

¿RÉQUIEM PARA LA PRODUCCIÓN DE SUERO ANTIGLOBULÍNICO HUMANO POLICLONAL?

REQUIEM FOR THE PRODUCTION OF POLYCLONAL HUMAN ANTIGLOBULIN SERUM?

Autores: Sandra Gómez Fonseca ¹, Pedro Sánchez Frenes ², Ainex León García ³

¹ Doctor en medicina. Especialista de 1^{er} grado en Laboratorio Clínico y Medicina General Integral. Profesor Instructor. Hospital General Universitario “Gustavo Aldereguía Lima” Cienfuegos.sandrag@jagua.cfq.sld.cu

² Doctor en medicina. Especialista de 1^{er} y 2^{do} grado en Laboratorio Clínico. Profesor auxiliar. Máster en Salud Pública. Investigador agregado. Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos. pedrosf@jagua.cfq.sld.cu

³Licenciada en Química. Laboratorio de Inmunoquímica. Hospital General Universitario “Dr. Gustavo Aldereguía Lima”. Cienfuegos. ainex.leon@gal.sld.cu

RESUMEN

Los reactivos utilizados en el laboratorio de Inmunoematología, pueden agruparse en cuatro grupos básicos: células rojas reactivas, antisueros, potenciadores y suero de Antiglobulina Humana (AGH). De este último se evaluó, según recomendaciones internacionales, la calidad inmunológica de un lote producido a partir de una población de carneros inmunizados en el Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos. Las características organolépticas exploradas, potencia anti D y anti Fya+b+, actividad anti C3d y especificidad resultaron satisfactorias. Se concluyó que el suero AGH evaluado posee niveles de efectividad y seguridad según lo establecido nacional e internacionalmente. Se recomienda mantener la producción local de este diagnosticador, como fortaleza para la investigación e introducción de nuevos productos.

Palabras claves: Prueba de Antiglobulina humana, Banco de sangre.

ABSTRACT

Immunological quality of a human polyspecificantiglobulin serum, produced from a population of sheep immunized Provincial Blood Bank of Cienfuegos was evaluated according to international recommendations. The organoleptic characteristics explored were satisfactory. Diagnostician good performance in terms of power and anti Fy(a + b +), anti D, and anti-C3d. Product specificity in the absence of agglutination or hemolysis of erythrocytes in dilutions of different ABO blood groups was obtained. It was concluded that serum has effectiveness and safety as established nationally and internationally. It is recommended to maintain local production of diagnostic kits and other products in blood banks, as a fortress for research and introduction of new products, considering that Cuba blocked and developing country possesses biological production industry on the rise.

Key words: Human antiglobulin test, Blood Bank.

1. INTRODUCCIÓN

Los reactivos que de forma usual son utilizados en el laboratorio de Inmunoematología para evidenciar, a través de la aglutinación, la reacción entre un anticuerpo y su antígeno correspondiente, pueden agruparse en cuatro grupos básicos: células rojas reactivas, antisueros que contienen anticuerpos dirigido a antígenos específicos, potenciadores que mejoran la detección de estos anticuerpos y suero de Antiglobulina Humana (AGH) o suero de Coombs, en honor a uno de los investigadores que primero desarrolló esta prueba. ⁽¹⁻⁴⁾

El suero de AGH, constituye el componente esencial de la Prueba de Coombs, procedimiento de laboratorio para detectar e identificar inmunoglobulinas y complemento en la membrana de los hematíes y anticuerpos anti-eritrocitarios en el suero de los pacientes. Puede ser realizada con dos variantes: prueba de Antiglobulina directa (PAD) y prueba de Antiglobulina indirecta (PAI). A través de la primera, es posible demostrar eritrocitos humanos sensibilizados “in vivo” por anticuerpos y/o fracciones del complemento. Este procedimiento de un solo paso, es utilizado en el diagnóstico de enfermedad hemolítica del recién nacido (EHRN), anemia hemolítica autoinmune (AHA), la hemólisis inducida por drogas y en el diagnóstico de las reacciones hemolíticas post transfusional. Mientras que la prueba de Coombs indirecto demuestra reacciones “in vitro” entre eritrocitos y anticuerpos que sensibilizan, pero no aglutinan células que expresan el correspondiente antígeno; este es un procedimiento de dos pasos, útil para la detección e identificación de anticuerpos, agrupación de la sangre y pruebas de compatibilidad.⁽⁵⁻⁸⁾

Aunque en la prueba se combinan una mezcla de suspensión de hematíes, suero y reactivo AGH, algunas técnicas incluyen además reactivos de baja fuerza iónica (LISS), polietilenglicol (PEG), albúmina bovina 22%, aglutinación en columna de gel, adherencia en fase sólida, entre otras. Con independencia a esto, el reactivo AGH puede ser monoespecífico, si reconoce las Inmunoglobulinas, especialmente la IgG, o fracciones del complemento (C3d/C3dg), y poliespecífico cuando reconoce ambos grupos de moléculas. Asimismo en dependencia a su origen, el suero AGH puede ser policlonal, cuando se obtiene a través del suero de animales inmunizados con Inmunoglobulinas y C3 humanos purificados o mediante el uso de suero total como inmunógeno, o monoclonal mediante la obtención de anticuerpos monoclonales murino.^(9,10)

En la red cubana de bancos de sangre, servicios de transfusiones y laboratorios clínicos, no están disponibles todas las preparaciones de AGH, debido en lo fundamental al elevado costo de importación que tienen estos reactivos comerciales disponibles. Los bancos de sangre elaboran, a pequeña escala, ciertos reactivos para su propio uso por métodos tradicionales.⁽¹¹⁻¹²⁾

Se pretende comparar un lote de suero Antiglobulínico humano producido en el Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos con un reactivo comercial teniendo en cuenta las regulaciones nacionales e internacionales establecidas.

2. MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo transversal, realizado en el Laboratorio de Inmunoematología del Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos durante el período comprendido entre enero a septiembre del 2015 para evaluar la calidad inmunológica de un suero AGH poliespecífico y policlonal producido localmente.

Muestra: Reactivos de suero de Coombs utilizados.

Suero de Coombs evaluado. Se tomaron al azar 5 frascos de un lote de 100 de Suero de Coombs producido localmente siguiendo metodología establecida. Se utilizaron carneros del Bioterio de la Universidad de Ciencias Médicas de Cienfuegos, cumpliendo esquema de inmunización habitual con un inmunógeno preparado a partir de una mezcla de suero humano polivalente de los grupos sanguíneos O, A, B, AB con adyuvante de Freud (Inmunización de animales (carneros) para la obtención de Suero de Coombs. (PNO: L-IH-10. Banco de Sangre Provincial Cienfuegos. Revisión: 02 Fecha: 07-01-2014).

Suero de Coombs de referencia: Antiglobulina humana poliespecífica. CENTIS Diagnósticos. La Habana Cuba. Suministrador: SPINREACT. Solución de Anti-IgG de conejo y monoclonal murino Anti-C3d de tipo IgM obtenido a partir del clon BRIC-8 en tampón estabilizador. Trazable al material de referencia Anti-AHG 96/666 procedente del National Institute of Biological Standards and Controls (NIBSC).

Técnicas y procedimientos. A ambos reactivos se les realizó control de calidad según “Recommended methods for valuating potency, specificity and reactivity of anti-human globulin”

Food and Drug Administration(FDA) y Regulación 5 del 97 del CECMED “Recomendaciones para la evaluación de los diagnosticadores para uso en Inmunohematología” (11-13).

a) Inspección de características organolépticas. En busca de alteraciones de color, homogeneidad (transparente y libre de partículas), durante el período de validez declarado, a la temperatura de conservación recomendada. (Tabla 1).

b) Pruebas de Potencia:

b.1 Actividad anti IgG. Se usaron hematíes fenotipos O ccDde sensibilizados con Anti-D (1/16), y hematíes fenotipos Fy (a+ b+) sensibilizados con Anti-Fy (1/8). Se evaluaron a través del título de anticuerpos anti IgG, por la técnica de hemoaglutinación en los antisueros y es el recíproco de la mayor dilución del reactivo que provoca una reacción de aglutinación de 1+. (Tabla 2).

b.2 Actividad anti complemento. Se recubrieron los eritrocitos con fracciones del sistema complemento utilizando soluciones de trabajo del stock preparado, cloruro de Mg 0.4 M y buffer de sacarosa a PH 5.1. Por técnica de hemaglutinación se observa el grado de aglutinación que presenta y se anota. (Tabla 2).

c) Pruebas para la especificidad. Se realizó titulado las heteroaglutininas de los grupos sanguíneos A, B y O, utilizando técnica de hemaglutinación en tubo. (Tabla 3).

d) Test para reactividad con muestras de células normales: se usaron eritrocitos humanos obtenidos de un segmento colector de donantes aprobados por regulaciones, sangre conservada con anticoagulantes y a 2- 8°C de temperatura. (Tabla 3).

e) Test con eritrocitos tratados con enzimas (Tripsina): en la que se añadió 0.4 mL de eritrocitos lavados a 0.1% de solución de enzima (tripsina). En todos los procedimientos se aplicaron técnicas de hemoaglutinación, observando el grado de aglutinación y anotándolo. (Tabla 3).

La prueba de Coombs directa fue el procedimiento diagnóstico utilizado para demostrar el recubrimiento de los hematíes con anticuerpos y/o complemento.

Lectura Aglutinación ⁽³⁾

4+ Aglutinación total en un solo cúmulo grande en un fondo claro.

3+ Dos o tres aglutinados grandes en un fondo claro.

2+ Aglutinados pequeños, de igual tamaño, en un fondo rojo.

1+ Aglutinados muy pequeños, pero definidos, en un fondo rojo.

± Pequeños aglutinados no definidos, que pueden resultar dudosos. Para los propósitos del estudio, se considera negativo.

0 Ausencia de aglutinación.

3. RESULTADOS

Se presenta en la tabla número 1, las características organolépticas fundamentales exploradas en el suero AGH de producción local y el de referencia, las cuales resultaron satisfactorias.

Tabla No. 1. Características físicas.

Parámetro	Requisitos establecidos	AGH Local	AGH comercial Referencia
Aspecto	Líquido claro y transparente. Ausencia de precipitado, partículas o formación de gel	Cumple requisitos	Cumple requisitos
Color	Puede o no colorearse de verde	Incoloro	Verde

Tabla 2. Evaluación de la potencia del suero AGH bajo prueba y el de referencia.

Parámetro	Requisitos establecidos	AGH Local	AGH comercial Referencia
<i>Actividad anti IgG</i>	Grado de aglutinación con hematíes fenotipos O ccDee sensibilizados con Anti-D (1/16)	aglutinación 4+	aglutinación 3+
	Grado de aglutinación con hematíes fenotipos Fy (a+ b+) sensibilizados con Anti-Fy (1/8)	aglutinación 2+	aglutinación 2+
<i>Actividad anti Complemento</i>	Grado de aglutinación con hematíes O+ sensibilizados con C3b, con una intensidad 1+	aglutinación 2+	aglutinación 2+
	Grado de aglutinación para hematíes O+ sensibilizados con C3d, con una intensidad 2+.	aglutinación 2+	aglutinación 2+
	Negativo para hematíes O+ sensibilizados con C4d.	aglutinación +2	Aglutinación +2

La potencia inmunológica anti-D presentó un título de 32, y anti anti-Fy un título de 16. Además se analizó el título de los anticuerpos específicos para las fracciones del complemento C3b, C3d y C4b.

En el análisis de los resultados de la evaluación de la especificidad (capacidad del producto para identificar correctamente las muestras carentes del antígeno en cuestión), todas la pruebas realizadas resultaron satisfactorias al no aglutinar a eritrocitos recubiertos con C4d ni hemolizar a suspensiones de eritrocitos en salina y en solución de baja fuerza iónica (LISS), provenientes de 2 donantes de cada uno de los grupos A, B y O; tampoco reaccionó con los eritrocitos referidos anteriormente y el suero de 6 donantes. Estos resultados se observaron en la prueba de antiglobulina directa. (Ver tabla 3)

En el resto de las pruebas de especificidad el suero de Coombs bajo prueba, resultaron satisfactorias al no haberse observado hemólisis ni aglutinación visible macroscópicamente o microscópicamente en ningún tubo.

Tabla 3. Evaluación de la especificidad.

Parámetro	Requisitos establecidos	AGH Local	AGH comercial Referencia
Anticuerpos heteroespecíficos	El suero AGH no debe aglutinar o hemolizar células rojas(suero o plasma autólogo de donante sano negativo frente a hematíes de los grupos A1, B y O.	Cumple requisito	Cumple requisito
Reactividad con muestras de células normales	El suero AGH no debe aglutinar ni hemolizar a eritrocitos obtenidos de donantes de sangre sanos	Cumple requisito	Cumple requisito
Prueba con eritrocitos tratados con enzimas (Tripsina)	El suero AGH no debe aglutinación y/o hemolizar eritrocitos tratados con enzimas.	Cumple requisito	Cumple requisito

4. DISCUSIÓN

Con independencia de la variación de las características funcionales que puedan poseer los reactivos AGH (policlonal o monoclonal), en cuanto a su actividad de anti IgG y anti complemento, entre diferentes productores e inclusive entre diferentes lotes del mismo producto, es obligatorio que cumplan con las exigencias de los estándares de referencia de la FDA y lo regulado por el CECMED. Los resultados obtenidos del suero AGH evaluado coinciden con lo reportado en la literatura revisada y con estándares establecidos. ⁽¹¹⁻¹²⁾

La producción de AGH poliespecífico, puede resultar favorable debido a la presencia de anticuerpos IgG policlonales dirigidos a todas las subclases de IgG humanas y a los moléculas del complemento fundamentalmente C3b y C3d. Aunque no está totalmente claro, si su uso mejora la detección de anticuerpos séricos mediante la PAI, hay reportes de casos de anticuerpos que fueron detectados solo por su habilidad de unirse al complemento *in vitro* y que no han sido detectados empleando AHG mono-específica IgG. Sin embargo muchos laboratorios prefieren utilizar AGH mono-específica anti IgG para la detección e identificación de anticuerpos y en las pruebas cruzadas pre transfusionales, debido a que con el empleo de este reactivo evita la detección de la activación del complemento por auto aglutininas o aloanticuerpos frías clínicamente no significativas. ⁽³⁾

La actividad anti C4b y anti C4d detectada en ambos sueros AGH puede ser causa de falsos positivos en PAD y PAI utilizando AGH poli específica, debido a la activación “*in vitro*” del complemento por aglutininas frías clínicamente insignificantes. ^(1,3)

A manera de conclusión, el suero AGH producido en el Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos posee niveles de efectividad y seguridad según lo establecido nacional e internacionalmente. Es por ello que se recomienda mantener producción local de diagnosticadores y otros productos en los bancos de sangre.

Estas instituciones como parte de su encargo social, poseen una tradición de fabricación de componentes de la sangre para su transfusión, material de partida en la fabricación de productos biofarmacéuticos, o diagnosticadores para la clasificación de la sangre, pesquisa de anticuerpos o ambos.

La producción local de estos últimos, ha presentado una disminución, motivadas por varias causas. Dentro de las cuales se encuentran el uso de reactivos registrados, según ha regulado el CECMED. ⁽¹¹⁾

Sin embargo, los bancos de sangre poseen un marco regulatorio que propicia la garantía de la aptitud de los productos producidos y controlados de acuerdo a estándares de calidad apropiados para el uso previsto. Es por ello que las producciones locales de algunos productos biológicos diferentes a los tradicionales componentes de la sangre y hemoderivados en estos centros, puede constituir una alternativa ventajosa. ⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾

Cuba, país en vías de desarrollo, posee una industria de producción de biológicos en pleno progreso. Estas producciones constituyen una fortaleza para la investigación e introducción de nuevos productos.

5. CONCLUSIONES

Se puede concluir que el suero AGH producido en el Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos posee niveles de efectividad y seguridad según lo establecido nacional e internacionalmente. Es por ello que se recomienda mantener producción local de diagnosticadores y otros productos en los bancos de sangre.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blood grouping techniques. En Mollison's. Blood Transfusion in Clinical Medicine. Blackwell Publishing. Eleven edition. 2009; p 299-351.
2. Bencomo Hernández A, Alfonso Valdés ME. Detección de anticuerpos IgA e IgM en la prueba de antiglobulina (Coombs). Rev Cub Hemato Inmunol Hemoter [Internet]. Junio de 2010 [citado 5 de diciembre de 2012]; 26(4). Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol26_4_10/hih09410.htm
3. Muñiz E, Nogués N, Montero R, Canals C. Una visión práctica de los grupos sanguíneos. En: Joan Lluís Vives Corrons, Josep Lluís Aguilar i Bascompte. Manual de técnicas de laboratorio en hematología. Barcelona. Elsevier España. 2014. p.587 -622.
4. Mitra R, Mishara N, Prasad Rath G. Blood groups systems. Indian J Anaesth. 2014;[Internet]. [citado 17 de enero de 2017]; 58(5): 524–528.Disponible en: <http://www.ijaweb.org/article.asp?issn=0019-5049;year=2014;volume=58;issue=5;spage=524;epage=528;auiast=Mitra>
5. Yoshimi M, Kadowaki Y, Kikuchi Y, Takahashi T. Coombs-negative Autoimmune Hemolytic Anemia Followed by Anti-erythropoietin Receptor Antibody-associated Pure Red Cell Aplasia: A Case Report and Review of Literature. Intern Med. 2016;[Internet]. [citado 17 de enero de 2017] 55: 511-514. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26935373>
6. Cruz JR. Suficiencia de sangre y su relación con la organización del sistema nacional. Resúmenes orales Medicina Transfusional [Internet]. 4 Ene 2013 [citado 18 Dic 2016]. Disponible en:http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol25_04_09/hih03409.htm
7. Rodríguez Leyva R, Menéndez Corona J, Silveira Sánchez E, Paneque Tamayo D. Producción de suero de Coombs en carneros inmunizados con globulinas humana opsonizadas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. [Internet]. 2010 [citado 16 noviembre 2010]; 26 (3): [aprox. 16 p.]. Disponible en:http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S086402892010000300007&script=sci_arttext&lng=pt
8. Alfonso Valdés ME, Bencomo Hernández A. Tratamiento de las anemias hemolíticas autoinmunes. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter [Internet]. 2013 Dic [citado 2017 Ene 18] ; 29(4): 327-339. Disponible en:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892013000400003&lng=es.
9. Ballester Santovenia JM, Alfonso Valdés ME, Ballester Planes L, Bencomo Hernández A, Cortina Rosales L, Macías Abraham C, et al. Procedimientos para bancos de sangre y servicios de transfusión. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2009.
10. Martínez C, Toledano M, Rodríguez G, Andina L, Lassalle I, Sierra G. Solución adyuvante CM-95 tratada magnéticamente en comparación con el adyuvante de Freund para la obtención del suero de Coombs en conejo. VaccinMonitor [Internet]. 2009; [citado 10 marzo 2014]; 18 (3): [Aprox. 8 p.]. Disponible en:http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025-028X2009000300002&script=sci_arttext
11. Ministerio de Salud Pública. Recomendaciones para la evaluación de los diagnosticadores para uso en Inmunohematología. Ciudad de La Habana: CECMED; 1997.
12. Food and Drug Administration. Recommended methods for evaluating potency, specificity, and reactivity of anti-human globulin, March 1992 [Internet]. Maryland: Food and Drug Administration; 1992 [citado 19 Jun 2014]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/UCM080937.pdf>.

13. Ministerio de Salud Pública. Buenas prácticas para Servicios Transfusionales, Regulación No.73-14 M. CECMED. La Habana. 2014.
14. Ministerio de Salud Pública. Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de sangre. Regulación no. M 74-14. CECMED. La Habana. 2014.