico y clasificación de las hemopatías malignas. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca, España.

Fuentes D., González R.R., Arroyo R. **2001**. Influencia de la edad y el sexo de ratones balb/c sobre la producción de líquido ascítico rico en anticuerpos monoclonales 2001. Rev. Salud Anim. Vol. 23, No. 1: 62-64.

Fryland M. **2004**. The PARTEC® Cyflow counter for CD4+T- Cell counting produces high quality results and is robust when evaluated under routine field conditions in Malawi, Scientific Oral Presentation AIDS conference in Bangkok July.

García M. A., **2011**. Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. Neurología; 26(5): 301-6. (file:///F:/Tesis%20REV/Nueva%20carpeta/120423.pdf.) Consulta 08/09/20

Glazer N. A., **1993**. Phycobiliproteins-a family of valuable, widely used fluorophores. Journal of Applied Phycology; (6): 105-106

Golim M. A.; Deffune E.; Rossi-Ferreira R.; Oliveira A. P. E.; Padovan C. R.; Machado P. E. A. **2007**. Conjugação e validação de controle isotópico IgG1-FITC para uso em citometria de fluxo. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., 29 (4):361-368. Consultar en: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000400008>.

Gutiérrez N, Pastrana E, Ramírez E. **2010**. Desarrollo de un instrumento para evaluar prerrequisitos en el sistema HACCP. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 8 (1): 106 - 119.

Robinson P., Darzynkiewicz Z., Dean P., Dressler L., Tanke H., Wheeless L. **2006**. Handbook of Flow Cytometry Methods.

Roederer M. **2012**. Cytometry: today's technology and tomorrow's horizons. Methods.

Kim, S. J., Park Y., Hong H. J., **2005**. Antibody Engineering for the Development of Therapeutic Antibodies. Mol. Cells 20 (1):17-29.

Kokuima E., Breff M., Villegas C., Mora I., **2019**. Normal values of T, B and NK lymphocyte subpopulations in peripheral blood of healthy Cuban adults. MEDICC Review, vol. 21 (2) april-july, pp. 17-21.

Koller K. P., **1975**. Wehrmeyer, W.: B-phycoerythrin from *Rhodella violacea*. Characterization of two isoproteins. Arch. Microbiol. 104, 255–261.

Kumagai I., Tsumoto K., **2001**, Antigen-Antibody Binding, Encyclopedia of life sciences, Macmillan Publishers Ltd.

Little M, Kipriyanov SM, Le Gall F, Moldenhauer G., **2000**. Of mice and men: hybridoma and recombinant antibodies. Immunol Today. Aug; 21(8):364-70. Review. PMID: 10916138; UI: 20377416.

Mao S. Y., Mullins J.M., **2010**. Conjugation of Fluorochromes to antibodies: In Methods in molecular biology, vol 588, p: 43-48.

Matsui M, Araya SI, Wang HY, Matsushima K, Saida T. **2004**. Immunomonitoring Measures in Relapsing-remitting Multiple Sclerosis. J Neuroimmunol; 148: 192-199.

Melchers F. **2005**. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. Nat Rev Immunol. 5: 578-84.

Michael T, John M, Parker J. Brock. **2008**. Biología de los microorganismos. 10 ed. Editorial Pearson Educación.

Ministerio de Finanzas y Precios, **1999**. Resolución No. 21 Metodología General de Formación de Precios y Tarifas. La Habana: MFP.

Moreno J. M., **2012** Gestión del análisis de peligros y puntos críticos de control. Tecnum, vol. 16, núm. 33, julio-septiembre, pp. 189-202 Universidad Distrital Francisco José de Caldas Bogotá, Colombia.

Noda AL, Vidal LA, Pérez J. Cañete R. **2013**. Interpretación clínica del conteo de linfocitos T CD4 positivos en la infección por VIH. Rev. Cubana de medicina, 52 (2): 118-127.

ISO 9000:2015. Norma Internacional que define fundamentos para los sistemas de gestión de la calidad.

OMS-Organización Mundial de la Salud. **2003**. Aplicación de la metodología de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) para productos farmacéuticos, WHO Technical Report Series No 908, anexo 7, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 2003. Consultar en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/food-safety-hacpp-cha-analisis-peligros-puntos-criticos-control.pdf>

Ortiz R, Cortés L, González C, Cortés E, Betancourt M. **1999**. Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de jóvenes mexicanos sanos: estudio por medio de citometría de flujo. Bioquímica; 24 (1):18-22.

Pérez C. PhD. **2009**. Conferencia de Introducción al Inmunodiagnóstico. Universidad de los Andes, Facultad de Farmacia.

Peng, X., Chen, H., Draney, D.R., Volcheck, W.M., A **2009**. Non-fluorescent, Broad Range Quencher Dye for FRET Assays, *Analytical Biochemistry*, Vol. 388).

Pérez C., Santiago W., Rodríguez J.C. **2018**. Fundamentos de la Citometría de flujo: Su aplicación diagnóstica en la investigación biomédica y clínica. *Rev Médica de la Universidad Veracruzana*, vol. 18 (2): 41-52

Qian Yu; Wei C.; Eun-Hyung L., Campbell F., Halliley J., Lee J., Jamie A.; Cai, Jennifer; Kong, Y. Megan, **2010**. Elucidation of seventeen human peripheral blood B-cell subsets and quantification of the tetanus response using a density-based method for the automated identification of cell populations in multidimensional flow cytometry data». *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*78B.

Rabell. G. **2014**. Obtención del anti-CD45 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína. Tesis de Maestría. Cuba.

LABEX, **2019**.Informe de análisis de datos de Proceso O5. Propuesta de mejoras. SGC, Revisión por la Dirección.

Roitt, I.M., Delves, P.J., **2003**. Inmunología, fundamentos, Editorial Medica Panamericana, Argentina,

Rojas, W. Inmunología. **1995**. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. Capítulo 14. pg. 197-200.

Saleem M., Kamal M. **2008**. Monoclonal antibodies in clinical diagnosis: A brief review application". *African Journal of Biotechnology*, 7(8): 923-925.

Sarmiento. M Cavero, Nayeli Belem Gabiño López. **2012**. Entendiendo el inmunofenotipo de las neoplasias de células B maduras. *Rev. Invest Med Sur Mex*, octubre-diciembre; 19 (4): 212-221.

Sandle, T. **2003**. El uso de una evaluación del riesgo en la industria farmacéutica - la aplicación de FMEA a una esterilidad pruebas aislador: un estudio de caso', *European Journal of Parenteral y Pharmaceutical Sciences*.

SIGMA. FD. **2005** Catálogo: Products for Life Science Research. FITC conjugation of Antibodies by Aaron Cantor Washington.Ed., 2004-2005:1239-1242.

SIGMA. Monoclonal Anti-CD4-PE, clone Q4120 produced in mouse, purified immunoglobulin. Catalog Number P7562.

Skoog D. A., Holler F., Crouch S. R., **2006**. Principles of Instrumental Analysis.

Soria. N. **2010**. Obtención y evaluación del líquido ascítico murino hemoclasificador anti-B en las líneas de ratones Ofbalb (F1) y Balb/c. Tesis de Maestría. Habana.

Sperber WH. **2013.** Expanding the use of HACCP beyond its traditional application areas. En: Sofos J. [Ed.]. *Advances in Microbial Food Safety*. Oxford: Woodhead Publishing. (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; 259). pp. 417 – 432.

Stelter-Stevenson M. **2001.** Flow Cytometry analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders. *Semin. Hematol.*, Apr, 38 (2).

Toledano. M. **2005.** Conjugación de marcadores linfocitarios monoclonales para citometría de flujo. Tesis de Maestría. Cuba.

Van Agthoven A., Daziano J.P., Maples J. A., **2010.** Method of lysis of Erythrocytes. United States. Pat 7678583B2.

Vásquez A. **2009.** Estandarización De Un Protocolo De Citometría De Flujo Para Determinar Simultáneamente Los Recuentos Absolutos De Lcd4+ Lcd8+, Lt Reguladores, Lb Y Células Nk En Sangre Periférica Con El Fin De Evaluar Los Recuentos En Pacientes Con Síndrome De Down. Trabajo de Grado. Univ. Central de Bogotá, Colombia.

Villegas C., Torres G., Morejón A., Arango M.C. **2019.** Diseño de un panel de citometría de flujo para muestras de sangre ascitis y tejido ovárico. *Rev. Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, vol. 35 (4).

Wallace C. A. **2014.** HACCP-based food safety management systems: great in theory but can we really make them work in practice. *Perspectives in Public Health*; London Vol. 134, 4, Jul: 188-90.

Washington S. M. **2005.** A Guide to fluorescent probes and Labeling Technologies, 10 Ed. Press: 100-275.

WHO. **2003.** Application of Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) methodology to pharmaceuticals, Technical Report Series No 908, Annex 7.

Whyte, W., Eaton, T. **2004.** Modelos contaminación microbiológica para su uso en la evaluación de riesgos durante la producción farmacéutica', *European Journal of Parenteral y Pharmaceutical Sciences*, Vol. 9, Nº 1.

Winter G, Milstein C. **1991.** Man-made antibodies. *Nature*, 388: 58-62.

Sitios Web Consultados:

http://cimsp/labex/DOCUMENTOS_LABEX/Forms/AllItems.aspx. Consultada: febrero 2019.

<http://quays.com.sld.cu>. Consultada febrero 2019.

<https://www.labclinics.com>. Consultado: 21 de mayo del 2019.

<http://www.molbiol.ox.ac.uk/www/pathology/tig/fitc.html>. Quick and simple method for conjugating mAbs. Consultado: 15 de octubre de 2019.

<http://chemocare.com/es/chemotherapy/what-is-chemotherapy/el-sistema-inmunitario>. Consultada: 30 de junio 2020.

<https://www.thermofisher.com/antibody/product/CD20-Antibody-clone-2H7-Monoclonal/12-0209-42>. Consultada: 30 de junio 2020

<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/flow-cytometry-market-65374584.html>. Consultada 20 de junio 2020.

<https://www.labclinics.com/diez-trucos-para-configurar-un-panel-de-citometria-de-flujo/>. Consultada 2 de junio de 2020

<https://www.thermofisher.com/antibody/product/CD20-Antibody-clone-2H7-Monoclonal/12-0209-42>). Consultada 30 de junio 2020.

<https://www.sysmex.es/nuestros-productos/product-singleview/cyflow-space-2976.html>). Consultada 20 de junio 2020.

<http://www.biosystems.com.ar/es/marca/15/bd-biosciences>. Consultada 20 de junio 2020.

<https://www.beckman.es/flow-cytometry/instruments/navios-ex>. Consultada 20 de junio 2020.

<https://es.slideshare.net>. Consultada junio 2020

https://es.wikipedia.org/wiki/Isotiocianato_de_fluoresceína. Consultada en junio 2020

<https://es.wikipedia.org/wiki/Ficoeritrina>. Consultada en junio 2020

<https://www.iso.org>. Consultada 20 de julio 2020.

<http://medlineplus.gov/spanish/medlineplus>. Consultado: 2 agosto 2020.

<https://salud.msp.gob.cu/cuba-muestra-positivos-resultados-en-la-prevencion-y-control-del-vih-sida/>. Consultada octubre 2020.

<https://www.efe.com/efe/america/sociedad/mas-de-25-400-personas-viven-con-vih-en-cuba-2-200-nuevos-casos-2018/20000013-3962171>.

Consultada octubre 2020.

<https://docplayer.es/4656907-Citometria-de-flujo-multiples-caracteristicas-fisicas-de-cada-sola-celula-en-forma-simultanea.html>. Consultada octubre 2020.

http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Hidatidosis/50-Roquel-Liliana.pdf. Consultada octubre 2020.

<https://www.bing.com>. Consultada en octubre 2020

<https://docplayer.es/3360512-Tecnicas-de-biologia-celular-y-molecular-utilizadas-en-investigacion-cientifica-basica-y-aplicada-citometria-de-flujo.html>. Consultada en octubre 2020

<https://www.labclinics.com/diez-trucos-para-configurar-un-panel-de-citometria-de-flujo/>. Consultada en octubre 2020.

Documentación de LABEX empleadas:

Procedimientos Normalizado de Operación (PNO):

A5 PNO.030 Inmunofluorescencia por Citometría de Flujo. Edición 1.

O1 PNO.002 Descongelación de células. Edición 4.

O1 PNO.003 Expansiones en cultivos celulares. Edición 3.

O5.PNO.07 Conjugación de Anticuerpos con isotiosianato de fluoresceína (FITC). Edición 10.

O5.PNO.11 Purificación de anticuerpos monoclonales. Edición 7.

O5 PNO.014 Conjugación de Anticuerpos con Ficobiliproteínas. Edición 3.

O5.PNO.17 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE). Edición 1.

Especificaciones (ESP).

ESP- 5015 Anti-CD3 purificado a partir de Líquido Ascítico Murino. Edición 8.

ESP- 5016 Anti-CD4 purificado a partir de Líquido Ascítico. Edición 8.

ESP- 5027 Anti-CD3 conjugado con FITC. Edición 4.

ESP- 5036 Anti-CD 45 purificado a partir de Líquido Ascítico. Edición 6.

ESP- 5049 Anti-CD45 conjugado con FITC. Edición 2.

ESP- 5073 Anti-CD4 conjugado con PE. Edición 1.

Número de Partes.

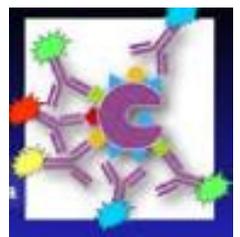
8014 ior® anti-CD3 humano-FITC.

8026 ior® anti-CD45 humano – FITC.

8030 ior® Anti-CD4 humano- PE.

Plan de diseño y Desarrollo.

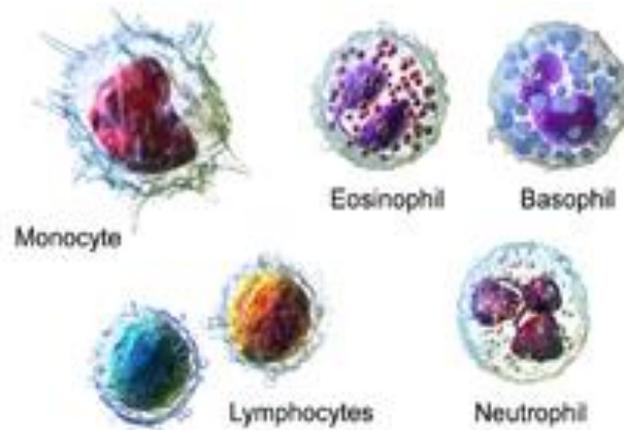
PPD.001 Anticuerpos Conjugados con Fluorocromos. Edición 01.



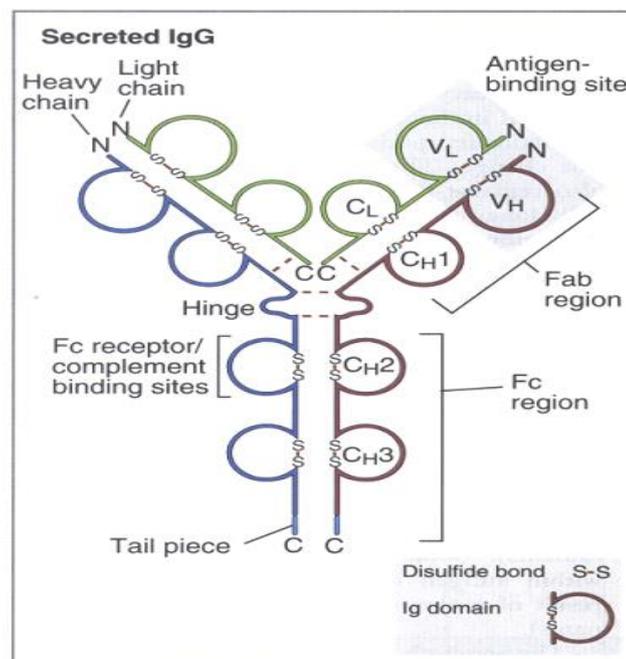
Anexos

VIII. Anexos

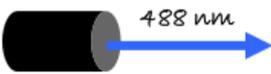
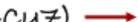
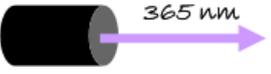
Anexo 1. Tipos de glóbulos blancos. Tomado de <http://salud.kioskea.net/faq/1629-globulos-blancos-polinucleares-y-linfocitos#tipos-de-globulos-blancos>.



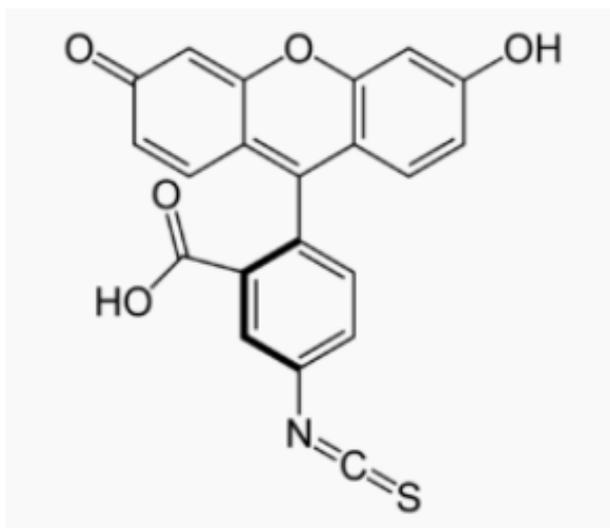
Anexo 2. Diagrama esquemático de la estructura del anticuerpo (IgG secretada). Tomada de Abbas y Lichtman, 2004. Disponible en: <https://www.google.com.cu>.



Anexo 3. Ejemplos de longitudes de ondas de excitación y emisión de los Fluorocromos más usados. Tomado de: <https://docplayer.es/4656907-Citometria-de-flujo-multiples-caracteristicas-fisicas-de-cada-sola-celula-en-forma-simultanea.html>.

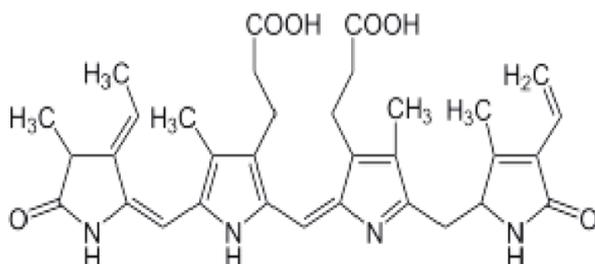
EXITACIÓN		EMISIÓN
	Fluoresceína (FITC) Ficoeritrina (PE) Ficoeritrina-Cianina5 (PECy5) Peridín-clorofil·la (PerCP)	 519 nm  578 nm  670 nm  675 nm
	Aloficocianina (APC) Aloficocianina H7 (APC-H7) Aloficocianina-Cianina7 (APC-Cy7)	 660 nm  785 nm  767 nm
	Alexa405 Alexa430 Pacific Blue	 421 nm  540 nm  455 nm
	Hoechst33342 DAPI Indo1	 460 nm  461 nm  401 nm

Anexo 4. Estructura Química del Isotiocianato de Fluoresceína (FITC). Tomado de https://es.wikipedia.org/wiki/Isotiocianato_de_fluoresceína.



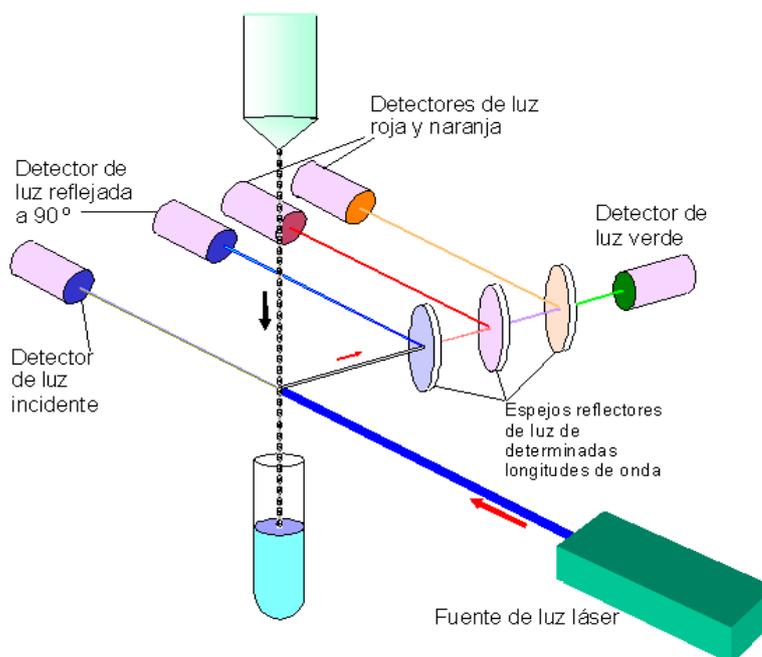
Características: Isotiocianato de fluoresceína es la molécula de fluoresceína original funcionalizada con un isotiocianato de grupo reactivo ($-N = C = S$), en sustitución de un hidrógeno en el átomo de anillo de la parte inferior de la estructura. Este derivado es reactivo frente a nucleófilos, incluyendo grupos amina y sulfhidrilo de proteínas. Las moléculas orgánicas pequeñas como FITC forman una unión covalente con grupos amino libres en anticuerpos. Hay varios de este tipo, como isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, rodamina, rojo texas, cianinas. El más utilizado para marcar proteínas es isotiocianato de fluoresceína, el grupo isotiocianato reacciona con los grupos amino de los residuos de lisina.

Anexo 5. Estructura Química de la Ficoeritrina (PE). Tomado de <https://es.wikipedia.org/wiki/Ficoeritrina>.



La **ficoeritrina** es un **pigmento ficobilínico** de color rojo que funciona como sustancia que absorbe la luz. Es un pigmento accesorio que actúa en conjunción con la **clorofila**. Se encuentra presente en las **algas rojas** y en las **criptofitas**. Como todas las **ficobiliproteínas**, se compone de una parte de proteína que actúa como **unión covalente** de los **cromóforos** llamados **ficobilinas**. En la familia de la **ficoeritrina**, los ficobilinas más conocidas son la ficoeritrobilina, que es el típico cromóforo aceptor de ficoeritrina, y a veces la ficourobilina. Las ficoeritrinas se componen de monómeros **globulinas**, α y β , generalmente organizados en un trímero $(\alpha\beta)_3$ o hexámero $(\alpha\beta)_6$ en forma de disco. Estos complejos contienen típicamente también un tercer tipo de subunidad, la cadena γ .

Anexo 6. Fundamentos para el funcionamiento del Citómetro de Flujo. Tomado de <https://www.bing.com>.



Anexo 7. Estimación de la probabilidad y consecuencias de cada riesgo. Tomado de: Risk Management in Pharmaceutical Microbiology.com.

Probabilidad	Valoración
El daño aparece siempre o casi siempre.	Alta
El daño se producirá en algunas ocasiones.	Media
Existen pocas posibilidades de que el daño se produzca	Baja

Consecuencia		
Descripción de los posibles daños	Gravedad de las lesiones	Valoración
El daño aparece siempre o casi siempre.	Lesiones previsiblemente sin baja o con baja inferior a 10 días naturales.	Ligeramente dañino
El daño se producirá en algunas ocasiones.	Lesiones con baja prevista en un intervalo superior a 10 días.	Dañino
Existen pocas posibilidades de que el daño se produzca.	Lesiones muy graves ocurridas a varias o a muchas personas y lesiones mortales.	Extremadamente dañino

Anexo 8. Valoración del Riesgo. Tomado de: Risk Management in Pharmaceutical Microbiology.com

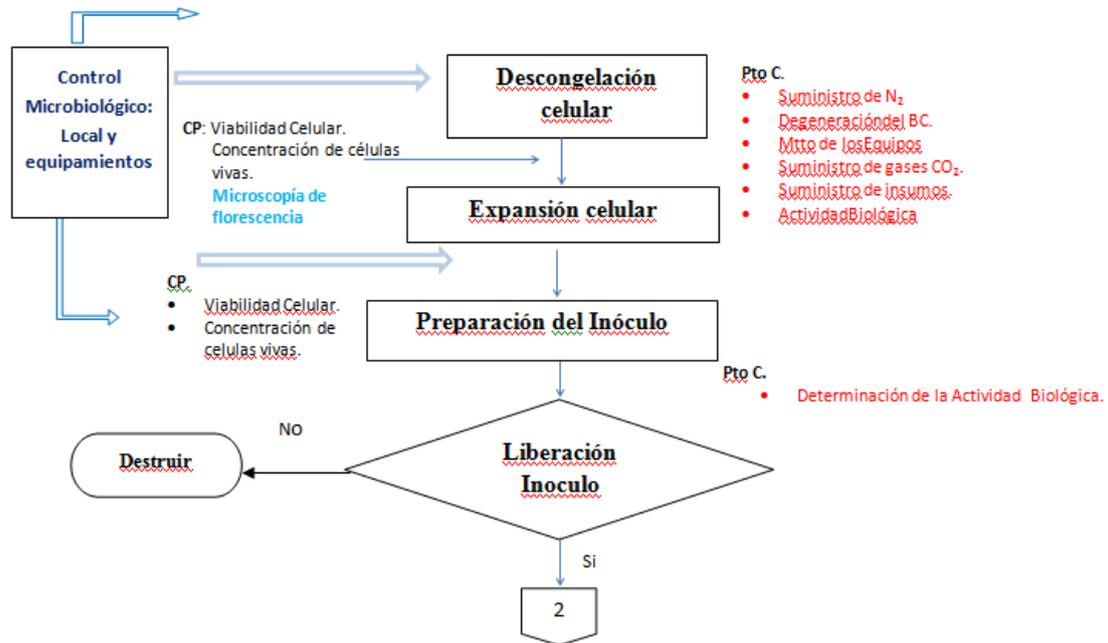
		CONSECUENCIA		
		Ligeramente dañino	Dañino	Extremadamente dañino
PROBABILIDAD	Baja	Riesgo trivial (T)	Riesgo tolerable (To)	Riesgo moderado (M)
	Media	Riesgo tolerable (To)	Riesgo moderado (M)	Riesgo importante (I)
	Alta	Riesgo moderado (M)	Riesgo importante (I)	Riesgo intolerable (IN)

Anexo 9. Medidas Correctivas y Preventivas. Tomado de: Risk Management in Pharmaceutical Microbiology.com.

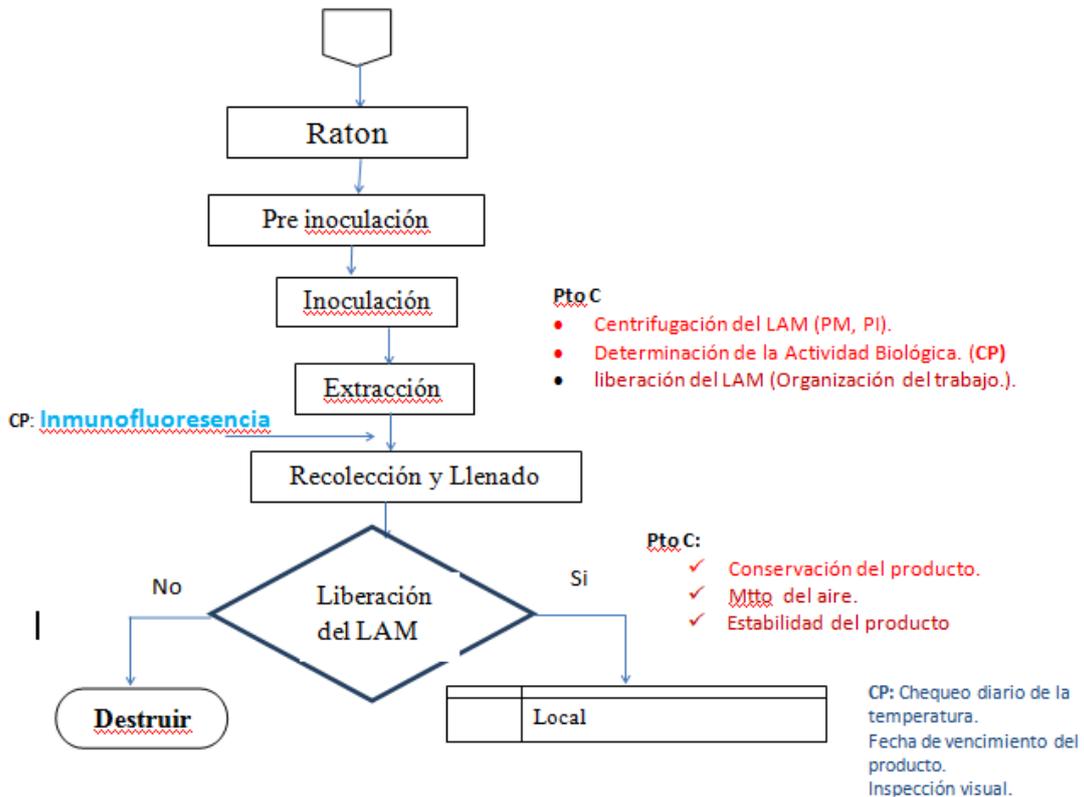
Riesgo	Acción y temporización
Trivial (T)	No se requiere una acción específica.
Tolerable (TO)	No se necesita mejorar la acción preventiva. Sin embargo, se deben considerar soluciones más rentables o mejoras que no supongan una carga económica importante. Se requieren comprobaciones periódicas para asegurar que se mantiene la eficacia de las medidas de control.
Moderado (M)	Se deben hacer esfuerzos para reducir el riesgo, determinando las inversiones precisas. Las medidas para reducir el riesgo deben implantarse en un período determinado. Cuando el riesgo moderado está asociado con consecuencias extremadamente dañinas, se precisará una acción posterior para establecer, con más precisión, la probabilidad de daño como base para determinar la necesidad de mejora de las medidas de control.
Importante (I)	No debe comenzarse el trabajo hasta que se haya reducido el riesgo. Puede que se precisen recursos considerables para controlar el riesgo. Cuando el riesgo corresponda a un trabajo que se está realizando, debe remediarse el problema en un tiempo inferior al de los riesgos moderados.
Intolerable (IN)	El trabajo no debe comenzar ni continuar hasta que se reduzca el riesgo. Si no es posible reducir el riesgo, incluso con recursos ilimitados, debe prohibirse el trabajo.

Anexo 10. Diagramas de flujos de las etapas de producto Marcadores Leucocitarios.

Etapa 1. Obtención de Inoculo y Fermentaciones.

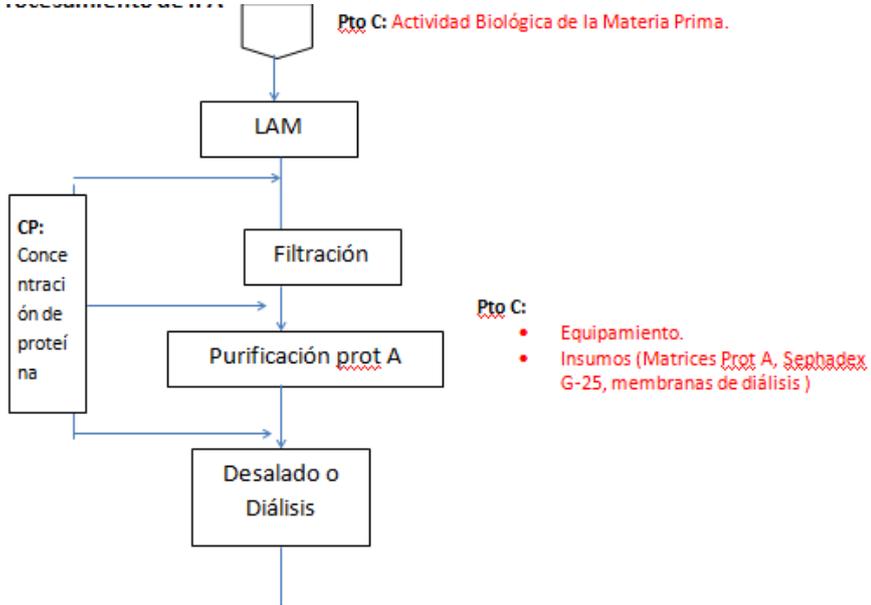


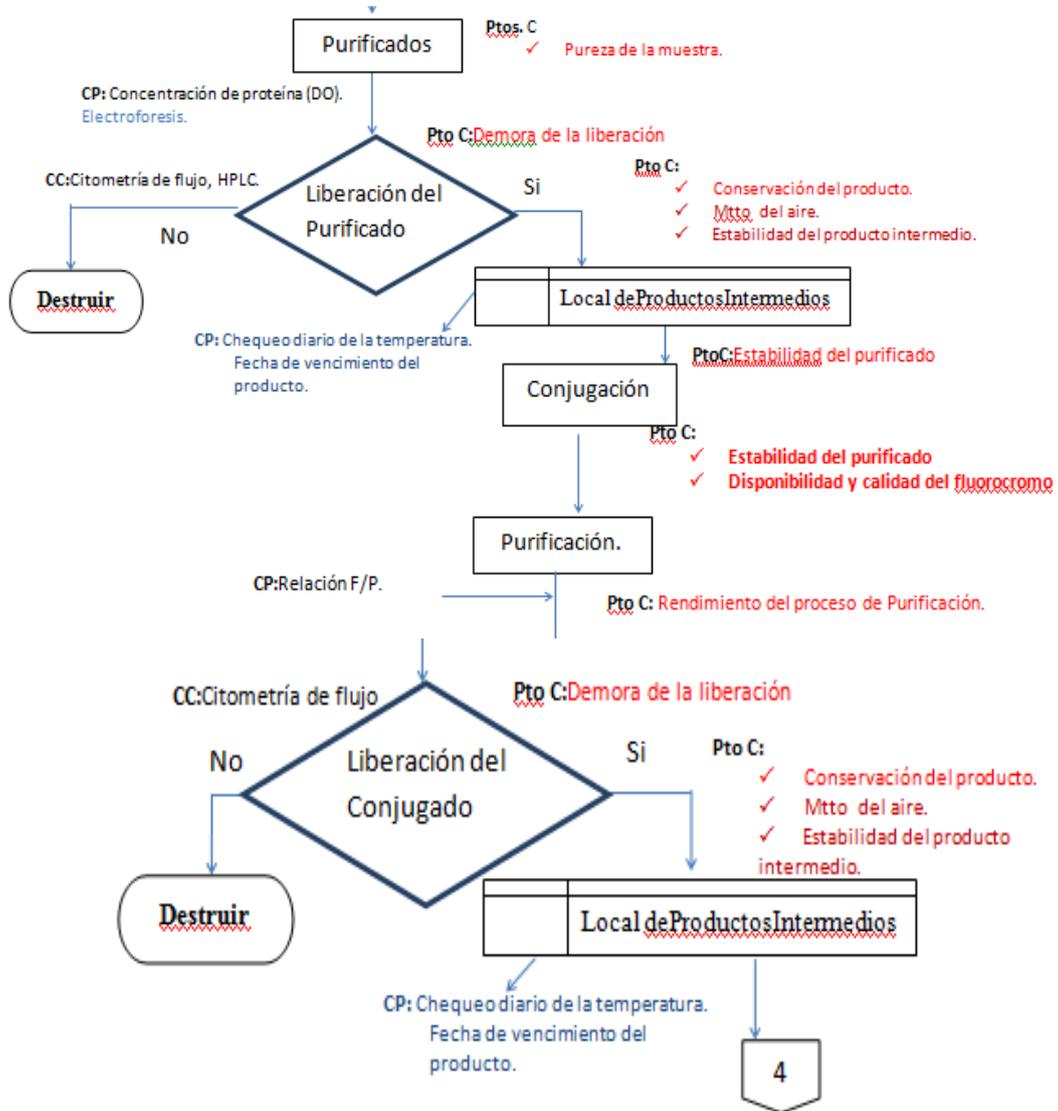
Etapa 2. Obtención de IFA.

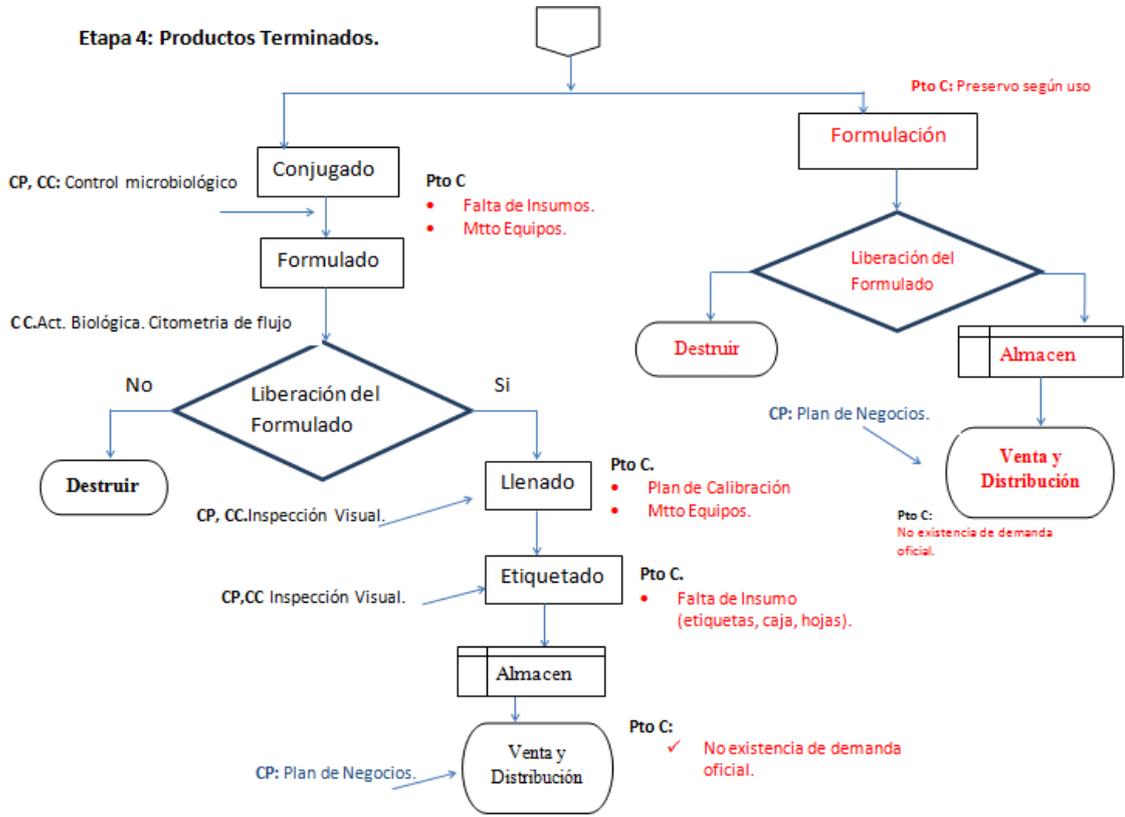


Etapa 3. Procesamiento de IFA.

Procesamiento de IFA







Anexo 11. Integrantes del Grupo de Expertos constituido.

Equipo de Expertos.				
No	Nombres y Apellidos	Área del Conocimiento	Área de Trabajo	Categoría Científico
1	Suyen Rodríguez	Bioquímica	Dirección. (Miembro del Concejo científico)	Doctora en Ciencia
2	Marlene Toledano	Lic. Química	Investigación. (Presidenta del Concejo científico)	Máster en Ciencia
3	Suzel Ávila	Lic. Biología	Aseguramiento de la Calidad. (Miembro del Concejo científico)	Máster en Ciencia
4	George Duarte	Bioquímico	Investigación. (Miembro del Concejo científico)	Máster en Ciencia
5	Sara Hilda Rubio	Médico Veterinario	Obtención de IFA-LAM (Miembro del Concejo científico)	Máster en Ciencia
6	Gladys Mercedes Puentes	Lic. Contabilidad y Finanzas. Lic. Ciencias Jurídicas.	Venta y Distribución. (Miembro del Concejo científico)	—
7	Didiet Cintra	Lic. Biología	Especialista Principal del Grupo de Preparación de Inóculos y Fermentaciones.	—
8	Grisel Rabell	Lic. Biología	Especialista Principal del Grupo Procesamiento de IFA.	Máster en Ciencia
9	Nelsa Osorio	Médico. Veterinario	Especialista Principal del Grupo Obtención de IFA-LAM	Máster en Ciencia
10	Yudelmis Sandoval	Téc. Química	Especialista Principal del Grupo Productos Terminados.	Técnico Innovador del 1 ^{er} nivel
11	Yanet Rivero	Ing. Química	Especialista III en Investigación, Innovación y Desarrollo.	—

Anexo 12. Planes de medidas y Vigilancias derivados de la aplicación del método HACCP al Proceso productivo de Marcadores Leucocitarios:

Plan de Medidas.

Fecha: 1 febrero de 2019.

No.	Deficiencia.	Causas y condiciones de la misma.	Medidas a adoptar.	Supervisión	Área responsable	Fecha de cumplimiento.
1	1 Demora en la importación de los materiales de envase, etiquetas, cajas, hojas, reactivos, filtros, membranas de diálisis, matrices comatográficas, jeringuillas, pienso.	Mala planificación logística y no seguimiento sistemático del Plan de Operaciones	1. Correcta planificación de los insumos procesos. 2. Cumplimiento de los Planes Operativos 3 Mantener un chequeo periódico de la existencia de materiales en almacén. 4. Evaluar los proveedores.	Consejo de Producción (Demanda 2018 y Plan de Operaciones) (documentos) Inspecciones a almacenes (supervisiones de logística) Aseguramiento de la Calidad – Comité de Calidad.	Producción Administración (logística) Calidad- Aseguramiento de la Calidad	Marzo / 2019
2	2 Falta de clientes para la venta de los	Falta de marketing.	5. Realización de talleres.	Consejo de dirección.	Logística Comercial.	junio/2019

	productos.		6. Intercambio con los posibles clientes de los productos.			
3	3 Falta de la validación del refrigerador de productos intermedios y de productos terminados.	El refrigerador es doméstico y no está validado.	7. Solicitar una inversión para compra de un refrigerador GMP. 8. Validar los refrigeradores y chequeo diario de la temperatura de los refrigeradores. 9. Compra de termo-higrómetros para control de temperatura y humedad de las cámaras.	Ingeniería (Consejo de Dirección). Inspecciones a almacenes (supervisiones de logística)	Ingeniería y Mantenimiento Aseguramiento de la Calidad.	Marzo / 2019

4	4 Roturas y pérdida de calibración del equipamiento (Flujos laminares, horno, espectrofotómetro, equipo de purificación, rolera y la maquina impresora de etiquetas).	Inconsistencia en el chequeo periódico de los parámetros técnicos del equipo.	10 Cumplimiento del Plan de Mantenimiento, calibración y calificación de equipos.	Plan de Mantenimiento (Reunión trimestral de Ingeniería).	Ingeniería y Mantenimiento.	Abril / 2019
	5 Rotura o desperfecto (fuera de rango de temperatura y humedad) de los equipos de refrigeración en los almacenes.	Incumplimiento de las frecuencias de mantenimiento y calibración.	11 Arreglo, calibración y/o compra en caso de ser necesario y no estar incluido en Plan.	Comité de Calidad (semestral).		
	6 Falta de Clima e Iluminación en el bioterio.	Estrés de los ratones. Afectaría la calidad del LAM.	12 Compra de piezas de repuestos. 13 Establecer las condiciones necesarias para reponer el clima. 14 Compra de balastro para garantizar la iluminación.	Plan de Mantenimiento (Reunión trimestral de Ingeniería).	Ingeniería y Mantenimiento.	Nov. / 2019

5	7 Demora en la Liberación.	Falta de un Citómetro de flujo	15 Compra de un citómetro de flujo. 16 Tener acceso al C.F del Hospital Clínico Quirúrgico. 17 Implementación de técnicas que se correlacionen con la C.F. (como controles de proceso.)	Ingeniería y Consejo de Dirección. Comité de Calidad.	Gerente de Marcadores Leucocitarios. Control de la Calidad.	Diciembre / 2019 Abril / 2019
6	8 Degeneración de los bancos celulares.	Falta de bancos de semilla y de trabajo.	18 Conformar bancos de semilla, maestro y de trabajo a partir de nuevas ámpulas.	Consejo de Producción.	Expansiones Celulares.	Diciembre / 2019
7	9 Agotamiento de la existencia de N ₂ , CO ₂ y O ₂ .	Fallo en el suministro por deficiencias logísticas internas (chequeo de disponibilidad en almacén) o problemas con los proveedores.	19 Garantizar adquisición en tiempo de N ₂ , CO ₂ y O ₂ . en la empresa de gases 20 Revisar y/o establecer un CS de suministro de gases	Reunión de Admón. Concejo de Dirección	Administración. Aseguramiento de la Calidad	Febrero / 2019

8	10 Determinación de la actividad biológica como controles de procesos en el inóculo, LAM, purificados.	Carencia del equipamiento, citómetro de flujo, microscopio de fluorescencia.	21 Compra del equipamiento necesario.	Concejo de Dirección.	Expansiones celulares, obtención de LAM, procesamiento de IFA	Marzo /2019
	11 Establecer otros controles de proceso, para la pureza en los purificados, y en los conjugados la cuantificación de Ac al fluorcromo.	Falta de los reactivos comerciales, para realizar la cuantificación.	22 Compra de los reactivos.	Consejo de Producción, Comité de Desarrollo.	Procesamiento de IFA.	

Plan de Vigilancia

Fecha: 1 febrero de 2019.

Proceso	Punto Critico	Causas y condiciones de la misma.	Acción Vigilancia	Responsable	Medidas
Expansiones celulares	Bancos celulares.	Una única liberación del banco, deterioro del hibridoma en el tiempo	1 Vigencia de análisis del banco (3 meses)	Aseguramiento de la Calidad.	Realizar Bancos de trabajo, de semilla y Maestros.
Obtención de IFA	Liberación del LAM.	No existe de una técnica alternativa para controlar el proceso productivo.	2 Evaluar la disponibilidad de técnicas para la funcionalidad requerida.	Producción Aseguramiento de la Calidad.	Evaluar técnica de inmunofluoresencia
Procesamiento de IFA	Falta de insumos.	Mala planificación logística y no seguimiento sistemático del Plan de Operaciones	3. Evaluar sistemáticamente el Plan de Operaciones	Logística comercial.	Certificar el plan demandado. Seguimiento en Reuniones de grupos y Cte de Operaciones.
	Mantenimiento a los equipos.	Incumplimiento de las frecuencias de mantenimiento y calibración.	4. Chequear sistemáticamente el Plan de Mto por el Grupo.	Ingeniería y mantenimiento	Informar incumplimiento de los mttos.
	Demora en la liberación del LAM, del purificado y de los conjugados.	No existencia del Citómetro de Flujo (se requiere viajar a la Habana). No existe una técnica alternativa para liberación.	5. Evaluar la disponibilidad de técnicas para la funcionalidad requerida.	Aseguramiento de la Calidad.	- Tener en Plan de Inversión la compra del Citómetro. - Evaluar técnica de inmunofluoresencia

Almacenamiento	Mantenimiento de los aires.	Reducir el tiempo del mantenimiento existente, de dos veces al año por una vez al mes.	6. Chequear sistemáticamente el Plan de Mto por el Grupo por el almacenero.	Ingeniería y mantenimiento	Informar incumplimiento de los mttos.
	Estabilidad de los productos.	No existe estudio de estabilidad en condiciones de almacenamiento.	7 Incorporar estudio de estabilidad en condiciones de almacenamiento	Aseguramiento de la Calidad.	Realizar estudio de estabilidad del producto en condiciones de almacenamiento
Distribución y Venta	No existencia de demanda oficial.	Falta completar registro Falta diseño del producto.	8 Completar Plan de Diseño de Desarrollo	Logística comercial.	Proponer diseño de productos. Realizar evaluación de terreno. Concertar demanda con MINSAP.

Elaborado por: Yanet Rivero Fernández.
Miembro de Grupo de Prevención de Riesgos.

Revisado por: Osmany Hártenma Ávila.
Gerente de Marcadores Leucocitarios.

Aprobado por: Suzelt Avila Heredia
Jefa del Dpto. de Calidad

Anexo 13. Informe de análisis para su liberación por calidad de los productos utilizados como materia prima intermedia para realizar los conjugados y obtener las mezclas dobles conjugadas; mediante los ensayos de citometría de flujo y HPLC.

Anti CD3 purificado a partir de LAM (Lote 01P1902)

REGISTRO DE CALIDAD		Código: A5 RC.006	
Informe de análisis para Anticuerpos Monoclonales		Edición: 04 Pág.: 1/1	
PRODUCTO	Anti CD3 Purificado a partir de LAM	NC	246
CÓDIGO DE REFERENCIA	5015	LOTE	01P1902
MÉTODOS DE ENSAYO	REQUISITOS DE CALIDAD Y RESULTADOS		LIMITES DE ACEPTACIÓN
	Dil./Conc./Vol.	Marcaje	
Inmunohistoquímica (IHQ)	/		Reconoce: Tejido linfóide normal: amígdala (marca área interfolicular células T y zona del manto). Timo (marca la zona de la corteza y la médula).
Inmunocitoquímica (ICQ)			Reconocimiento y marcaje de linfocitos y/o leucocitos aislados de sangre periférica en los porcentajes correspondientes.
Citometría de Flujo	2,5 µg/ml	66.54%	Anti-CD3 ---- 63 a 76 % Anti-CD4 ---- 30 a 51 % Anti-CD8 ---- 19 a 33 % Anti-CD45---- 80 a 100 %
Concentración de Igs ELISA (µg/ml)	-		Según especificación
Espectrofotometría	DO280:	-	Según especificación
Electroforesis	No reducida: Bandas a 1m de los 150 kDa		Obtención de una banda a la altura de los 150 kDa
	Reducida: EP: Banda sobre los 50kDa CL: Banda sobre los 25kDa		Una banda sobre los 50 kDa (cadena pesada) Una banda sobre los 25 kDa (cadena ligera)
HPLC	M+D: 99.83% D: 0.13%		≥ 95% de monómeros + dímeros ≤ 7% de dímeros
OBSERVACIONES:			
REQUISITOS DE CALIDAD SEGÚN ESPECIFICACIÓN: ESP: 5015			Se cumplen: <input checked="" type="checkbox"/> No se cumplen:
PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS PARA EL ENSAYO: A5 PND. 030, H10 PND. 0002, H10 PND. 0032			
ELABORA	MSc. Mirley E. Ramos García	FIRMA	[Firma]
CARGO	J. Pineda Impresión y Ensayo	FECHA	5/9/19
APRUEBA	MSc. Susel Pozo Acosta	FIRMA	[Firma]
CARGO	Jefa del Departamento Calidad	FECHA	5/9/19

Anti CD4 purificado a partir de LAM (Lote 02P1801)

LABEX		REGISTRO DE CALIDAD		Código: A5 RC.006	
Informe de análisis para Anticuerpos Monoclonales				Edición:04 Pág.: 1/1	
PRODUCTO	Anti-CD4 Purificado a partir de LAM			NC	47
CÓDIGO DE REFERENCIA	5016		LOTE	02P1801	
MÉTODOS DE ENSAYO	REQUISITOS DE CALIDAD Y RESULTADOS		LÍMITES DE ACEPTACIÓN		
	Dil./Conc./Vol.	Marcaje			
Imunohistoquímica (IHQ)	/		Reconoce: Tejido linfóide normal: amígdala (marca área interfolicular células T y zona del manto). Timo (marca la zona de la corteza y la médula).		
Imunocitoquímica (ICQ)			Reconocimiento y marcaje de linfocitos aislados de sangre periférica en los porcentajes correspondientes.		
Citometría de Flujo	5 µg/mL	42,23%	Anti-CD3 --- 63 % a 76 % Anti-CD4 ---- 30 % a 51 % Anti-CD8 ---- 19 % a 33 % Anti-CD45--- 90-100 %		
Concentración de Igs ELISA (µg/ml)	—		Según especificación		
Espectrofotometría	DO280: 3,041 mg/mL		Según especificación		
Electroforesis	No reducida: Banda a la altura de los 150 kDa		Obtención de una banda a la altura de los 150 kDa		
	Reducida: Banda W: 50 kDa, 25 kDa		Una banda sobre los 50 kDa (cadena pesada) Una banda sobre los 25 kDa (cadena ligera)		
HPLC	% Monómero: 99,37% + dímeros % Dímero: 0,04		95% de monómeros + dímeros ≤ 7% de dímeros		
OBSERVACIONES:					
REQUISITOS DE CALIDAD SEGÚN ESPECIFICACIÓN:				Se cumplen: <input checked="" type="checkbox"/>	
ESP-5016				No se cumplen:	
PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS PARA EL ENSAYO: A5 PND.003, H10 PND.0002, 610 PND.0009, A5 PND.027					
ELABORA	Lic. Yany L. Murad Sif			FIRMA	[Firma]
CARGO	Jefe de Lab. de Análisis			FECHA	28/2/18
APRUEBA	Hce. Suzelt Avila Escobar			FIRMA	[Firma]
CARGO	Jefe del Depto. de Calidad			FECHA	28/02/18

Anti CD45 purificado a partir de LAM (Lote 19P1803)

LABEX		REGISTRO DE CALIDAD		Código: A5 RC.006	
Informe de análisis para Anticuerpos Monoclonales				Edición: 04 Pág.: 1/1	
PRODUCTO	anti-CD45 Purificado a partir LAM		NC	254	
CÓDIGO DE REFERENCIA	5036		LOTE	19P1803	
MÉTODOS DE ENSAYO	REQUISITOS DE CALIDAD Y RESULTADOS		LÍMITES DE ACEPTACIÓN		
	Dil./Conc./Vol.	Marcaje	Reconoce: Tejido linfóide normal: amígdala (marca área interfolicular células T y zona del manto). Timo (marca la zona de la corteza y la médula). Reconocimiento y marcaje de linfocitos y/o leucocitos aislados de sangre periférica en los porcentajes correspondientes. Anti-CD3 ---- 63 a 76 % Anti-CD4 ---- 30 a 51 % Anti-CD8 ---- 19 a 33 % Anti-CD45--- 80 a 100 %		
Inmunohistoquímica (IHQ)	/				
Inmunocitoquímica (ICQ)	/		Reconocimiento y marcaje de linfocitos y/o leucocitos aislados de sangre periférica en los porcentajes correspondientes. Anti-CD3 ---- 63 a 76 % Anti-CD4 ---- 30 a 51 % Anti-CD8 ---- 19 a 33 % Anti-CD45--- 80 a 100 %		
Citometría de Flujo	5 µg/ml	94,40%			
Concentración de Igs ELISA (µg/ml)	—		Según especificación		
Espectrofotometría	DO280: 1,4 mg/ml		Según especificación		
Electroforesis	No reducida: Banda Mayoritaria eludida 150 kDa		Obtención de una banda a la altura de los 150 kDa		
	Reducida: Banda a 50 kDa Banda a 25 kDa		Una banda sobre los 50 kDa (cadena pesada) Una banda sobre los 25 kDa (cadena ligera)		
HPLC	M+D = 99,99 % D = 0,03 %		≥ 95% de monómeros + dímeros ≤ 7% de dímeros		
OBSERVACIONES: —					
REQUISITOS DE CALIDAD SEGÚN ESPECIFICACIÓN:				Se cumplen: <input checked="" type="checkbox"/>	
ESP-5036				No se cumplen:	
PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS PARA EL ENSAYO: A5 PND. 003, 610 PND. 009, 410 PND. 002, A5 PND. 027					
ELABORA	Lic. Jenny L. Suarez Delgado		FIRMA	[Firma]	
CARGO	Jefa del Serv. Control de Calidad		FECHA	29/10/18	
APRUEBA	Msc. Japonez Torres N.		FIRMA	[Firma]	
CARGO	PSR Jefa del Serv. Calidad		FECHA	29/10/18	

Anexo 14. Combinaciones establecidas para el doble conjugado.

Dil	CD4-PE (uL)	CD45-FICT (uL)	PBS (uL)	Dil	CD4-PE (uL)	CD45-FICT (uL)	PBS (uL)
5	20	20	60	10	10	20	70
		10	70			10	80
		6.67	73.3			6.67	83.33
		5	75			5	85
		3.33	76.67			3.33	86.67
		2.857	77.143			2.857	87.14
		2.5	77.5			2.5	87.5
		20	60			20	70
15	6.67	20	74	20	5	20	75
		10	84			10	85
		6.67	87			6.67	89
		5	88.33			5	90
		3.33	90			3.33	91.67
		2.857	90.57			2.857	92.143
		2.5	90.83			2.5	92.5
		20	74			20	75
30	3.33	20	76.67	35	2.857	20	77.143
		10	86.67			10	85.143
		6.67	90			6.67	90.473
		5	91.67			5	92.14
		3.33	93.34			3.33	93.81
		2.857	93.81			2.857	94.286
		2.5	94.17			2.5	94.643
		20	76.67			20	77.143
40	2.5	20	77.5				
		10	87.5				
		6.67	90.83				
		5	92.5				
		3.33	94.17				
		2.857	94.64				
		2.5	95				
		20	77.5				

Anexo 15. Representación del diseño experimental, antiCD4-PE/ antiCD45-FITC.

Réplica	Mezcla	Individuo	Técnico
1	CD4PE/CD45FITC	1	1
2			
3			
1	CD4PE/ CD45FITC	2	
2			
3			
1	CD4PE/CD45FITC	3	
2			
3			
1	CD4PE/CD45FITC	1	2
2			
3			
1	CD4PE/CD45FITC	2	
2			
3			
1	CD4PE/CD45FITC	3	
2			
3			
1	CD4PE/CD45FITC	1	3
2			
3			
1	CD4PE/CD45FITC	2	
2			
3			
1	CD4PE/CD45FITC	3	
2			
3			

Anexo 16. Representación del diseño experimental, antiCD4PE/antiCD3FITC.

Réplicas	Mezcla	Individuo	Técnico
1	CD4-PE/CD3-FITC	1	1
2			
3			
1	CD4-PE/CD3-FITC	2	
2			
3			
1	CD4-PE/CD3-FITC	3	
2			
3			

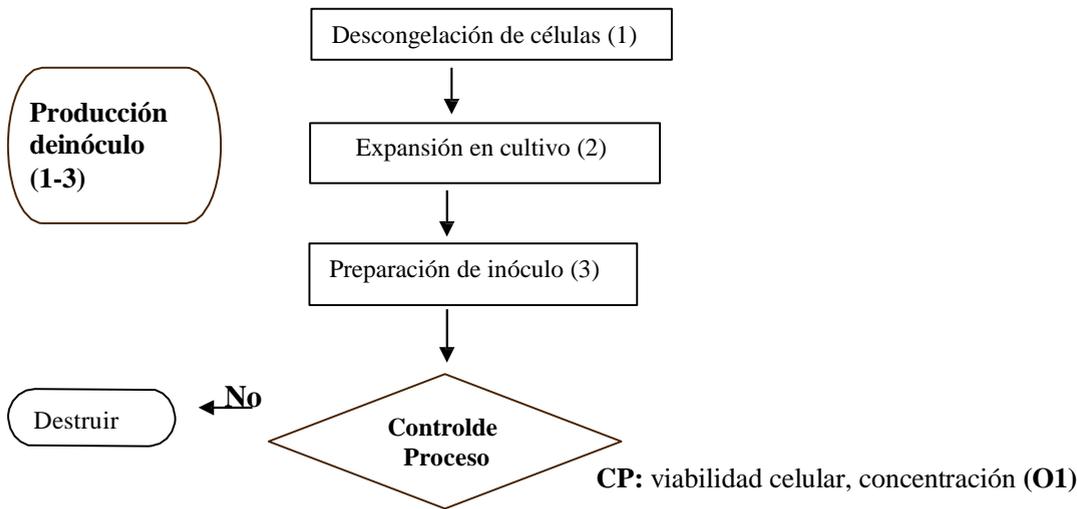
Anexo 17. Representación del diseño experimental, antiCD20PE/antiCD3FITC.

Réplicas	Mezcla	Individuo	Técnico
1	CD20-PE/CD3-FITC	1	1
2			
3			

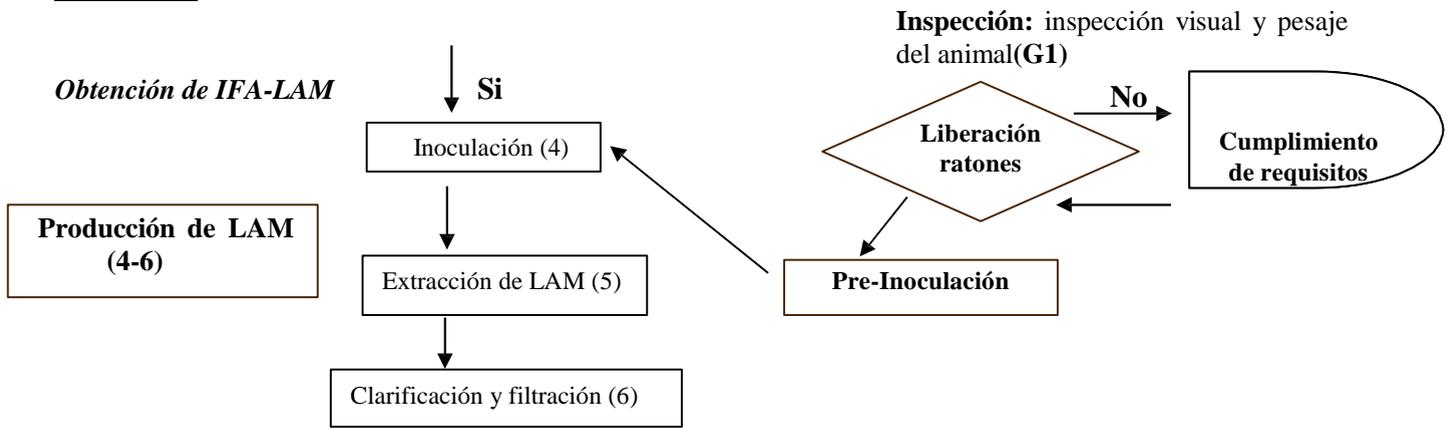
Anexo 18. Diagrama de Flujo de los Marcadores Leucocitarios

DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO PARA MARCADORES LEUCOCITARIOS. (CONJUGADOS)

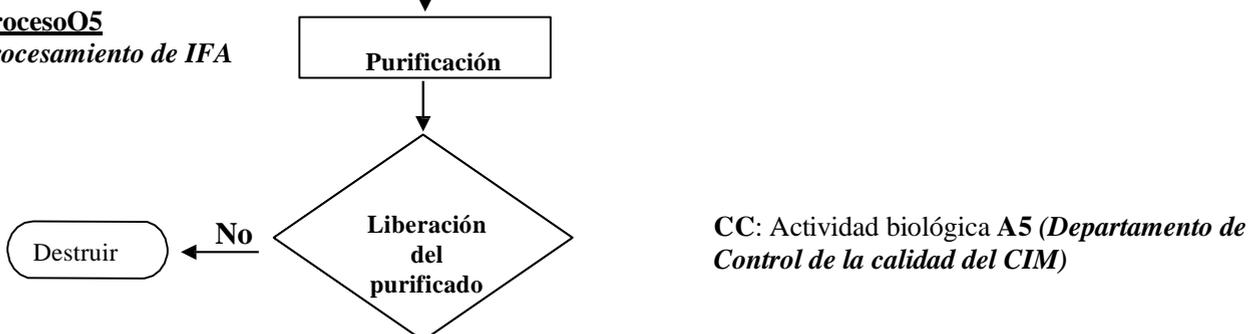
Proceso 01: Expansiones Celulares



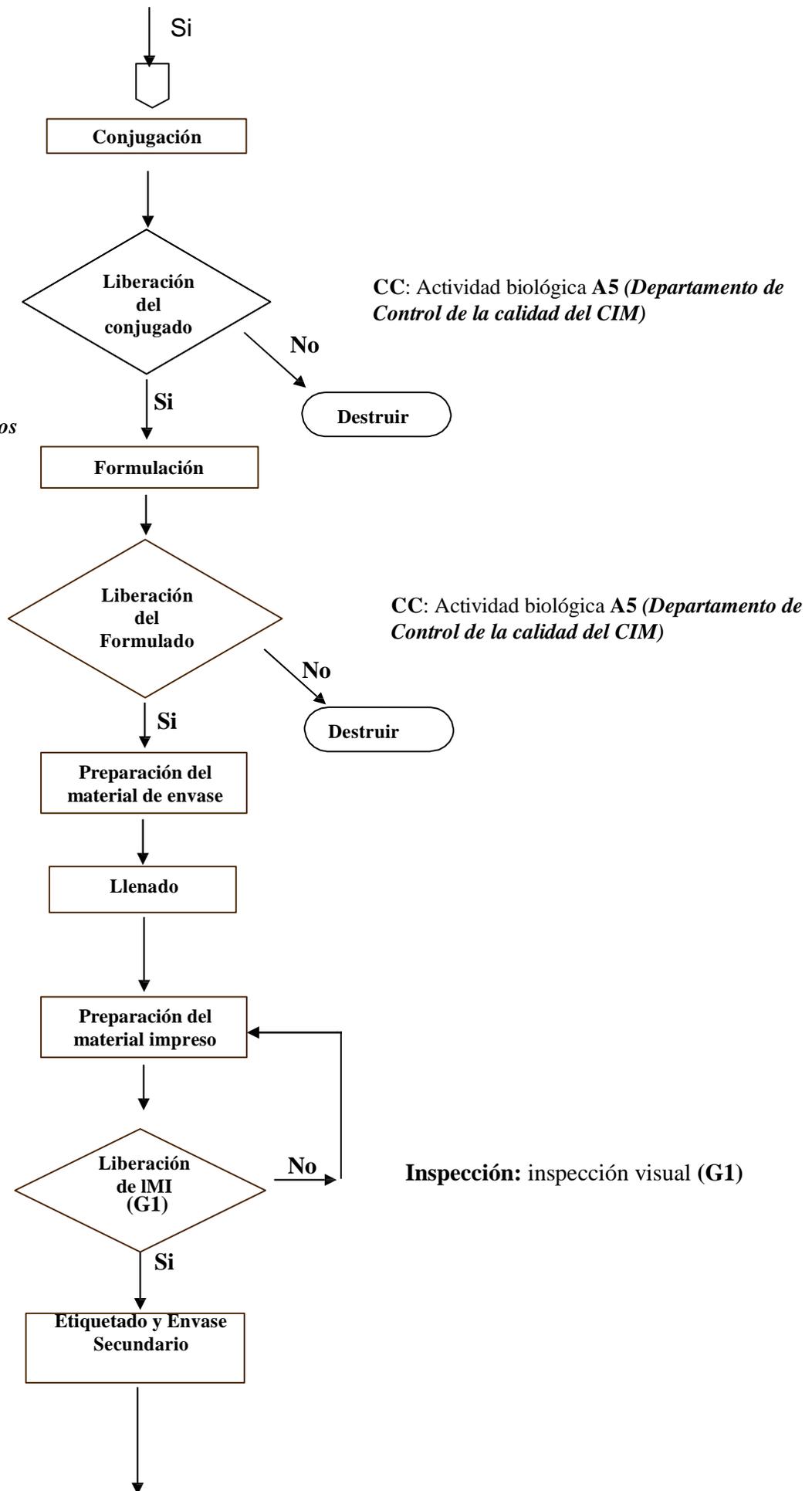
Proceso 02:

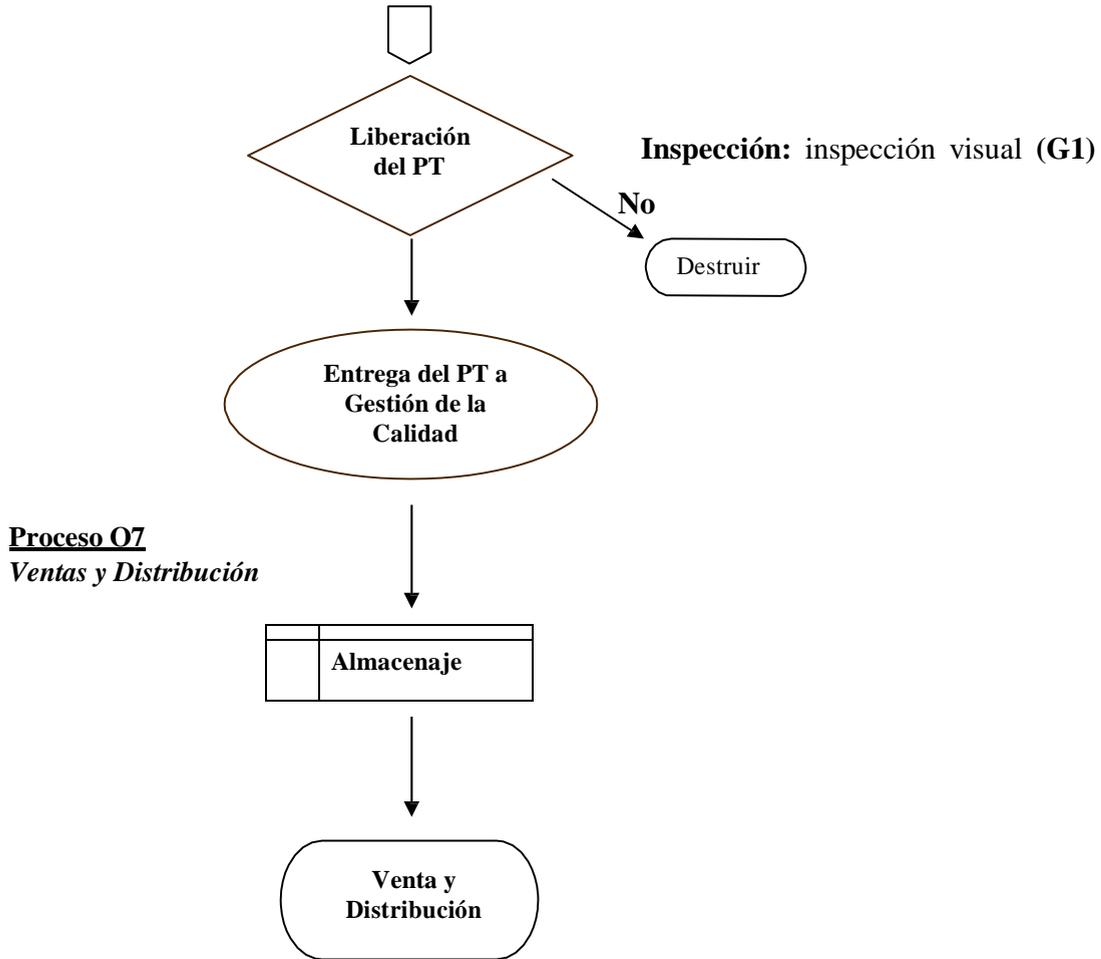


Proceso 05
Procesamiento de IFA

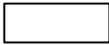
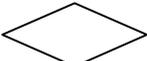
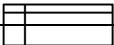


ProcesoO6
Productos Terminados





Leyenda:

SÍMBOLO/LETRAS	SIGNIFICADO
	Proceso
	Decisión: - Control de proceso - Liberación (por Inspección y/o por Gestión de la Calidad)
	Inicio o fin de proceso: - Producción de inóculo (inicio) - Ventas y Distribución (final) - Destrucción (final)
	Conector: Entrega del lote a Gestión de la Calidad
	Almacenamiento
	Conector de las páginas del flujo
CP	Control de proceso
CC	Control de Calidad
PT	Producto terminado
MI	Material impreso
PNC	Producto No Conforme
O2	Expansiones celulares
O2	Obtención de IFA-LAM
O5	Procesamiento de IFA
O6	Productos Terminados
O7	Ventas y Distribución
A5	Proceso de Inspección y Ensayo
G1	Proceso de Gestión de la Calidad

Anexo 19. Resumen de los PCC identificados por etapas.

Etapas 1: Expansiones Celulares (**Proceso O1**)

Etapas 2: Obtención de IFA-LAM (**Proceso O2**)

Etapas 3: Procesamiento de IFA (**Proceso O5**)

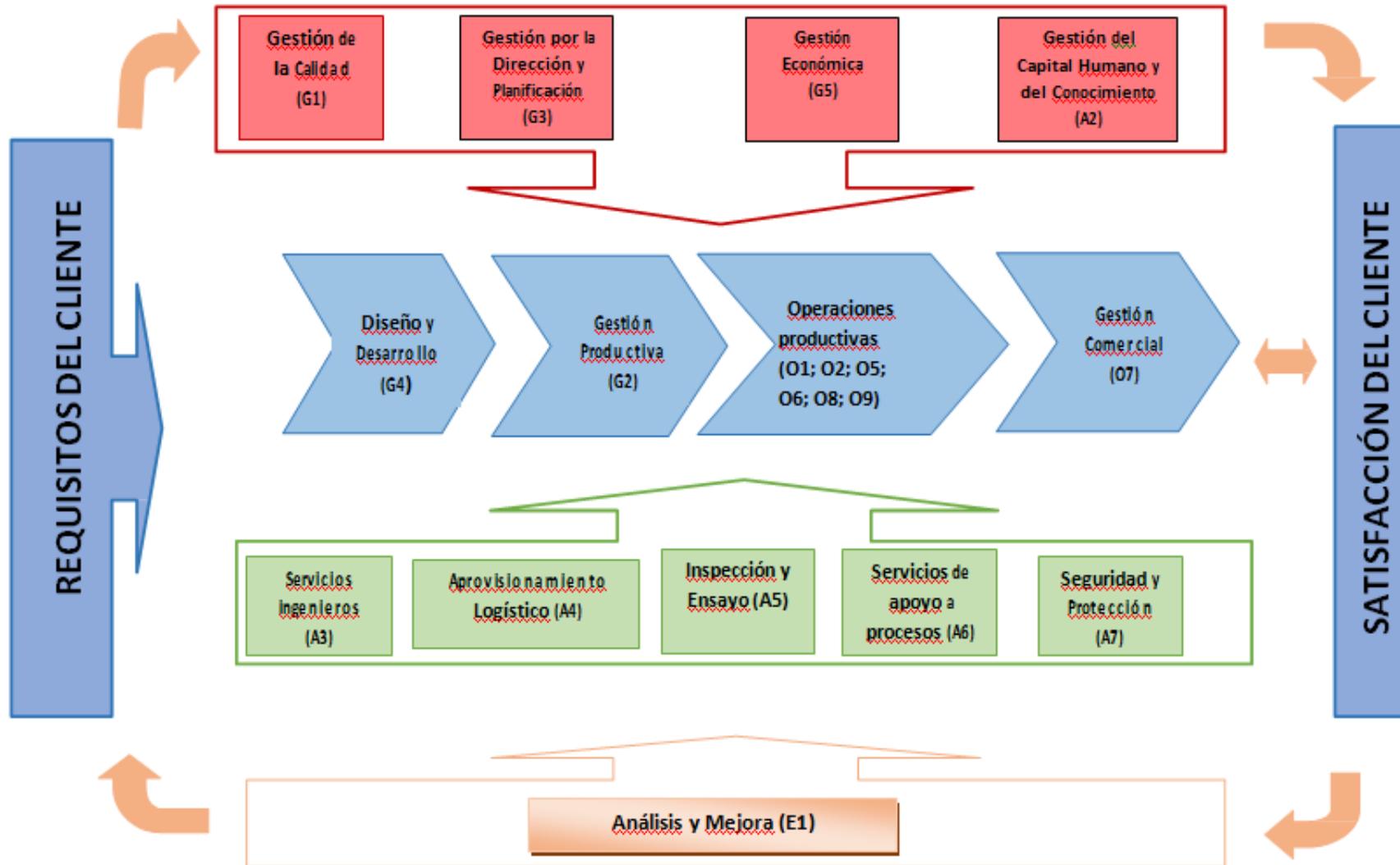
Etapas 4: Productos Terminados (**Proceso O6**)

Etapas	Puntos Críticos Existentes.	Controles de Procesos Existentes.	Puntos Críticos Identificados	Puntos de Control Generados.
1	<ul style="list-style-type: none"> • Suministro de N₂, CO₂. • Calificación del equipamiento 	<ul style="list-style-type: none"> • Viabilidad celular. • Concentración de células vivas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Suministro de insumos. • Degeneración del banco celular. 	<ul style="list-style-type: none"> • Plan Logístico (Comité de Operaciones) • Control de Calidad: Liberación del Banco Maestro de células (Cada 3 años). • Control de Proceso: Determinación de la actividad biológica (Microscopía de fluorescencia).
2	<ul style="list-style-type: none"> • Calidad del LAM • Conservación del producto. 	<ul style="list-style-type: none"> • No se tiene 	<ul style="list-style-type: none"> • Calidad del LAM. • Mantenimiento de equipos de refrigeración/conservación 	<ul style="list-style-type: none"> • Control de Proceso: Determinación de la actividad biológica. (Inmunofluorescencia). • Registro: Chequeo diario de la

				temperatura (almacén) y la inspección visual del producto
				• Control logístico de su Vencimiento.
3	<ul style="list-style-type: none">• Disponibilidad del Equipamiento.• Calidad de Insumos.• Pureza del IFA (AcM).• Demora de la liberación de los productos.• Conservación del Producto Intermedio.	<ul style="list-style-type: none">• Concentración del Purificado. (DO).• Relación F/P, en base a FITC/Proteína	<ul style="list-style-type: none">• Régimen de Mantenimiento de refrigeración/conservación• Estabilidad del producto intermedio.• Disponibilidad del fluorocromo.• Estabilidad de la ficoeritrina.• Concentración del anticuerpo conjugado.• Determinación de un control de proceso para el conjugado con PE.	<ul style="list-style-type: none">• Control de Proceso: Determinación de la pureza (Electroforesis)• Control de Proceso: Determinación de la concentración del fluorocromo para determinación de la relación PE/Prot.• Control de Calidad: Liberación de los conjugados mediante microscopía de fluorescencia.• Registro: Chequeo diario de la temperatura (almacén) e Inspección visual (f. vencimiento.)

- | | | | | |
|---|---|--|--|--|
| 4 | <ul style="list-style-type: none">• Falta de Insumo.• Mtto de los equipos.• Plan de Calibración y validación. | <ul style="list-style-type: none">• Control microbiológico.• Inspección visual. | <ul style="list-style-type: none">• No existencia de demanda oficial.• Demora en la liberación del formulado. | <ul style="list-style-type: none">• Plan de Negocio para este producto (Comité de Operaciones). |
|---|---|--|--|--|

Anexo 20. Mapa de Proceso.



Anexo 21. Evaluación de los Puntos Críticos en los Planes de Medidas y Vigilancia de los Marcadores Leucocitarios

Plan de medidas evaluados:

Fecha: 1 febrero de 2019.

No.	Deficiencia.	Causas y condiciones de la misma.	Medidas a adoptar.	Supervisión	Área responsable	Fecha de cumplimiento.
1	1 Demora en la importación de los materiales de envase, etiquetas, cajas, hojas, reactivos, filtros, membranas de diálisis, matrices comatográficas, jeringuillas, pienso. (Crítico)	Mala planificación logística y no seguimiento sistemático del Plan de Operaciones	1 Correcta planificación de los insumos procesos. 2 Cumplimiento de los Planes Operativos 3 Mantener un chequeo periódico de la existencia de materiales en almacén. 4 Evaluar los proveedores.	Consejo de Producción (Demanda 2018 y Plan de Operaciones) (documentos) Inspecciones a almacenes (supervisiones de logística) Aseguramiento de la Calidad – Comité de Calidad.	Producción Administración (logística) Calidad- Aseguramiento de la Calidad	Marzo / 2019
2	2 Falta de clientes para la venta de los productos.	Falta de marketing.	5 Realización de talleres. 6 Intercambio con los posibles clientes de	Consejo de dirección.	Logística Comercial.	junio/2019

	(Crítico)		los productos.			
3	3 Falta de la validación del refrigerador de productos intermedios y de productos terminados. (Moderado)	El refrigerador es doméstico y no está validado.	7 Solicitar una inversión para compra de un refrigerador GMP. 8 Validar los refrigeradores y chequeo diario de la temperatura de los refrigeradores. 9 Compra del termohigrómetros para control de temperatura y humedad de las cámaras.	Ingeniería (Consejo de Dirección). Inspecciones a almacenes (supervisiones de logística)	Ingeniería y Mantenimiento Aseguramiento de la Calidad.	Marzo / 2019

4	<p>4 Roturas y descalibración del equipamiento (Flujos laminares, horno, espectrofotómetro, equipo de purificación, rolera y la maquina impresora de etiquetas).</p> <p>(Crítico)</p>	<p>Inconsistencia en el chequeo periódico de los parámetros técnicos del equipo.</p>	<p>10 Cumplimiento del Plan de Mantenimiento, calibración y Plan de calificación de equipos.</p>	<p>Plan de Mantenimiento (Reunión trimestral de Ingeniería).</p>	<p>Ingeniería y Mantenimiento.</p> <p>Abril / 2019</p>
	<p>5 Rotura o desperfecto (fuera de rango de temperatura y humedad) de los equipos de refrigeración en los almacenes.</p> <p>(Crítico)</p>	<p>Incumplimiento de las frecuencias de mantenimiento y calibración.</p>	<p>11 Arreglo, calibración y/o compra en caso de ser necesario y no estar incluido en Plan.</p>	<p>Comité de Calidad (semestral).</p>	
	<p>6 Falta de Clima e Iluminación en el bioterio.</p> <p>(Moderado)</p>	<p>Estrés de los ratones. Afectaría la calidad del LAM.</p>	<p>12 Compra de piezas de repuestos.</p> <p>13 Establecer las condiciones necesarias para reponer el clima.</p> <p>14 Compra de balastro para garantizar la iluminación.</p>	<p>Plan de Mantenimiento (Reunión trimestral de Ingeniería).</p>	

5	<p>7 Demora en la Liberación. (Crítico)</p>	<p>Falta de un Citómetro de flujo</p>	<p>15 Compra de un citómetro de flujo. 16 Tener acceso al C.F del Hospital Clínico Quirúrgico. 17 Implementación de técnicas que se correlacionen con la C.F. (como controles de proceso.)</p>	<p>Ingeniería y Consejo de Dirección. Comité de Calidad.</p>	<p>Gerente de Marcadores Leucocitarios. Control de la Calidad.</p>	<p>Diciembre / 2019 Abril / 2019</p>
6	<p>8 Degeneración de los bancos celulares. (Intolerable)</p>	<p>Falta de bancos de semilla y de trabajo.</p>	<p>18 Conformar bancos de semilla, maestro y de trabajo a partir de nuevas ámpulas.</p>	<p>Consejo de Producción.</p>	<p>Expansiones Celulares.</p>	<p>Diciembre / 2019</p>
7	<p>9 Agotamiento de la existencia de N₂, CO₂ y O₂. (Moderado)</p>	<p>Fallo en el suministro por deficiencias logísticas internas (chequeo de disponibilidad en almacén) o problemas con los proveedores.</p>	<p>19 Garantizar adquisición en tiempo de N₂, CO₂ y O₂ en la empresa de gases 20 Revisar y/o establecer un CS de suministro de gases</p>	<p>Reunión de Admón. Consejo de Dirección</p>	<p>Administración. Aseguramiento de la Calidad</p>	<p>Febrero / 2019</p>

Plan de Vigilancia evaluado

Fecha: 1 Febrero de 2019.

Proceso	Punto Critico	Causas y condiciones de la misma.	Acción Vigilancia	Responsable	Medidas
Expansiones celulares	Bancos celulares. (Intolerable)	Una única liberación del banco, deterioro del hibridoma en el tiempo	1 Vigencia de análisis del banco (3 meses)	Aseguramiento de la Calidad.	Realizar Bancos de trabajo, de semilla y Maestros.
Obtención de IFA	Liberación del LAM. (Moderado)	No existe de una técnica alternativa para controlar el proceso productivo.	2 Evaluar la disponibilidad de técnicas para la funcionalidad requerida.	Producción Aseguramiento de la Calidad.	Evaluar técnica de inmunofluoresencia
Procesamiento de IFA	Falta de insumos. (Círtico)	Mala planificación logística y no seguimiento sistemático del Plan de Operaciones	3 Evaluar sistemáticamente el Plan de Operaciones	Logística comercial.	Certificar el plan demandado. Seguimiento en Reuniones de grupos y Cte de Operaciones.
	Mantenimiento a los equipos. (Moderado)	Incumplimiento de las frecuencias de mantenimiento y calibración.	4 Chequear sistemáticamente el Plan de Mto por el Grupo.	Ingeniería y mantenimiento	Informar incumplimiento de los mttos.
	Demora en la liberación del LAM, del purificado y de los conjugados. (Crítico)	No existencia del Citómetro de Flujo (se requiere viajar a la Habana). No existe una técnica alternativa para liberación.	5 Evaluar la disponibilidad de técnicas para la funcionalidad requerida.	Aseguramiento de la Calidad.	- Tener en Plan de Inversión la compra del Citómetro. - Evaluar técnica de inmunofluoresencia

Almacenamiento	Mantenimiento de los aires. (Moderado)	Reducir el tiempo de mantenimiento existente, de dos veces al año por una vez al mes.	6. Chequear sistemáticamente el Plan de Mtto por el Grupo por el almacenero.	Ingeniería y mantenimiento	Informar incumplimiento de los mttos.
	Estabilidad de los productos. (Crítico)	No existe estudio de estabilidad en condiciones de almacenamiento.	7 Incorporar estudio de estabilidad en condiciones de almacenamiento	Aseguramiento de la Calidad.	Realizar estudio de estabilidad del producto en condiciones de almacenamiento
Distribución y Venta	No existencia de demanda oficial. (Crítico)	Falta completar registro Falta diseño del producto.	8 Completar Plan de Diseño de Desarrollo	Logística comercial.	Proponer diseño de productos. Realizar evaluación de terreno. Concertar demanda con MINSAP.

Elaborado por: Yanet Rivero Fernández.
Miembro de Grupo de Prevención de Riesgos.

Revisado por: Osmany Hártenma Ávila.
Gerente de Marcadores Leucocitarios.

Suzelt Avila Heredia
Jefa del Dpto. de Calidad

Anexo 22. Nuevos Planes de Medidas y de Vigilancias

Plan de medidas:

Fecha: 1 Julio de 2019.

No.	Deficiencia.	Causas y condiciones de la misma.	Medidas a adoptar.	Supervisión	Área responsable	Fecha de cumplimiento.
1	1 Rotura o desperfecto (fuera de rango de temperatura y humedad) de los equipos de refrigeración en los almacenes. (Crítico)	Incumplimiento de las frecuencias de mantenimiento y calibración.	1 Compra de piezas de repuestos.	Plan de Mantenimiento (Reunión trimestral de Ingeniería).	Ingeniería y Mantenimiento.	Sep / 2019
2	2 Demora en la Liberación. (Crítico)	Falta de un Citómetro de flujo	2 Compra de un citómetro de flujo. 3 Implementación de técnicas que se correlacionen con la C.F. (como controles de proceso.) 4 Tener acceso al C.F del Hospital Clínico	Ingeniería y Consejo de Dirección. Comité de Calidad.	Gerente de Marcadores Leucocitarios. Control de la Calidad.	Diciembre / 2019 Sep / 2019

			Quirúrgico.			
3	<p>Establecer otros controles de proceso, para la pureza en los purificados, y en los conjugados la cuantificación de Ac al fluorcromo.</p> <p>(Moderado)</p>	<p>Falta de los reactivos comerciales, para realizar la cuantificación.</p>	<p>5 Compra de los reactivos de referencias.</p>	<p>Consejo de Producción, Comité de Desarrollo.</p>	<p>de Procesamiento de IFA.</p>	<p>Sep /2019</p>

Elaborado por: Yanet Rivero Fernández.
Miembro de Grupo de Prevención de Riesgos.

Dra. Suyen Rodríguez Pérez
Directora

Plan de Vigilancia

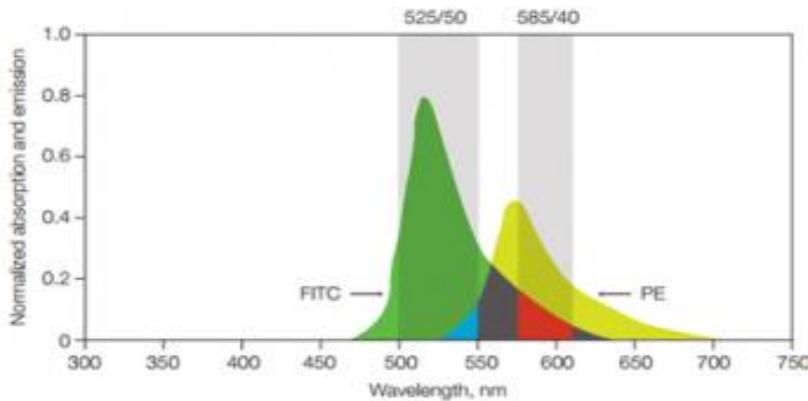
Fecha: 1 Julio de 2019.

Proceso	Punto Critico	Causas y condiciones de la misma.	Acción Vigilancia	Responsable	Medidas
Obtención de IFA	Liberación del LAM. (Moderado)	No existe de una técnica alternativa para controlar el proceso productivo.	1Evaluar la disponibilidad de técnicas para la funcionalidad requerida.	Producción Aseguramiento de la Calidad.	Evaluar técnica de inmunofluorescencia
Procesamiento de IFA	Demora en la liberación del LAM, del purificado y de los conjugados. (Crítico)	No existencia del Citómetro de Flujo (se requiere viajar a la Habana). No existe una técnica alternativa para liberación.	2Evaluar la disponibilidad de técnicas para la funcionalidad requerida.	Aseguramiento de la Calidad.	- Tener en Plan de Inversión la compra del Citómetro. - Evaluar técnica de inmunofluorescencia

Elaborado por: Yanet Rivero Fernández.
Miembro de Grupo de Prevención de Riesgos.

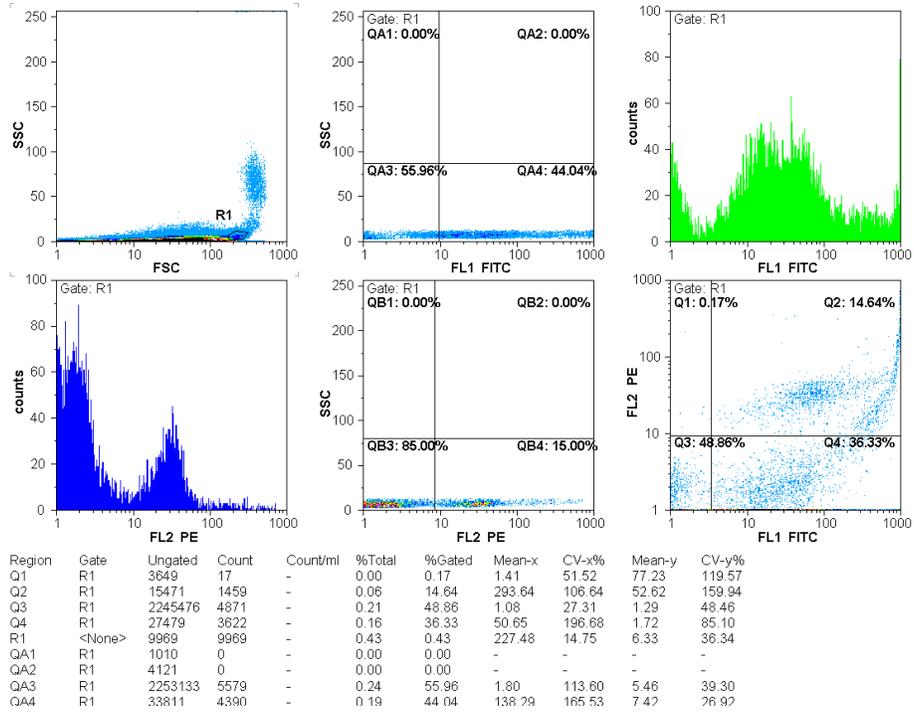
Suzelt Ávila Heredia
Jefa del Dpto. de Calidad

Anexo 23. Perfiles de emisión de los fluoróforos FITC y PE. Tomada de: <https://www.labclinics.com/diez-trucos-para-configurar-un-panel-de-citometria-de-flujo/>

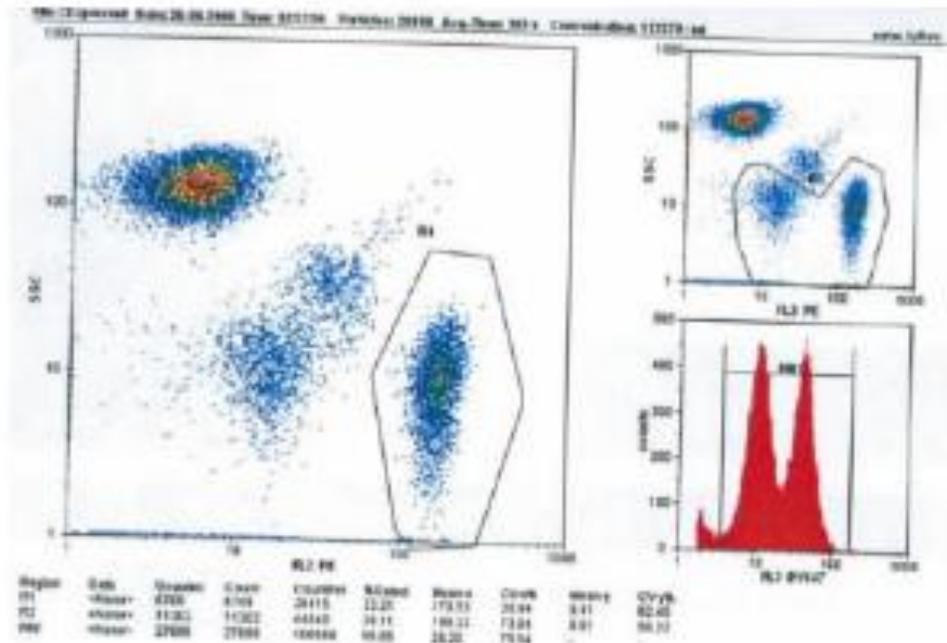


- Perfil espectral de emisión del FITC.
- Porcentaje del perfil espectral de emisión FITC por el canal 585/40
- Perfil espectral de emisión del PE
- Porcentaje del perfil espectral de emisión PE por el canal 525/50
- Los perfiles espectrales de emisión del FITC y PE no se detectaron en otros canales 525/50 de 585/40 (Solapamiento de la fluorescencia)

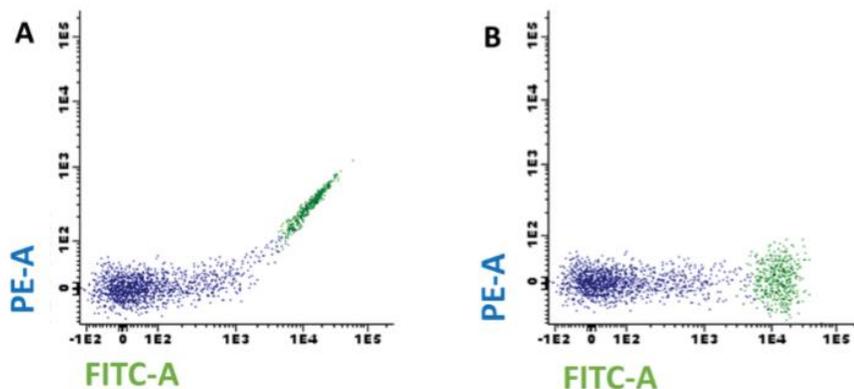
Anexo 24. Plantillas de los Reactivos para uso en citómetro *PARTEC*[®].
Plantilla creada para los reactivos de LABEX.



Plantilla para los reactivos *PAETEC*[®] Kit del conteo de los CD4. Tomado de:
<file:///F:/cd4-easy-count-kit-pepedy647-0584-05.pdf>



Anexo 25. Solapamiento de los fluorocromos FITC y PE. Tomado de: Figuerola, 2016. Escuaramidas como agentes de “Quenching” de fluorescencia. Tesis de Licenciatura, Universidad de Islas Baleares.



FITC, isotiocianato de fluoresceína, PE, ficoeritrina

Imagen ilustrativa del solapamiento de fluorescencia entre dos fluorocromos (FITC fluorocromo primario vs PE fluorocromo secundario) sin aplicar correlación (panel A) y una vez aplicado la compensación óptima para estos fluorocromos (panel B).

Anexo 26. Resumen del costo total de los reactivos conjugados con FITC.

Resumen de costo total del proceso del antiCD3-FITC			
	CUC	CUP	Total
Costo Total Cultivo Celular	216.878	260.309	477.187
Costo Total Obtención IFA LAM	53.040	2962.326	3015.366
Costo Total Purificación	209.105	308.953	518.058
Costo Total Producción terminada	176.905	57.669	234.575
Costo Total Producto	655.928	3589.258	4245.186
Costo Unitario	1.4480	7.9233	9.3713
Resumen de costo total por elemento			
	CUC	CUP	Total
Materia Prima Direcat Total	559.028	3044.409	3603.438
Mano de Obra directa Total	0	205.689	205.690
Costo Indirecto de Fabricación Total	96.900	339.160	436.060
Costo Total Producto	655.928	3589.258	4245.188
Costo Unitario	1.4480	7.923	9.37127

Resumen de costo total por proceso del antiCD45-FITC			
	CUC	CUP	Total
Costo Total Cultivo Celular	209.85	257.05	466.90
Costo Total Obtención IFA LAM	53.04	2962.33	3015.37
Costo Total Purificación	178.82	383.38	612.74
Costo Total Producción terminada	183.52	57.74	241.26
Costo Total Producto	625.23	3660.50	4336.26
Costo Unitario	1.3802	8.0806	9.5723
Resumen de costo total por elemento			
	CUC	CUP	Total
Materia Prima Direcat Total	578.87	3115.65	3694.52
Mano de Obra directa Total	0.00	205.69	205.69
Costo Indirecto de Fabricación Total	96.90	339.16	436.06
Costo Total Producto	675.77	3660.50	4336.27
Costo Unitario	1.4918	8.0806	9.5723

Anexo 27. Ficha de costo del Reactivo doble conjugado antiCD4-PE/ antiCD45-FITC.

A)EMPRESA: Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales			B) Descripción del Producto			
Subordinada a: BioCubaFarma			AntiCD4-PE/antiCD45-FITC			
PROPUESTA DE PRECIO:			U.M: Frasco Ambar			
NUEVO: <u> x </u> MODIF.: <u> </u>			CÓDIGO DEL PRODUCTO			
VOLUMEN DE PRODUCCIÓN:453 Frascos 1.1 ml						
Conceptos de gastos	Fila	Costo Base	PROPUESTA			APROBADO
			IMPORTE			
			Divisas	MN	Total	
A	B	1	2	3	4	6
Materias primas y materiales	1		1137.90	6160.06	7297.95	
Sub total (Gastos de elaboración)	2		213.88	877.54492	994.520193	
Otros gastos directos	3					
Gastos de fuerza de trabajo	4		0.00	205.700109	205.70	
- Salarios	5		0.00	188.56	188.56	
- Vacaciones	6		0	17.1401045	17.1401045	
Gastos indirectos de producción	9		193.80	678.32	872.12	
Gastos generales y de administración.	10		18.70	34.78	53.48	
Gastos de distribución y venta	11		1.38	261.91	263.28	
Contribución Seguridad Social (12.5 %)			0	25.7125137	25.7125137	
Impuesto Utilización Fuerza Trabajo (5%)			0	10.2850055	10.2850055	
Gastos Totales.	12		1351.77	7376.76	8728.53	
Margen utilidad S/ base autorizada	13				20%	
Utilidad	14		42.7750404	175.508984	198.904039	
Precio de Empresa	15		1394.55	7552.27	8927.44	
Precio Unitario			3.0785	16.6717	19.7074	
Confeccionado por: Nombre y Apellidos:	Firma:	Cargo:	Fecha:			

Anexo 28. Ficha de costo del Reactivo doble conjugado antiCD4-PE/antiCD3-FITC.

A)EMPRESA: Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales			B) Descripción del Producto AntiCD4-PE/antiCD3-FITC			
Subordinada a: BioCubaFarma			U.M: Frasco Ambar			
PROPUESTA DE PRECIO:			CÓDIGO DEL PRODUCTO			
NUEVO: <u> x </u> MODIF.: <u> </u>						
VOLUMEN DE PRODUCCIÓN:453 Frascos 1.1 ml						
Conceptos de gastos	Fila	Costo Base	PROPUESTA			APROBADO
			IMPORTE			
			Divisas	MN	Total	
A	B	1	2	3	4	6
Materias primas y materiales	1		1118.06	6088.82	7206.88	
Sub total (Gastos de elaboración)	2		213.88	877.54492	994.520193	
Otros gastos directos	3					
Gastos de fuerza de trabajo	4		0.00	205.700109	205.70	
- Salarios	5		0.00	188.56	188.56	
- Vacaciones	6		0	17.1401045	17.1401045	
Gastos indirectos de producción	9		193.80	678.32	872.12	
Gastos generales y de administración.	10		18.70	34.78	53.48	
Gastos de distribución y venta	11		1.38	261.91	263.28	
Contribución Seguridad Social (12.5 %)			0	25.7125137	25.7125137	
Impuesto Utilización Fuerza Trabajo (5%)			0	10.2850055	10.2850055	
Gastos Totales.	12		1331.93	7305.52	8637.46	
Margen utilidad S/ base autorizada	13				20%	
Utilidad	14		42.7750404	175.508984	198.904039	
Precio de Empresa	15		1374.71	7481.03	8836.36	
Precio Unitario			3.0347	16.5144	19.5063	
Confeccionado por: Nombre y Apellidos:	Firma:	Cargo:	Fecha:			