

50
2ej.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLAN



SELECCION DE UN ANTICUERPO QUE NOS PERMITA EVALUAR
EL CORRECTO FRACCIONAMIENTO DE LA GAMMA-
GLOBULINA HUMANA NORMAL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
Que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
presenta
ARACELI VILLASEÑOR DIAZ

Director de Tesis:
D.C. JUAN LUIS ARCINIEGA RUIZ DE ESPARZA

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

CUAUTITLAN IZCALLI MEXICO, ENERO 1992



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

Contenido	7
Resumen	8
Introducción	9
Objetivos	20
Metodología	21
I. Cuantificación de Antitoxina Tetánica	21
a) Método de Seroneutralización en ratón	21
b) Método de Hemaglutinación Pasiva	26
II. Cuantificación de Antiestrptolisina O	30
Resultados	35
Discusión	46
Conclusiones	51
Apéndice I	53
Apéndice II	55
Añexo I	58
Bibliografía	66

R E S U M E N

En el presente trabajo se establecieron y analizaron dos técnicas para la evaluación de la actividad de la inmunoglobulina humana normal ; La hemaglutinación pasiva de antitoxina tetánica y la valoración de antiestreptolisina O por el método de hemólisis propuesto por Kalbak, 1947 .(15)

Para la cuantificación de antitoxina tetánica se comparó la técnica de hemaglutinación con la técnica de seroneutralización en ratón.(5)

Inicialmente se tituló la toxina tetánica en L+/10/50.(5)Después se determinó la concentración de antitoxina tetánica, contenida en cada una de las muestras de inmunoglobulina humana, utilizando la toxina titulada previamente y haciendo el ensayo por duplicado.Se eligió una muestra de inmunoglobulina que contenía una concentración elevada de antitoxina y se valoró por seroneutralización en ratón;Esta muestra se utilizó como patrón secundario en la prueba de hemaglutinación pasiva y fueron comparadas contra ésta, todas las muestras de inmunoglobulina humana normal estudiadas.

Por otra parte, se valoró la concentración de antiestreptolisina O, contenida en cada una de las muestras de inmunoglobulina humana normal,utilizando el método de Kalbak.(15)Primero se determinó el volumen de estreptolisina O que era neutralizado parcialmente por 0.5UI de antiestreptolisina O.Y posteriormente, se procedió a evaluar el contenido de antiestreptolisina O en cada una de las muestras.

I N T R O D U C C I O N

Las inmunoglobulinas humanas normales son concentrados de anticuerpos preparados a partir de sangre total, de plasma obtenido por plasmaféresis o de material placentario. Si provienen de plasma, deben obtenerse de una mezcla de al menos 1000 donadores normales⁽³³⁾

Probablemente fue Felton el primero que contó con preparaciones purificadas de anticuerpos, al precipitar la fracción euglobulinica, rica en inmunoglobulinas, del suero de caballos inmunizados con neumococos. El aislamiento puro de los anticuerpos fue logrado por Heidelberg y Kendall en 1936, mediante la disociación de precipitados específicos con soluciones salinas concentradas. En los años de 1937 y 1938 respectivamente, los estudios de Heidelberg y Pedersen con la ultracentrífuga de Svedberg y la electroforesis libre de Tiselius y Kabatt, esclarecieron que los anticuerpos pertenecen a la fracción de globulinas que poseen movilidad lenta, en ese tiempo designadas como gammaglobulinas⁽¹⁰⁾.

La inmunoglobulina humana normal se recomienda para la prevención del sarampión y la hepatitis A, y su uso es opcional contra la rubeola, siempre y cuando el producto se administre antes del contacto o al comienzo del período de incubación⁽³³⁾.

La terapia de reposición ayuda a los pacientes con síndromes primarios y secundarios de deficiencia de anticuerpos. La inmunoglobulina humana normal está claramente indicada en enfermedades con deficiencia notable en la producción de todas las inmunoglobulinas y puede estar indicada en la deficiencia selectiva de una o más clases o subclases de inmunoglobulinas, en la deficiencia de anticuerpos con normogammaglobulinemia o hipergammaglobulinemia y en las infecciones repetidas o graves asociadas con deficiencia de inmunoglobulina, la cual puede ser pasajera⁽³³⁾.

Un nivel bajo de inmunoglobulina no constituye en si mismo razón suficiente para el tratamiento; se debe establecer en lo posible un diagnóstico preciso, y comprobar fallas de la inmunidad humoral⁽³³⁾.

La inmunoglobulina debe usarse únicamente de acuerdo a las indicaciones antes expuestas. Ya que no hay pruebas de que la inmunoglobulina humana normal sea de utilidad profiláctica en individuos sin deficiencia, no se recomienda para prevenir las infecciones de las vías respiratorias superiores. Desgraciadamente, es frecuente el uso inadecuado de las preparaciones de inmunoglobulina⁽³³⁾.

Para separar mezclas de proteínas globulares, se pueden explotar varias de sus propiedades características, a saber: 1) su tamaño molecular, 2) su solubilidad, 3) su carga eléctrica, 4) sus diferencias en adsorción y 5) su afinidad por otras moléculas. Desde el punto de vista industrial, han sido de utilidad las separaciones basadas en la solubilidad y la carga eléctrica de las proteínas⁽¹⁷⁾.

Las proteínas en solución muestran profundos cambios en su solubilidad como función de: 1) el pH, 2) la fuerza iónica, 3) las propiedades dieléctricas del solvente y 4) la temperatura. Estas variables pueden utilizarse para separar mezclas de proteínas, ya que cada proteína tiene una composición de aminoácidos característica que da su composición como un electrolito⁽¹⁷⁾.

Utilizando los cuatro parámetros de la solubilidad de proteínas, E. J. Cohn y sus colaboradores de la escuela médica de Harvard diseñaron procesos exitosos durante la Segunda Guerra Mundial para el aislamiento en gran escala de varias proteínas de plasma sanguíneo humano. Los procedimientos de fraccionamiento de proteínas usualmente se efectúan a concentraciones bajas de sal, para evitar la alteración electrolito-proteína. Asimismo, la concentración de proteínas se mantiene en el orden más bajo posible para minimizar la interacción proteína-proteína, pero lo más elevada posible para obtener un buen rendimiento. Además, tanto la concentración de alcohol en agua como la temperatura se mantiene el orden más bajo posible para disminuir la desnaturalización de la proteína. El pH tiene que ser controlado y ajustado a los diferentes puntos isoeléctricos, tomando en cuenta la interacción con sal y proteínas⁽⁴⁾.

Durante el proceso de fraccionamiento la inmunoglobulina se obtiene en la fracción II y III y dependiendo del método, el rendimiento y pureza de ésta, será mayor o menor⁽⁴⁾.

Las inmunoglobulinas deben prepararse de conformidad con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, y estar exentas de activadores de la precalicrefina, cininas, plasminas y agentes conservadores acumulativos u otros contaminantes potencialmente nocivos. Su concentración de IgA debe ser muy baja y contener lo menos posible de agregados de IgG⁽²⁵⁾.

Es necesario que las preparaciones de inmunoglobulinas contengan como mínimo un 90% de IgG. Esta IgG debe estar lo menos modificada posible, y conservar su acción opsonica, su acción fijadora de complemento y otras actividades biológicas. Todas las subclases de IgG deben estar presentes en proporciones lo más parecidas posible a las del plasma normal⁽³³⁾.

El valor clínico de la inmunoglobulina humana normal, depende de la existencia en la preparación de la cantidad suficiente de anticuerpos contra cierto número de agentes específicos. Es de esperar que las preparaciones de inmunoglobulina humana normal, producidas en distintos países, difieran entre sí por su contenido de diversos anticuerpos, según la estimulación antigénica a la que la población en general se haya visto sometida, por infección natural o inmunización artificial⁽²⁵⁾.

En México en una reunión conjunta de los productores de inmunoglobulina con el Laboratorio Nacional de Salud Pública, realizada en 1977, se sugirió establecer los límites de actividad, después de reunir suficiente información sobre los niveles de anticuerpos existentes en la

materia prima de origen nacional, y considerando además la recomendación de que los métodos de fraccionamiento deben asegurar la decuplicación de tal contenido en el producto acabado. Asimismo en esa reunión se acordó que el contenido de anticuerpos contra difteria, tétanos, polio y sarampión deberían interpretarse sólo como una prueba de evidente actividad, sin límite específico^(6).

Hasta 1980, la actividad de la inmunoglobulina humana normal fue probada en el Laboratorio Nacional de Salud Pública por la valoración de antitoxina diftérica y tetánica, utilizando técnicas de seroneutralización en animales. Esta valoración fue suspendida por falta de recursos^(6).

Surgió entonces la necesidad de implantar una técnica barata, rápida y en consecuencia sugerir límites adecuados para la actividad de anticuerpos presentes y probados por el método elegido.

De acuerdo con las recomendaciones de la OMS, la actividad de la inmunoglobulina humana normal se evalúa con la cuantificación de 2 anticuerpos, uno de origen viral y otro de origen bacteriano, para los que se cuente con un método preciso de titulación, y se disponga de un patrón internacional o preparaciones de referencia. En este caso se encuentran los anticuerpos contra el virus del sarampión, los poliovirus 1, 2 y 3, la estreptolisina O, la toxina diftérica, la toxina tetánica y la toxina estafilocócica alfa^(25).

Se consideran dos posibilidades para la cuantificación de anticuerpos de origen bacteriano: 1) la determinación de antitoxina tetánica utilizando la reacción de hemaglutinación pasiva y 2) la valoración de antiestreptolisina O en unidades internacionales.

1) La prueba de hemaglutinación pasiva es uno de los sistemas que existen para poner de manifiesto la reacción antígeno-anticuerpo. Desde la década de los 40's hasta la fecha, se han realizado estudios y avances importantes en este campo, utilizando antígenos insolubles que directamente reaccionan con el anticuerpo (aglutinación directa), o bien utilizando partículas inertes sobre las cuales es adsorbido el antígeno (aglutinación pasiva o indirecta) (10).

La prueba de hemaglutinación pasiva es una aglutinación indirecta, en la cual los eritrocitos son utilizados como soporte para el antígeno. Al ponerse en contacto con los eritrocitos sensibilizados con el anticuerpo, aglutinan, es decir, unidos por anticuerpos que han reaccionado con los antígenos adsorbidos en su membrana (2).

Boyden en 1951 describió la adsorción de varias proteínas sobre la superficie de eritrocitos de borrego, tratados previamente con ácido tánico, y su aglutinación al ponerse en contacto con diluciones elevadas de un anticuerpo específico (27).

Stavinsky y colaboradores, en 1963, establecieron los factores que influyen en la reacción de hamaglutinación, sus aplicaciones y limitaciones, llegando a la conclusión de que es altamente sensible, específica y requiere de cantidades mínimas de reactivos, pero que se ve influida por las siguientes variables: 1) la concentración del ácido tánico, 2) el tiempo de exposición, 3) el pH de la solución de ácido tánico, 4) la concentración del antígeno, 5) el tiempo de sensibilización y 6) la temperatura de sensibilización⁽³¹⁾.

Los eritrocitos no solamente han sido tratados con ácido tánico sino también con otros agentes químicos. J. Gordon y sus colaboradores en 1958 trataron eritrocitos de conejo con bencidina bis-diazotizada⁽¹²⁾. En 1963 Fundenberg y colaboradores trabajaron con eritrocitos humanos tipo O Rh + tratados con cloruro crómico⁽¹²⁾. Se utilizaron además otras sustancias como 2,4 disocianato de tolueno y gluteraldehído⁽¹⁰⁾. En 1963, Beneson y sus colaboradores estudiando el efecto de la irradiación en el desarrollo de anticuerpos tetánicos, realizaron la titulación de antitoxina tetánica por dos métodos; seroneutralización en ratón y hamaglutinación pasiva, encontrando discrepancias en los resultados; consideraron dos posibilidades: la existencia de un error sistemático en una de las dos pruebas o bien que el método de seroneutralización es específico y que en la prueba de hamaglutinación podrían presentarse reacciones cruzadas. En consecuencia sugirieron que la prueba de hamaglutinación es válida únicamente cuando el suero de referencia y el problema son de la misma especie⁽²⁾.

En 1970, Hardegree y colaboradores compararon los resultados de la valoración de antitoxina tetánica titulada por ambos métodos, seroneutralización y hemaglutinación pasiva observando una marcada diferencia en los títulos y concluyendo que la hemaglutinación no es un método adecuado para evaluar anticuerpos tetánicos en estudios de campo⁽¹⁴⁾

En Francia, M. Rey y colaboradores en 1978 compararon nuevamente la técnica de seroneutralización en ratón con la de hemaglutinación pasiva. De acuerdo con sus resultados, consideraron que el método de hemaglutinación es simple, rápido, económico y muy sensible; sin embargo requiere de un riguroso entrenamiento en el laboratorio, y existen múltiples factores que influyen en el resultado, de los cuales la pureza del antígeno y el soporte globular son determinantes. Tales desventajas provocan que los resultados sean poco reproducibles⁽²⁴⁾

Se hicieron estudios semejantes en la India por Asarudii en 1980⁽¹¹⁾ y Kaskar en 1981⁽¹⁶⁾ y en Australia por Duncan en 1978, en los que se concluye que los resultados de la hemaglutinación pasiva no son reproducibles⁽⁷⁾.

En México en 1983, en el Instituto Nacional de Higiene Pérez de la Mora y colaboradores compararon los resultados de la valoración de antitoxina tetánica utilizando tres pruebas diferentes: ELISA, hemaglutinación pasiva y seroneutralización en ratón, concluyendo que existe una correlación razonable entre estas técnicas, especialmente a niveles altos de anticuerpos⁽²⁰⁾.

2) La estreptolisina O es una enzima oxígeno-lábil producida por la mayor parte de cepas de estreptococo del grupo A, cuyo efecto tóxico consiste en provocar la hemólisis, al modificar el arreglo tridimensional de los lípidos de la membrana de los eritrocitos, en virtud de los formación de enlaces entre los grupos sulfhidrilo de la proteína y los esteroides, lo que originan orificios a través de los cuales escapa la hemoglobina.

La estreptolisina O es capaz de inducir la formación de anticuerpos que neutralicen su acción hemolítica, conocidos como antiestreptolisina O.

La titulación de antiestreptolisina se emplea como una ayuda de laboratorio para la detección de infecciones por estreptococo del grupo A y sus secuelas, la fiebre reumática y la glomerulonefritis aguda⁽³⁰⁾.

Los fundamentos de la técnica de antiestreptolisina O fueron establecidos por Todd, quien en 1931 definió la unidad de antiestreptolisina O como: la actividad contenida en una cantidad de suero capaz de neutralizar 2.5 dosis hemolítica mínima de estreptolisina O, definiendo una dosis hemolítica mínima como la dosis suficiente para hemolizar completamente 0.5 mL de una suspensión de eritrocitos de conejo al 5%⁽³²⁾.

Sin embargo, debido a la inestabilidad que presentan en su actividad las toxinas en general, se decidió no expresar la unidad en función de dosis hemolíticas mínimas que esta neutralizaba, sino como mg de un suero potente arbitrariamente seleccionado⁽²⁶⁾.

En 1944 fue establecido el Patrón Nacional Danés de antiestreptolisina O Humana por Kalbak e Ipsen y se definió la unidad como la actividad de antiestreptolisina contenida en 0.809 mg de dicho patrón. Este, con una unidad equivalente a la definida por Todd, es remplazado en 1952 por un segundo patrón, el cual contiene una unidad de antiestreptolisina O en 0.0643 mg de una preparación de suero humano con un título elevado⁽²⁶⁾.

El Comité de Expertos de Enfermedades Reumáticas de la Organización Mundial de la Salud recomendó en 1957 el establecimiento de un patrón internacional de antiestreptolisina O humana. En cooperación con el Laboratorio Internacional de Estándares Biológicos de Copenhague, se preparó tal patrón, que fue evaluado por once laboratorios de diferentes países siguiendo el método usualmente empleado para la prueba de antiestreptolisina O⁽²⁶⁾.

En 1961 se publicaron en el boletín de la OMS los resultados de esta evaluación, concluyéndose que la unidad del patrón propuesto corresponde a 0.0213 mg del suero original. La unidad tiene comparativamente con el segundo patrón danés, la misma actividad que la definida originalmente por Todd⁽²⁶⁾.

En el mismo boletín se presentó una comparación entre las unidades Todd y las unidades internacionales correspondientes para el patrón internacional, encontrándose una diferencia del 4.13% entre ambas⁽²⁶⁾.

En México la antiestreptolisina O tradicionalmente se ha titulado por el método de Todd, y los estudios clínicos y epidemiológicos se informan en estas unidades⁽¹¹⁾.

Para evaluar las inmunoglobulinas humanas normales en unidades internacionales, es necesario utilizar una técnica de actividad relativa como la diseñada por Kalbak, que pueden ser macrométodo y/o micrométodos de acuerdo a las necesidades del Laboratorio. En este estudio se realizó la prueba con un macrométodo. (3)

OBJETIVOS

I. Objetivo general:

Seleccionar un método que nos permita evaluar el correcto fraccionamiento de la inmunoglobulina humana normal, mediante la cuantificación de su actividad, empleando una técnica "in vitro".

II. Objetivos subordinados:

- a) Determinar la correlación existente entre la prueba "in vitro" y una prueba "in vivo" empleada para la cuantificación de antitoxina tetánica en la inmunoglobulina humana normal.
- b) Establecer y efectuar la técnica para la cuantificación de antiestreptolisina O en unidades internacionales, en la inmunoglobulina humana normal.

III. Objetivos colaterales:

- a) Comparar la calidad de la Inmunoglobulina humana normal que es producida por varios laboratorios.
- b) De acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, sugerir límites mínimos de actividad para los anticuerpos elegidos, en la inmunoglobulina humana normal.

M E T O D O L O G I A

Para la cuantificación de antitoxina tetánica se comparó la técnica de hemaglutinación pasiva, prueba "in vitro", con la técnica de seroneutralización en ratón, prueba "in vivo" (método oficial) (5).

I. Cuantificación de Antitoxina Tetánica.

a) Método de seroneutralización en ratón (SNR).

Para utilizar este método es necesario primeramente, titular la toxina tetánica que se usa como patrón en pruebas posteriores, con una antitoxina tetánica estándar.

1. a) Titulación de toxina tetánica en L+/10/50

La dosis L+/10/50 de una toxina tetánica es una unidad de combinación que consiste en la mínima cantidad de toxina que al ser mezclada con 0.1 UI de antitoxina tetánica es neutralizada parcialmente quedando suficiente toxina libre para matar el 50% de un grupo de seis ratones, de 15 a 17 gramos de peso inoculados por vía subcutánea, en un período de 4 a 5 días.

1.1. a) Material y reactivos.

Ratones N: NIH (SW), de 15 a 17 gramos de peso.

Estándar Nacional de Antitoxina Tetánica (5 UI/mL)

Toxina tetánica

Solución estéril de peptona al 1%

Solución salina estéril

2.1. a) Procedimiento

Hacer cinco diluciones de la toxina en solución de peptona al 1% con un factor de dilución de 1.5. De cada dilución depositar 2 mL en cada uno de cinco tubos rotulados con el número de la dilución de prueba correspondiente. Agregar a cada uno 0.8 mL de antitoxina estándar diluida en solución salina a 1.0 UI/mL; y ajustar el volumen de los tubos a 4 mL con solución de peptona al 1%. Mezclar e incubar a temperatura ambiente protegidos de la luz durante una hora. Transcurrida la incubación inocular por vía subcutánea, cinco grupos de seis ratones, a cada ratón se le administra 0.5 mL de la mezcla correspondiente. Observar a los animales por cinco días, efectuar la lectura cada 24 horas, considerando la hora de inoculación. Registrar la muerte diariamente.

3.1. a) Interpretación

Aquella dilución de la toxina que mezclada con 0.8 UIA cause la muerte de 3 ratones, entre el 4° y 5° días posteriores a la inoculación, contendrá 4 L+/10/50.

b) Determinación de la potencia de antitoxina tetánica contenida en la inmunoglobulina humana normal.

Para evaluar la antitoxina tetánica contenida en la inmunoglobulina humana normal es necesario diluirla, ya que de acuerdo a las especificaciones de producción y de la OMS su contenido de anticuerpos se encuentra 10 veces más concentrado que en un suero normal. Para dar un resultado más exacto es necesario

hacer dos pruebas: la prueba preliminar en la que el factor de dilución es grueso, y solo nos da una idea de cual es la dilución más apropiada para trabajar en la prueba definitiva. En esta última el factor de dilución es fino, el porcentaje de diferencia entre una y otra dilución es del 10%.

1.b) Procedimiento

1.1. b) Prueba preliminar

Preparar una serie de diluciones en solución salina, de la inmunoglobulina humana problema con un factor de dilución de 2. Por otra parte, diluir la toxina tetánica en solución de peptona al 1% para obtener 4 L+/10/50. Depositar en cada uno de cinco tubos rotulados, 0.8 mL de la dilución de antitoxina tetánica correspondiente; 1.2 mL de peptona al 1% y 2 mL de la dilución de toxina tetánica. Mezclar e incubar a temperatura ambiente protegidos de la luz durante una hora. Transcurrido el tiempo de incubación, inocular por vía subcutánea cinco de seis ratones, a cada ratón administrar 0.5 mL de la mezcla correspondiente, observar a los animales por cinco días. Registrar la muerte diariamente y efectuar la lectura cada 24 horas, considerando la hora de inoculación.

Interpretación

Aquella dilución de la inmunoglobulina que en la mezcla respectiva, haya originado la muerte del 50% de los animales inoculados entre el 4º y 5º días posteriores a la inoculación, fue elegida para efectuar la prueba definitiva.

2.1 b) Prueba definitiva.

En esta prueba simultáneamente se verifica la dilución de la toxina tetánica utilizada y se cuantifica la antitoxina tetánica contenida en la inmunoglobulina humana normal.

Diluir la antitoxina tetánica estándar con solución salina a 1 UI/mL. Preparar en solución salina, la dilución de la inmunoglobulina problema elegida en la prueba preliminar. Diluir la toxina tetánica con solución de peptona al 1% para obtener 4 L+/10/50 y preparar la serie de tubos testigo y del problema como se indica en la tabla 1. Incubar todas las mezclas a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante una hora. de cada mezcla inyectar 0.5 mL a cada uno de seis ratones a 15 a 17 gramos por vía subcutánea. Observar durante 5 días, registrar la muerte diariamente, considerando la hora de inoculación.

Interpretación.

Calcular la dosis protectora para el 50% de los ratones inoculados (DP50), del estándar y la muestra problema por el método de Sperman-Karber. La cantidad de unidades internacionales por mililitro de inmunoglobulina se calculó con la fórmula:

$$\text{UI/mL} = \frac{\text{DP50 Estándar}}{\text{DP50 Problema}} \times \text{Dilución del problema}$$

TABLA I**Esquema para la determinación de potencia de antitoxina tetánica
(Prueba definitiva)**

Tubo	Toxina 4L+/10/50 (mL)	Estándar de Antitoxina* 1 UI/mL (mL)	Peptona al 1% (mL)
1	2.0	0.96	1.04
2	2.0	0.88	1.12
3	2.0	0.80	1.20
4	2.0	0.72	1.28
5	2.0	0.64	1.36

* La serie problema se prepara de la misma, pero se utiliza la dilución de inmunoglobulina elegida en la prueba preliminar, en vez del estándar de antitoxina tetánica.

c) Método de hemaglutinación pasiva (HA).

1. c) Sensibilización de eritrocitos humanos.

1.1. c) Material y reactivos.

Sangre humana tipo O Rh (+) de origen masculino.

Toxoide tetánico con una concentración mínima de 2400 Lf/mL (dializado por 24 horas contra solución salina).

Albúmina humana comercial (solución al 25%)

Solución salina estéril.

Solución de cloruro crómico al 0.1% en agua.

2.1 c) Procedimiento

Rotular dos tubos uno como sensibilizados y otro como blanco. Depositar en cada tubo 1 mL de albúmina al 2.5% y 0.6 mL de cloruro crómico al 0.1%. Al tubo etiquetado como sensibilizados adicionar 0.6 mL de toxoide tetánico con un título de 2400 Lf/mL y al tubo etiquetado como blanco 0.6 mL de solución salina. Finalmente a cada tubo adicionar 0.2 mL del paquete de eritrocitos lavados, una vez con solución salina. Mezclar suavemente e incubar por 13 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo mezclar nuevamente los tubos centrifugar por 3 minutos a 3000 rpm, eliminar el sobrenadante y preparar por separado suspensiones al 2.5% tanto de los eritrocitos sensibilizados como de los blanco, en solución salina.

2. c) Reacción de hemaglutinación.

2.2. c) Procedimiento.

Preparar una dilución 1:100 de la inmunoglobulina problema en solución salina, a partir de esta hacer cinco diluciones posteriores con un factor de dilución de 2. Depositar por duplicado en los pozos de la placa 0.025 mL de cada una de las diluciones. Añadir a cada pozo de una serie de diluciones (serie problema), 0.025 mL de la suspensión de eritrocitos sensibilizados, y a cada uno de los pozos de la otra serie (serie testigo), 0.025 mL de la suspensión de eritrocitos blanco. Preparar en la misma placa los siguientes testigos de reactivo. Depositar en 4 pozos de la placa 0.025 mL de solución salina, en otros cuatro pozos 0.025 mL de albúmina al 2.5%, agregar a cada uno de los últimos 8 pozos 0.025 mL de la suspensión de eritrocitos sensibilizados. Siguiendo el procedimiento indicado preparar dos testigos más, pero usando los eritrocitos blanco. Agitar suavemente las mezclas, golpeando el canto de la placa con los dedos, hasta que la suspensión sea homogénea, dejar la placa en reposo a temperatura ambiente por 45 a 60 minutos.

2.2. c) Lectura de la prueba.

La placa se lee como:

Carpeta o red: Hemaglutinación positiva (+)

Botón: Hemaglutinación negativa (-)

El título de la inmunoglobulina es el inverso de la máxima dilución donde se observa carpeta. Para que la prueba sea válida, en ninguno de los controles debe presentarse hemaglutinación.

3.2 c) Determinación de la potencia relativa de la inmunoglobulina.

Una vez establecido el título de la inmunoglobulina, calcular su potencia relativa, empleando como referencia el título de la inmunoglobulina estándar obtenido en paralelo bajo las mismas condiciones de prueba.

A la inmunoglobulina estándar se le asignó un valor en UI/mL por prueba de seroneutralización en ratón, por quintuplicado.

Para obtener el contenido de antitoxina tetánica en el problema, expresado en Unidades Internacionales, se utiliza la siguiente relación:

$$\text{UI/mL} = \frac{\text{Título del problema en HA}}{\text{Título del estándar en HA}} \times \text{UI/mL del estándar}$$

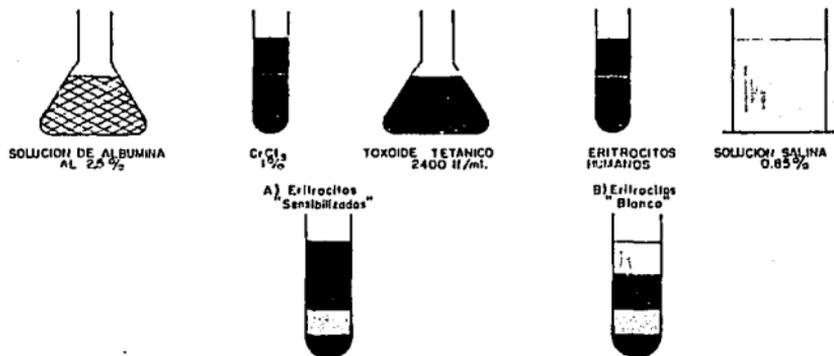
UI/mL = Unidades Internacionales por mililitro.

Observar cuadro I.

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION

(CUADRO 1)

I.- SENSIBILIZACION DE ERITROCITOS HUMANOS Rh(+) DE ORIGEN MASCULINO.



II.- REACCION DE HEMAGLUTINACION.

a) Diluciones consecutivas de la inmunoglobulina en solución salina desde 1:100, 1:200,, 1:1100.

b) Suspensiones de eritrocitos "sensibilizados" y "blanco" al 2.5 % en solución salina.

De cada dilución de inmunoglobulina 0.025 ml. en cada paso.

+

Suspensión de Eritrocitos 2.5 % 0.025 ml. en cada paso.

III.- LECTURA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Control (+)														A
Control (-)														B
Problema														C
Control (-) Albúmina														D
Control (-) solución salina														E

II. Antiestreptolisina O.

a) Ajuste del volumen de estreptolisina O.

1. a) Material y reactivos

Sangre desfibrinada de conejo.

Estándar Internacional de Antiestreptolisina O
(10 UI/mL).

Estreptolisina comercial (Beli).

Solución amortiguadora salina pH 6.5 - 6.7

Solución salina estéril.

Agua destilada estéril.

2. a) Procedimiento

Diluir con agua destilada estéril el estándar internacional de antiestreptolisina O para obtener una concentración de 1 UI/mL. Reconstituir el liofilizado de estreptolisina O con 5 mL de agua destilada estéril. Depositar en cada uno de los tubos numerados, las soluciones en el orden y cantidad que marca la tabla II.

TABLA II

Ajuste del volumen de estreptolisina O.

Tubo No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
St. (mL)	1.0	0.8	0.63	0.5	0.4	0.32	0.25	0.2	-	--
Sol. A	0.9	1.1	1.37	1.4	1.5	1.58	1.65	1.7	1.9	2.0
Estrep (mL)	0.1	0.1	0.10	0.1	0.1	0.10	0.10	0.1	0.1	--

St. Estándar Internacional de antiestreptolisina O.

Sol. A Solución amortiguadora salina pH 6.5 - 6.7

Estrep. Estreptolisina O reconstituida

Posteriormente agitar suavemente los tubos e incubar por 15 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo adicionar a cada tubo 0.5 mL de una suspensión de eritrocitos de conejo al 5% en solución amortiguadora. Agitar nuevamente los tubos e incubar por 45 minutos a 37°C. Agitar los tubos regularmente cada 15 minutos. Al cabo del tiempo de incubación retirar los tubos del baño María, centrifugar por un minuto a 3000 rpm y observar.

3. a) Interpretación

El punto de neutralización es el tubo donde se observe la hemólisis al 50%. Reportar la lectura como 0 cuando no exista hemólisis; como p cuando exista hemólisis parcial y como t cuando se observe hemólisis total⁽²⁶⁾.

De manera semejante, preparar cuatro series más, modificando en cada una el volumen de estreptolisina O. Utilizar los siguientes volúmenes: 0.15, 0.20, 0.25 y 0.30 mL; modificar también el volumen de solución amortiguadora, de manera que después de la adición de estreptolisina O, el volumen de cada uno de los tubos sea de 2 mL. Realizar por duplicado cada una de las cinco series.

b) Titulación de antiestreptolisina O en la inmunoglobulina humana normal.

1. b) Procedimiento

Diluir la inmunoglobulina humana normal en proporción 1:100 con solución amortiguadora. Diluir el estándar internacional de antiestreptolisina O para obtener una concentración de 1 UI/mL. Depositar en cada uno de 7 tubos numerados, las soluciones en el orden y cantidad que marca la tabla III.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ajuste del volumen de estreptolisina O, encontramos que 0.25 mL era el volumen adecuado para neutralizar parcialmente 0.5 UI de antiestreptolisina O, por lo que se adiciona a cada tubo 0.25 mL de estreptolisina O (reconstituida con 5 mL de agua destilada estéril). Agitar los tubos suavemente e incubar por 15 minutos a 37°C. Finalmente añadir a cada tubo 0.5 mL de una suspensión de eritrocitos de conejo al 5% en solución amortiguadora. Agitar los tubos e incubar por 45 minutos a 37°C. Agitar los tubos regularmente cada 15 minutos. Al cabo del tiempo de incubación retirar los tubos del baño, centrifugar los tubos por un minuto a 3000 rpm y tomar la lectura. Simultáneamente realizar una prueba con el estándar internacional de antiestreptolisina O, utilizando la serie señalada en el ajuste de estreptolisina O.

TABLA III
Titulación de antiestreptolisina O

Tubo No.	1	2	3	4	5	6	7
Dig. (mL)	1.0	0.5	0.25	0.125	0.063	0.025	-
Sol. A	0.75	1.25	1.50	1.625	1.687	1.75	2.0

Dig. Dilución de la inmunoglobulina humana normal problema.

Sol. A Solución amortiguadora pH 6.5 - 6.7

2. b) Interpretación

Para determinar las unidades internacionales de antiestreptolisina O que contiene la inmunoglobulina humana normal, se identifica el par de tubos en ambas series que presenten la hemólisis parcial próximo al 50%, semejantes en la coloración de sus sobrenadantes y tamaño de botón (sedimento); después multiplicar las unidades internacionales que contiene el tubo de la serie estándar por el factor de dilución de la serie problema.

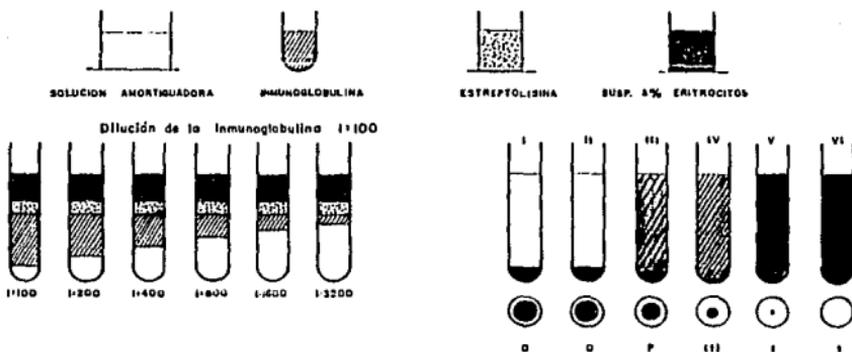
Observe el cuadro número II.

PRUEBA DE ANTIESTREPTOLISINA

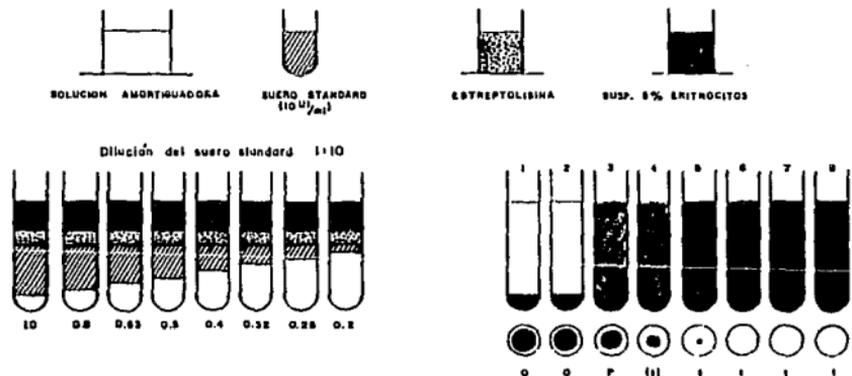
(CUADRO II)

Volumen de Estreptolisina 0.25 ml.

I.- TITULACION DE LA INMUNOGLOBULINA HUMANA NORMAL



II.- TITULACION DEL SUERO ESTANDAR



HÉMOLISIS TUBO N° IV HÉMOLISIS TUBO N° 4 + 800 XOS VE + 400 UI

R E S U L T A D O S

Para comparar el método de SNR con el método de HA se analizaron 25 inmunoglobulinas humanas normales comerciales distintas, producidas por 4 diferentes laboratorios: A, B, C y D.

La tabla IV nos muestra los resultados de la valoración de antitoxina tetánica, utilizando los métodos de HA y SNR. Como se observa se analizaron un mayor número de inmunoglobulinas del laboratorio A debido a que su producción es más frecuente.

Con base en lo que varios autores han informado, se trazó la recta de mejor ajuste que relaciona el logaritmo de las unidades internacionales (UI) obtenidas por SNR con las unidades internacionales obtenidas por HA (Gráfica I). El coeficiente de determinación ($r^2 = 0.58$) fue menor que el obtenido cuando se graficó la recta de regresión de las unidades sin transformar (Gráfica II, $r^2 = 0.69$), por lo que se decidió para los cálculos subsecuentes esta última relación.

Como se observa en la Gráfica II, hay una mayor dispersión de los datos a valores bajos de UI y su distribución no es homogénea; por lo tanto se graficó la diferencia entre las unidades obtenidas por ambos métodos contra las UI valoradas por SNR, y para omitir todo tipo de variables que no fueran exclusivamente las de la técnica, se estudiaron solamente los resultados del laboratorio A (Tabla V y Gráfica III).

Por otra parte, para establecer el método de Antiestreptolisina O, es necesario determinar primero el volumen de estreptolisina que neutraliza parcialmente 0.5 UI de antiestreptolisina O. En la tabla VI se presentan los resultados del ajuste del volumen de estreptolisina O. Como se observa 0.25 mL es el volumen adecuado, para cuantificar las inmunoglobulinas humanas normales, en una prueba en paralelo con el estándar de antiestreptolisina O.

Se analizaron 21 inmunoglobulinas humanas comerciales, en la tabla VII se presentan los resultados. También por este método se analizó un mayor número de inmunoglobulina producidas por el laboratorio A.

Para establecer los límites más adecuados para la actividad de la antitoxina tetánica de la inmunoglobulina humana, se trazó el histograma de frecuencias (Gráfica IV). Asimismo, se trazó el histograma de frecuencias de la actividad de la antiestreptolisina O (Gráfica V).

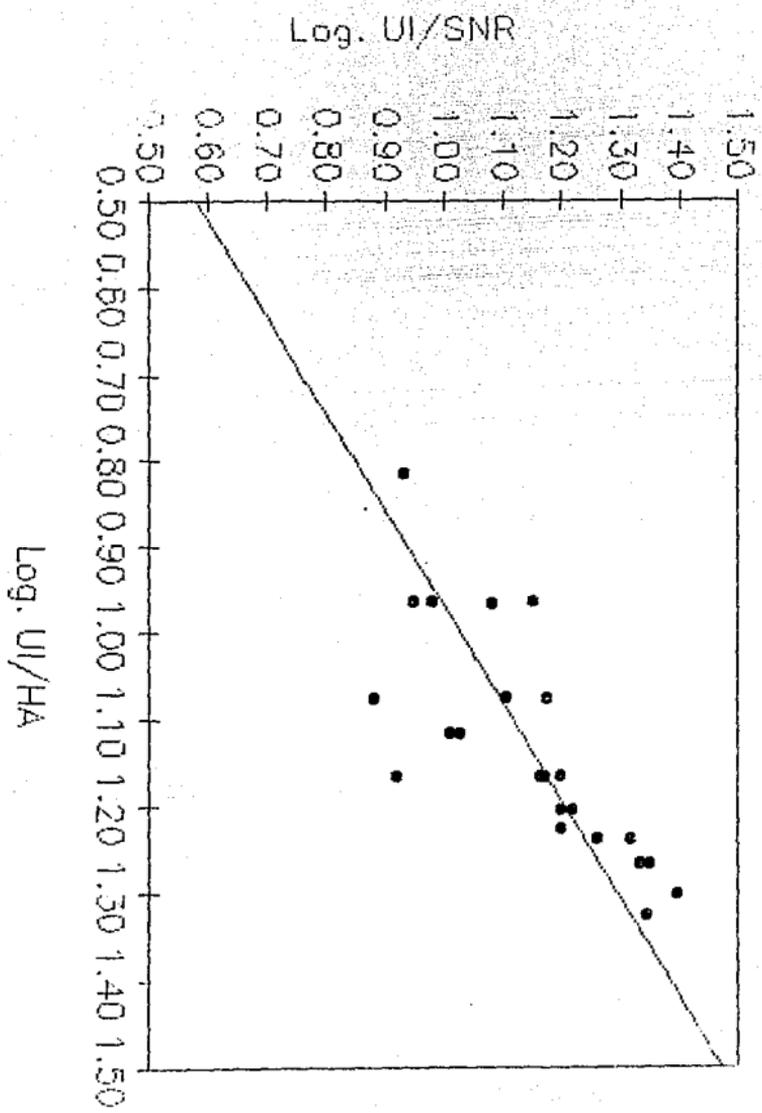
T A B L A IV

COMPARACION ENTRE LOS RESULTADOS DE HEMAGLUTINACION PASIVA Y SERONEUTRALIZACION EN RATON.

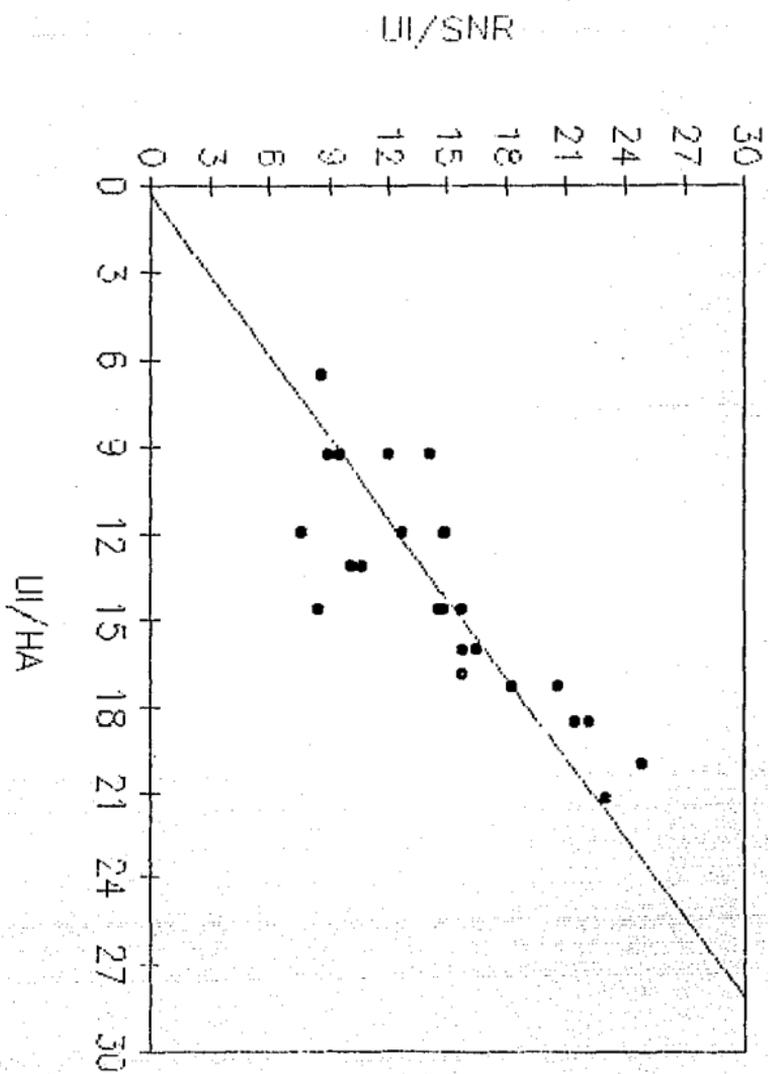
Número	UI por SNR	UI por HA	Laboratorio
1	7.65	11.935	A
2	8.38	14.631	A
3	8.55	06.541	B
4	8.86	09.238	B
5	9.53	09.238	D
6	10.03	13.083	D
7	10.61	13.083	A
8	12.03	09.238	C
9	12.70	11.935	C
10	14.17	09.238	C
11	14.61	14.631	A
12	14.85	14.361	C
13	14.85	11.935	C
14	15.00	11.935	A
15	15.82	16.870	A
16	15.82	14.631	A
17	15.84	16.020	A
18	16.55	16.020	A
19	18.25	17.301	A
20	20.54	17.301	A
21	21.46	18.476	A
22	22.17	18.503	A
23	22.90	21.200	A
24	24.77	19.971	A
25 *	21.20	-----	A

* Inmunoglobulina humana normal, valorada cinco veces por el método de seroneutralización en ratón, utilizada como estándar en la prueba de hemaglutinación pasiva.

GRAFICA 1
LOG. UI/SNR CONTRA LOG. UI/HA



GRAFICA II
UI/SNR CONTRA UI/HA



T A B L A V
DIFERENCIA ENTRE LOS VALORES DE HA Y SNR DE LAS
***IGHN PRODUCIDAS EN EL LABORATORIO A.**

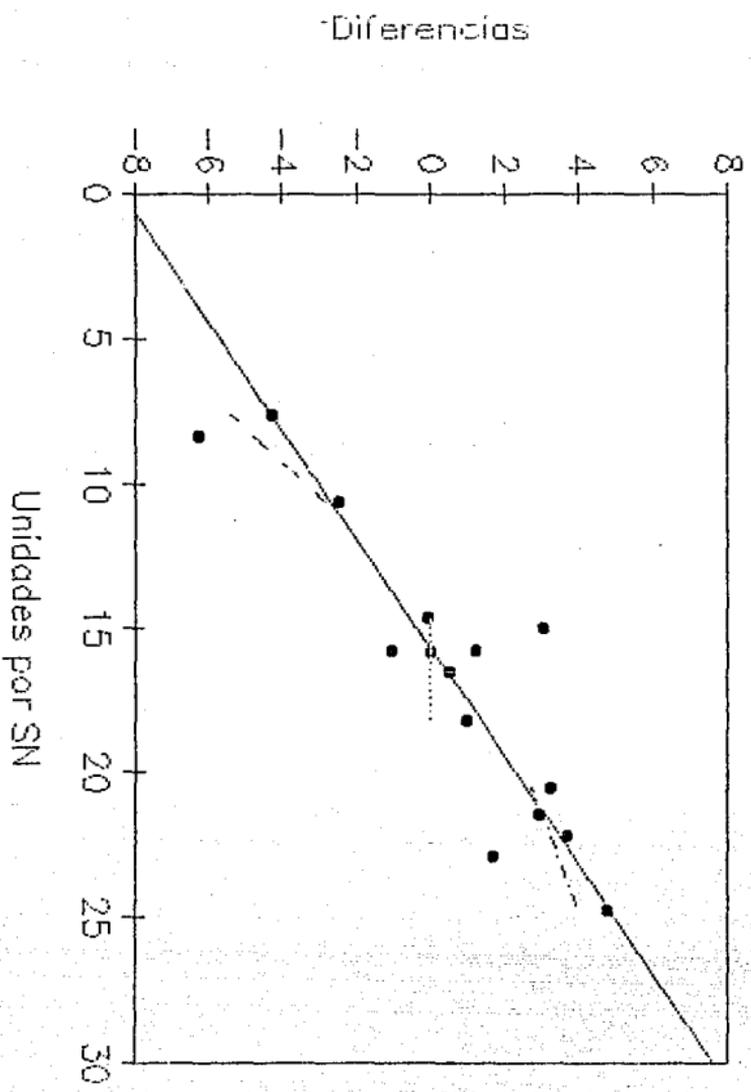
** Número	Diferencia	UI por SNR
1	-4.285	7.65
2	-6.251	8.38
7	-2.473	10.61
11	-0.021	14.61
14	3.065	15.00
15	-1.050	15.82
16	1.180	15.82
17	-0.018	15.84
18	0.530	16.55
19	0.949	18.25
20	3.230	20.54
21	2.948	21.46
22	2.948	22.17
23	1.700	22.90
24	4.799	24.77

* Inmunoglobulinas humanas normales.

** Se conserva la numeración de la tabla IV.

GRAFICA III

DIFERENCIAS ENTRE UI/SN Y UI/HA
EN FUNCION DE UI/SN



T A B L A VI
AJUSTE DEL VOLUMEN DE ESTREPTOLISINA O
CURVAS DE ANTIESTREPTOLISINA O ESTANDAR.

Estreptolisina (ml)	Unidades Internacionales de antiestreptolisina por tubo.							
	1.0	0.8	0.63	0.5	0.4	0.32	0.25	0.2
0.10	O	O	O	O	O	O	p	t
0.15	O	O	O	O	O	p	t	t
0.20	O	O	O	O	p	t	t	t
* 0.25	O	O	O	p	t	t	t	t
0.30	O	O	p	t	t	t	t	t

* El volumen de 0.25 ml de estreptolisina O comercial es el que neutraliza parcialmente 0.5 UI de antiestreptolisina O , por lo que se utilizó en la prueba de cuantificación.

O .- No se observa hemólisis.

p .- Hemólisis parcial.

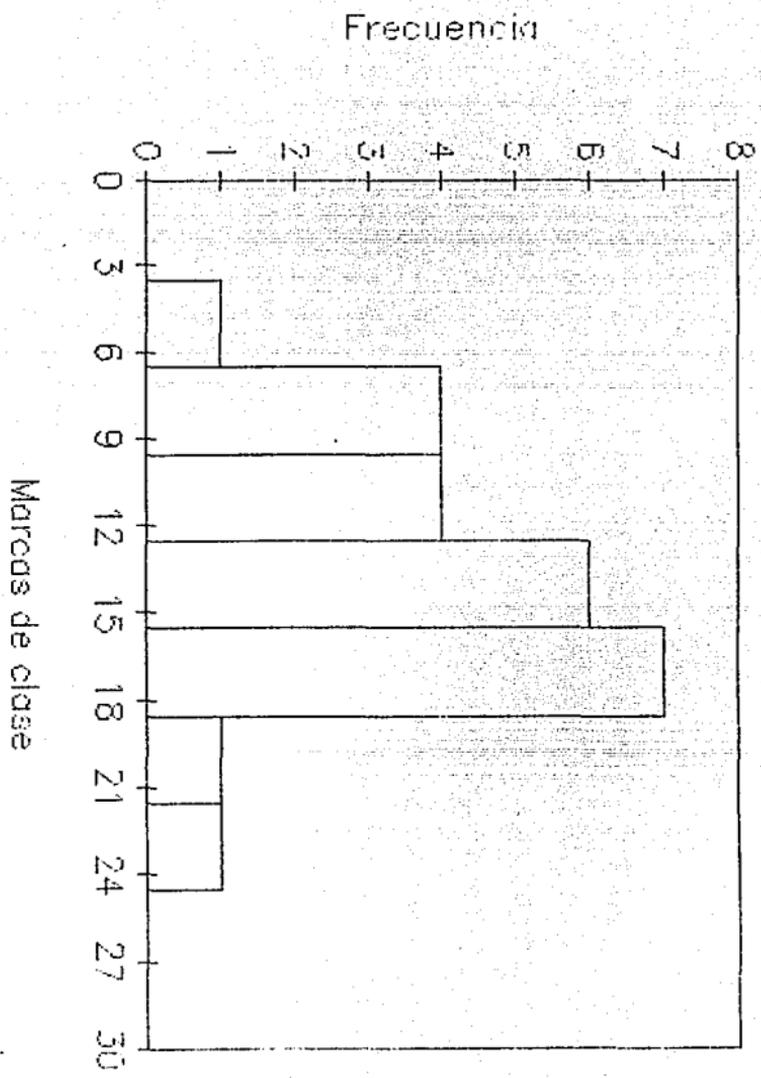
t .- Hemólisis total.

T A B L A V I I
 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ANTIESTREPTOLISINA O .

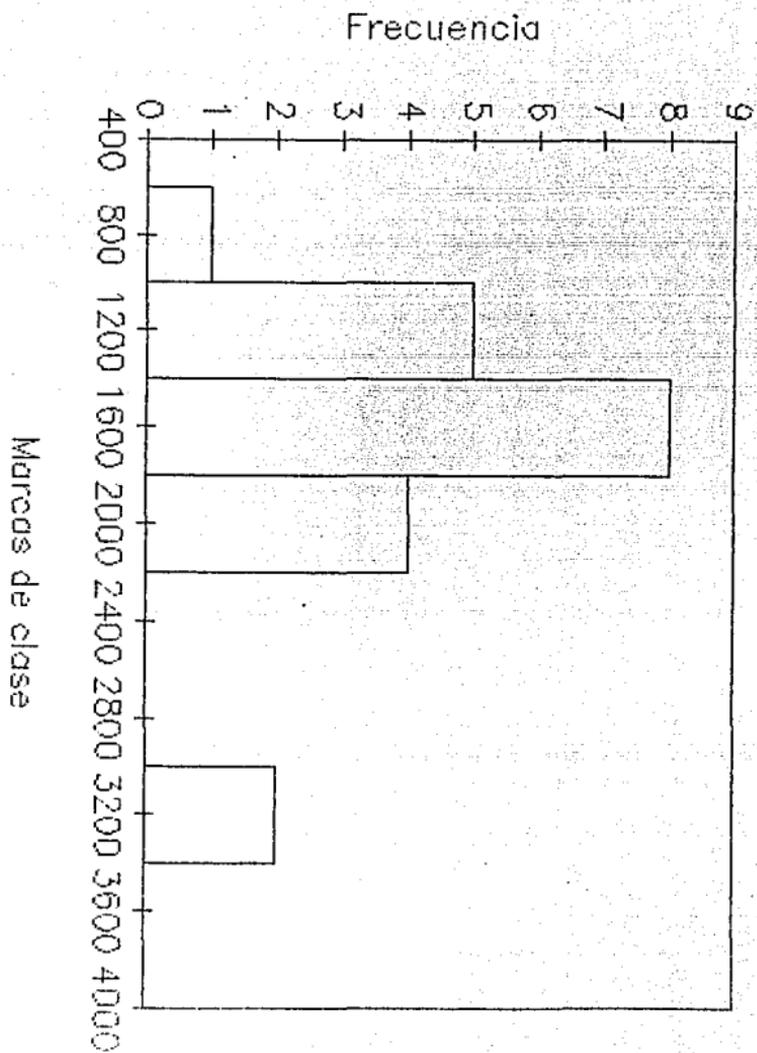
Número	* U I A	Laboratorio
1	800	A
2	1280	A
3	1280	D
4	1280	A
5	1280	C
6	1280	A
7	1600	D
8	1600	B
9	1600	A
10	1600	A
11	1600	B
12	1600	A
13	1600	A
14	1600	B
15	2000	A
16	2000	A
17	2000	A
18	2000	A
19	2000	A
20	3200	A
21	3200	A

* Unidades Internacionales de Antiestreptolisina O .

GRAFICA IV
LJA OBTENIDAS POR HA



GRAFICA V
UI DE ANTIESTREPTOLISINA "O"



D I S C U S I O N

La necesidad de sustituir las técnicas de seroneutralización en animales para la valoración del contenido de antitoxina de las preparaciones de IHN (Inmunoglobulina Humana Normal), por una técnica más rápida y económica, nos motivó a realizar estudios comparativos entre la técnica de referencia, SNR a un nivel L+/10/50 de toxina), con la técnica de HA. Asimismo, se decidió explorar la posibilidad de utilizar como una técnica alternativa para la evaluación de la calidad de la IHN, la determinación de la antiestreptolisina O, ya que la OMS hace referencia a la determinación con este propósito, de un anticuerpo para el que exista un patrón internacional y en consecuencia, para el que se hayan definido unidades internacionales.

a) Para la técnica de hemaglutinación pasiva (HA), se eligió como agente acoplante el CrCl_3 , que une al antígeno con la superficie del eritrocito, probablemente a través de un enlace covalente, que es más fuerte que los obtenidos con otras sustancias y evitando también la desventaja que representa la autoaglutinabilidad impredecible debida al uso del ácido tánico y la formalina⁽³¹⁾.

Sin embargo, de acuerdo con nuestra opinión y la de varios autores⁽³¹⁾, la técnica se ve afectada por múltiples variables⁽²⁴⁾ :

a) El cloruro crómico debe protegerse de la humedad ambiental, ya que es muy higroscópico⁽³¹⁾.

b) La concentración de la solución de albúmina parece ser crítica en el proceso de sensibilización de los eritrocitos; cuando la concentración es mayor, no se lleva a cabo la reacción de hemaglutinación; por el contrario, cuando la concentración es menor, se presenta hemaglutinación inespecífica⁽¹²⁾.

c) Los eritrocitos humanos O Rh (+) de origen masculino resultan ser los más apropiados; con los eritrocitos O Rh (+) de origen femenino no hubo reacción de hemaglutinación cuando fueron sensibilizados.

d) El toxoide tetánico debe tener una concentración no menor de 2400 Lf/mL, pues con concentraciones menores no hay reacción de hemaglutinación; no parece haber relación entre una concentración mayor de toxoide y una mejor hemaglutinación⁽³¹⁾.

e) La pureza del toxoide es importante. El contenido de sales u otras sustancias de bajo peso molecular influye de manera determinante en la reacción de hemaglutinación; en consecuencia, es necesario dializarlo por 24 h. para obtener buenos resultados. Una vez dializado, el toxoide es estable por varios meses⁽²⁶⁾.

f) El tiempo de sensibilización de los eritrocitos es estricto. Tiempos más largos o más cortos del señalado, afectan a la reacción⁽³¹⁾

g) Todos los reactivos deben ser preparados el mismo día en que se realiza la prueba. El cloruro crómico es estable a la concentración indicada por una hora.

Estudios de varios autores han tenido la pretensión de establecer el grado de correlación entre las técnicas de SNR y HA, siendo los resultados variables; sin embargo, queda claro en un artículo de Rey en que se resumen siete investigaciones de éste tipo, que la correlación tiende a aumentar conforme se incrementa el contenido de antitoxina del suero en estudio⁽²⁴⁾.

Nuestros resultados son consistentes con los informados con Rey⁽¹⁾, ya que la correlación mejora a partir de aproximadamente 14 UI ($r^2 = 0.769$; $n = 14$ datos a 14.61) con respecto a todos los datos ($r^2 = 0.69$).

Cuando se grafican las diferencias entre las unidades obtenidas por ambos procedimientos contra las unidades obtenidas por SNR (Tabla V y Gráfica III), observamos que el coeficiente de determinación es más elevado que cualquiera de los anteriores ($r^2 = 0.8054$), lo que no debería ocurrir si las técnicas fueran equivalentes. Al analizar las diferencias en su conjunto, se observan tres zonas definidas: una en la cual las diferencias son negativas ($\bar{x} = 4.336$); otra en la cual las diferencias son positivas pero pequeñas ($\bar{x} = 0.66$) y una en la cual las diferencias son positivas ($\bar{x} = 3.268$).

La correlación es baja ($r^2 = 0.4979$) entre las diferencias negativas y los valores de referencia, y lo mismo sucede con las diferencias positivas y los valores de referencia ($r^2 = 0.1878$); sin embargo, es casi nula para la zona de diferencias pequeñas, lo que apoya la sugerencia de que las técnicas son equivalentes al analizar sueros que contengan entre 14.6 y 18.25 UI/mL de antitoxina tetánica.

Para valores mayores de 18 UI, aunque la correlación es baja ($r^2 = 0.5512$), se observa proporcionalidad directa entre los resultados obtenidos por ambas técnicas.

Uno de los objetivos que originalmente nos planteamos fue el de sugerir un límite de actividad para la antitoxina tetánica en la IHN.

La OMS recomienda que el contenido de anticuerpos de la IHN debe ser por lo menos 10 veces mayor que la del suero original; sin embargo, durante el desarrollo del trabajo, nos fue imposible obtener plasma de origen para verificar si los productos estudiados cumplían con esta recomendación. Por tal motivo, se decidió hacer el estudio estadístico de la muestra y determinar los límites con el 95% de confiabilidad.

Al observar el histograma de frecuencias del contenido, en UI de antitoxina tetánica de las IHN producidas por todos los fabricantes nacionales, parece que se distribuye normalmente (Gráfica IV). En consecuencia, juzgamos legítimo proponer un límite mínimo para el contenido de antitoxina de estos productos, equivalente al límite inferior de $2s$, lo que corresponde aproximadamente a 5 UI/mL.

b) La técnica de antiestreptolisina O que se utilizó para analizar la IHN fue la de actividad relativa establecida por Kalbak en 1947, la cual titula la antiestreptolisina O en relación a un patrón valorado en UI⁽¹⁵⁾.

Esta técnica es sencilla y rápida ; sin embargo presenta las siguientes fuentes de error :

1. El pipeteo, ya que los volúmenes que se manejan son pequeños.
2. Los glóbulos rojos deben ser frescos, de no más de una semana de extraídos.
3. La dificultad para leer el grado de hemólisis para establecer la equivalencia entre el patrón y la muestra, de ahí la necesidad de centrifugar, con el fin de observar mejor el punto al 50%.

La técnica de Kalbak fue diseñada para analizar sueros de pacientes sospechosos de infección con estreptococo, los cuales de manera general contienen pocas unidades de antiestreptolisina O⁽¹⁵⁾.

Considerando que el contenido de antiestreptolisina O es elevado en la IHN, la dilución final a la que fue sujeta la muestra fue grande, y ya que conforme la dilución se incrementa disminuye la exactitud en la estimación del punto final, no podemos informar valores exactos de actividad de antiestreptolisina O y sólo pudimos dar valores aproximados. Sin embargo, los datos obtenidos nos dan una idea, de la calidad de la IHN producida en el país a nivel industrial. Como se observa en la Tabla VI y en el histograma (Gráfica V), los resultados parecen seguir la distribución normal con sesgo derecho, no muy bien definidos, por lo que se decidió recurrir al cálculo de los porcentajes acumulados para sugerir un límite mínimo de actividad. De esta manera se observa que el 96% de las IHN contienen más de 1000 UI/mL, lo que puede constituir un límite razonable.

CONCLUSIONES

1.- La técnica de Hemaglutinación pasiva es un procedimiento poco reproducible y laborioso. Ya que requiere del cuidado de múltiples factores para su correcta realización. Además, el coeficiente de determinación con seroneutralización es bajo ($r^2 = 0.6900$), por lo que no es apropiada, en las condiciones en las que se trató de estandarizar la técnica, para utilizarla como una prueba de rutina para evaluar la actividad de la inmunoglobulina.

2.- La técnica de antiestreptolisina O en UI/ml, es sencilla y rápida pero, para el caso de la inmunoglobulina humana normal, los resultados no son exactos. Ya que el factor de dilución es grande; por lo que se sugiere ajustar el factor de dilución, para aumentar la sensibilidad de la técnica.

Sin embargo, podemos decir, que la técnica más apropiada, bajo nuestras condiciones, para evaluar la inmunoglobulina humana normal es esta última. Ya que es reproducible y precisa. Siendo necesario estandarizarla y validarla.

3.- Los límites de actividad que se sugieren para los anticuerpos señalados son: no menos de 5 UI/ml para antitoxina tétanica y no menos de 1000 UI/ml para antiestreptolisina O.

4.- De acuerdo a los resultados el contenido de anticuerpos de las inmunoglobulinas producidas por diferentes laboratorios sigue un comportamiento normal. Desafortunadamente no se pudo conseguir plasma de origen para verificar la decuplicación de la concentración; sin

embargo podemos hacer la siguiente estimación:

Si consideramos que clínicamente 250 U Todd de antiestreptolisina se consideran como indicio de infección (32); que los últimos valores no patológicos en la escala de Todd son 125 y 166U y que la diferencia entre unidades Todd y UI es de aproximadamente 4.5 % (26). Se puede decir que el plasma de origen, es en promedio, concentrado de 8 a 10 veces. Hay que aclarar que esta consideración debe ser sujeta a una comprobación.

A P E N D I C E I

Preparación de reactivos.

1. Solución estéril de peptona al 1%. Pesar un gramo de peptona, disolver en agua destilada, aforar a un volumen de 100 mL. Filtrar la solución y esterilizar en el autoclave a 121°C por 15 minutos. Almacenarla a temperatura ambiente.

2. Solución salina estéril. Pesar 8.5 gramos de cloruro de sodio, disolver en agua destilada aforar a 1000 mL. Filtrar la solución y esterilizarla en autoclave a 121°C por 15 minutos. Almacenarla a temperatura ambiente.

3. Solución amortiguadora salina pH 6.5 - 6.7. Pesar 7.4 gramos de cloruro de sodio, 3.7 gramos de fosfato monobásico de potasio y 1.9 gramos de fosfato dibásico de sodio y disolver en agua. Una vez ajustado el pH con solución 0.1 N de hidróxido de sodio, aforar a 1000 mL. Filtrar y almacenar a temperatura ambiente.

4. Solución de EDTA al 10%. Pesar 10 gramos de sal de EDTA (etilendiaminotetracetato de sodio, sal dibásica), disolver en agua y aforar a 100 mL. Conservar en refrigeración.

5. Solución de albúmina al 2.5% en solución salina. Tomar 1 mL de la solución comercial de albúmina humana al 25% y aforar con solución salina a 10 mL. Utilizarla durante el día de prueba.

6. Solución de cloruro crómico al 0.1% . Pesar 0.01682 gramos de cloruro crómico hexahidratado, disolver en solución salina y aforar a 10 mL. Se conserva a temperatura ambiente únicamente 30 minutos.

7. Eritrocitos humanos. Agregar a 3 mL de sangre (fresca y en la que se utilizó como anticoagulante EDTA), 5 mL de solución salina, mezclar y centrifugar durante un minuto a 3000 rpm descartar el sobrenadante y proceder a lavar el paquete globular con solución salina dos veces en proporción 1:5, centrifugando por el mismo tiempo y a la misma velocidad ya indicadas.

8. Suspensión de eritrocitos de conejo al 5% . Lavar los eritrocitos de conejo dos veces, en la forma indicada y una vez más con solución amortiguadora pH 6.5 - 6.7, en proporción 1:5 , centrifugar por 1 minuto a 3000 rpm. Eliminar el sobrenadante y con el paquete de eritrocitos preparar una suspensión al 5% v/v en solución amortiguadora.

A P E N D I C E II

Este espacio lo destinamos para presentar datos numéricos de diferentes gráficas.

Datos de correlación de la Gráfica III. (Diferencia entre UI/SN y UI/HA en función de UI/SN.

Intercepto a la ordenada	- 8.3662
Media	0.5325
Pendiente	0.5330
Coefficiente de correlación	0.8975
Coefficiente de determinación	0.80549

GRAFICA IV

Límites de clase del histograma de frecuencias de la UIA
(Unidades Internacionales de Antitoxina) obtenidas por HA.

Límite de clase (x)	Frecuencia (y)	Marca de clase
3.55 - 6.545	1	5.045
6.55 - 9.545	4	8.045
9.55 - 12.545	4	11.045
12.55 - 15.545	6	14.045
15.55 - 18.545	7	17.045
18.55 - 21.545	1	20.045
21.55 - 24.545	1	23.045

GRAFICA V

Límites y marcas de clase del histograma de frecuencias de la UI de Antiestreptolisina O.

Límite de clase (x)	Frecuencia (y)	Marca de clase
600.5 - 1000	1	800
1000.5 - 1400	5	1200
1400.5 - 1800	8	1600
1800.5 - 2200	4	2000
2200.5 - 2600	0	2400
2600.5 - 3000	0	2800
3000.5 - 3400	2	3200
3400.5 - 3800	0	3600

A N E X O I

ACTUALIZACION DE CONCEPTOS, NORMAS Y DATOS TECNICOS REFERENTES A LA PRODUCCION DE INMUNOGLOBULINAS HUMANAS NORMALES.

Justificación.

Este trabajo se realizó basandose en las normas y datos técnicos publicados hasta 1983, el trabajo experimental se terminó en 1985 y la organización y conformación del reporte se terminó en 1986. Por diversas causas personales no se presentó a la FES-Cuautitlan UNAM.

Al presentar este trabajo en 1992, es necesario, actualizar los conceptos y normas Internacionales, ya que en el caso de los productos derivados de la sangre humana, la aparición del virus de Inmunodeficiencia Humana ha ocasionado la modificación de las mismas. Desde la recolección de la materia prima, hasta la distribución de los productos derivados de la sangre, los lineamientos son estrictos.

Es necesario hacer notar que los objetivos de este trabajo no han sido afectados; y que de los resultados del mismo, surgió la inquietud de estandarizar el método para evaluar en UI el Patrón Nacional de Antiestreptolisina O. Presentado por el Laboratorio Nacional de Salud Pública en 1987.(8)

A) Normas y Disposiciones Legales

En 1976 el grupo de trabajo de la WHO, consideró necesario elaborar los requerimientos internacionales para el procesamiento y control de la sangre humana y sus productos derivados.

Para 1978 se publicaron los Requerimientos de la Recolección, Procesamiento y Control de la Calidad de la sangre humana y productos derivados. (22)

En 1981 la WHO publica un boletín en donde señala detalladamente cada una de las fases que comprende el procesamiento y fraccionamiento de la sangre humana.

En 1986 la WHO hace denotar la necesidad de normalizar los servicios de transfusión sanguínea, debido a la aparición de frecuentes infecciones con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV). (21)

Para 1989 publica, la versión revisada de los requerimientos para la Recolección, Procesamiento y Control de Calidad de la sangre humana y sus productos derivados, señala que estos requerimientos tenían que ser actualizados en lo concerniente a la prueba de anticuerpos para el virus de inmunodeficiencia humana. (23)

La 5ª edición de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 1989, indica que los productos sanguíneos y los derivados del plasma o de placenta humanos de uso terapéutico, deberán ser analizados por metodología sensible, establecida y evaluada por las autoridades de salud correspondientes y que prueben que dichos no transmiten agentes infecciosos conocidos. (9) En el suplemento I de

de la FEUM hace mención que los productos deberán obtenerse de materias primas provenientes de donadores sanos, libres de agentes infecciosos tales como el virus de inmunodeficiencia humana y el virus de hepatitis B, entre otros, comprobados a través de las técnicas legales en uso.(29)

Para la producción de inmunoglobulinas, igual que para cualquier producto derivado de la sangre, es necesario cumplir con las normas de la OMS. Desde la colecta de la materia prima hasta la evaluación del producto terminado.

Los establecimientos donde se recolecta la sangre deben de cumplir con las normas de higiene, la persona responsable médico o equivalente debe de supervizar el proceso de recolección y el buen manejo de la sangre recolectada, (utilizar material esterilizado y de preferencia desechable).(23)

El donador de sangre tiene que se conciente de los riesgo que implica el serlo ; tanto para su salud como para la salud pública . Por lo que se sugiere se establezca un programa de selección y educación para el donador. Una vez seleccionado el donador es sujeto a control médico. Los monitoreos para la presencia de anticuerpos contra enfermedades infecciosas serán periódicos y en un lapso no menor de dos años anterior a la donación , deberá presentar pruebas negativas contra el virus del SIDA y la hepatitis B.(23)

En los laboratorios donde es recibida la sangre para su proceso será necesario hacerle pruebas de calidad antes del mismo;esterilidad, pruebas para agentes infecciosos y grupo sanguíneo. Después se

procede a la separación del paquete globular y del plasma.(23)

Para el caso de la producción de inmunoglobulinas se recomienda el proceso de fraccionamiento de Cohn ya que hay evidencias estadísticas que demuestran que el proceso inactiva agentes infecciosos, principalmente el virus de la hepatitis B y el retrovirus del SIDA. Este método se recomienda tanto para plasma como para placenta.(21) Todos los materiales usados en el fraccionamiento deben de someterse a pruebas de esterilidad, identidad, pureza, toxicidad y pirogenicidad de acuerdo a la farmacopea.(29)

Actualmente en el país, no se esta produciendo Inmunoglobulinas por ningún laboratorio privado. Solamente el Instituto Nacional de Higiene tiene una producción muy reducida.

De acuerdo a las recomendaciones de la OMS y la FEUM en los Laboratorios Nacionales de Salud Pública se hace el análisis fisicoquímico (identidad, esterilidad, toxicidad, pirogenicidad, pH , aditivos, humedad, inspección física, estabilidad, concentración de proteínas e inspección de contenedores), y de actividad biológica de las Inmunoglobulinas, estas pruebas son para producto terminado. En el Centro Nacional de Transfusión Sanguínea se hace el análisis de detección de anticuerpos contra SIDA , a granel y en producto terminado. La aprobación del producto terminado esta a cargo de ambas Instituciones y su distribución es restringida.

B.- Publicaciones Posteriores.(De 1984- 1990)

En 1984 publicó Michael Steinitz y Sara Tamir, un estudio

donde se comparan 3 diferentes formas de sensibilizar a los eritrocitos humanos utilizando como agente acoplante cloruro crómico. En el primer método los eritrocitos fueron tratados en la forma tradicional para el segundo y tercer método los eritrocitos fueron tratados previamente con glutaraldehído. En el segundo método los eritrocitos se acoplan, con cloruro crómico en solución salina y en el tercero los eritrocitos se acoplan en solución salina con deoxicolato de sodio al 0.3%.

La comparación de la preparaciones consiste en evaluar : 1) La concentración máxima de cloruro crómico utilizada en la sensibilización que permite acoplar al anticuerpo, sin que al hacer la reacción de hemaglutinación, presente aglutinación inespecífica; 2) La concentración mínima necesaria de anticuerpos que requiere cada método de sensibilización; 3) La sensibilidad que presentan los eritrocitos al mismo antígeno y 4) La cantidad de anticuerpos que es realmente es adsorbida por la superficie del eritrocito.

Las concentraciones de eritrocitos sensibilizados en presencia de deoxicolato de sodio, toleraron concentraciones hasta de 50 mM de cloruro crómico (sin que al hacer la reacción de hemaglutinación presentaran aglutinación inespecífica), en cambio en la sensibilización tradicional de los eritrocitos (eritrocitos nativos), a concentraciones mayores de 10 mM, se presenta aglutinación inespecífica.

La concentración mínima de anticuerpos que utilizaron para los eritrocitos sensibilizados con deoxicolato de sodio fue de 30 ug/ml, para los eritrocitos nativos por lo menos se necesito 500 ug/ml.

Comprueban por medio de una reacción de aglutinación residual, la cantidad de anticuerpos adsorbidos en la superficie del eritrocito al ser sensibilizado; Preparan eritrocitos sensibilizados, utilizando

anticuerpos contra los anticuerpos de las preparaciones originales y realizan la reacción de hemaglutinación, con el sobrenadante de las tres preparaciones de eritrocitos. Cuantifican y comparan la cantidad de eritrocitos que reaccionan en esta segunda prueba de aglutinación. Los resultados muestran que tanto los eritrocitos tratados con deoxicolato como los nativos adsorben la misma cantidad de anticuerpos. La diferencia en la reacción, es que los eritrocitos nativos no presentan una reacción franca con formación de rosqueta y existe aglutinación inespecífica; en los tratados con deoxicolato hay hemaglutinación específica con formación de rosqueta. La máxima sensibilidad la presentó la preparación de eritrocitos que se acopló en presencia de deoxicolato de sodio. (28)

En 1985 Terje E. Michalsen y Eva Haug, señalan que para las preparaciones de anticuerpos específicos para las subclases de IgG humana, es necesario la purificación por un proceso de adsorción cromatográfico en columna. Apoyándose en los resultados obtenidos con pruebas tan sensibles como son ELISA, Hemaglutinación e Inmuno-precipitación en gel. Los autores comparan en una forma semicuantitativa los resultados de las técnicas, las cuales son equivalentes. El punto al que ponen mayor énfasis es a la especificidad del antisuero frente a un suero problema. La única observación referente al método de hemaglutinación es que los eritrocitos fueron tratados con cloruro crómico utilizando el método de Gold y Fudenberg, 1967. 17

En el mismo año Lindsay J.M. y Jehanli AMT publicaron un estudio titulado "Una prueba de hemaglutinación pasiva para la detección de anticuerpos receptores de acetilcolina antinicotínicos." En este artículo comprueban el método de aglutinación presentado

por Steinitz y Tamir (1984), en donde utilizan una solución salina de detergente no iónico como medio para sensibilizar a los eritrocitos.

Lindsay y colaboradores purifican el receptor de acetilcolina (el cual va a ser acoplado a los eritrocitos de carnero por el método de Ling, 1977), por el método de cromatografía en columna, la elución del receptor se hace con una solución de detergente (Triton V-100), a una concentración de 0.1%. Posteriormente fue concentrado, esterilizado por filtración y conservado a -20°C . Antes de la sensibilización de los eritrocitos, el receptor es dializado frente a solución salina por 24 h.

Para la prueba de hemaglutinación los eritrocitos de carnero son lavados cinco veces con solución salina. Del paquete globular se toma 0.5 ml y se mezclan con 0.3 ml de la solución del receptor de acetilcolina, se agita con vortex y se mezcla con 0.3 ml de solución de CrCl_3 (0.1mg/ml), nuevamente se mezcla con vortex, se adiciona 2 ml de solución salina y se deja toda la noche a 4°C .

La prueba de hemaglutinación se realiza con 50 μl de las diluciones del suero hechas con buffer de Hepes más 25 μl de la suspensión de eritrocitos, se homogeniza e incuba de 2-4 h a 20°C . Como prueba complementaria se hizo, la prueba de hemaglutinación pero haciendo las diluciones con buffer salino de fosfatos que contenía 1 % de albumina bovina.

Paralelamente el efecto del detergente fue investigado. Se prepararon una serie de diluciones de Triton X-100 a partir de la solución al 1%, 50 μl de cada dilución se colocó en un pozo de la microplaca y se mezcló con 50 μl de la suspensión de eritrocitos se incubo 2 h a 20°C .

Los resultados muestran que el detergente lisa a las células en concentraciones 0.1%. Y que al purificar el receptor por dialisis frente a solución salina por 24 h se remueven los iones fosfato, que inhiben el acoplamiento con cloruro crómico; Así como también remueve el exceso de monómeros de detergente y no remueve las proteínas libres ni las micelas proteína-detergente formadas.

Los investigadores comparan la prueba de radioinmunoensayo con la hemaglutinación pasiva, encontrando una correlación aceptable entre ambas para el caso de los antisueros policlonales. En el caso de los sueros monoclonales hay anomalías, las cuales explican argumentando que generalmente los títulos bajos en anticuerpos policlonales son más bajos para los monoclonales, porque estos últimos tienen un solo determinante antigénico, por lo que la reacción es menos manifiesta.(18)

BIBLIOGRAFIA

1.- AHMED A. y colaboradores, 1980. An antibody assay in Shiga dysentery by microtiter passive haemagglutination using human erythrocytes and chromium chloride as coupling reagent Indian J. Med. Res . 71 : 12-21.

2.- BENENSON A.A. Shively J.N. y Vivona, 1963. Effect of irradiation and test system on development of tetanus antibody. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 112; 527-531.

3.- BIO-MERIEUX products et réactifs de laboratoire . Titulación de antiestreptolisina O .Macrométodo. Instructivo de uso del producto. Agosto 1985

4.- Cohn E.J. y colaboradores, 1946. Preparation and properties of serum and plasma proteins.IV. A system for the separation into-fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids J. Am.Chem.Soc. 68; 459-475

5.- OMS . OPS. SSA. Manual de laboratorio del II Curso Internacional sobre Productos y Control de Productos Biológicos. Prueba de titulación de antitoxina tetánica en L+/10. Pag.19-27. México ,1978.

6.- Dirección General de Laboratorios de Salud Pública . Informe de una reunión conjunta productores de Inmunoglobulina/ Laboratorio Nacional de Referencia. Feb. 1977. México, D.F.

7.- DUNCAN S. y Denmark U.R. 1978. Antibody to tetanus toxoid in South Australian children. Med. j. Aust . 2: 310-312.

8.- Laboratorios Nacionales de Salud Pública ,1987 . Patrón

Internacional de Antiestreptolisina O.

- 9.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. 5°ed. México 1990. pag.
- 10.- FUDENBERG H.H. y colaboradores. Inmunología Clínica, 3°ed. El Manual Moderno, México, D.F. 1982. Pags. 48, 381-384.
- 11.- GIONO C.S. y colaboradores, 1974. El estreptococo y la fiebre reumática. Rev. Lat. Amer. Microbiología, 16: 111-112.
- 12.- GOLD E.R. y Fundenberg, 1967. Cromic chloride: A coupling reagent for passive hemagglutination reactions. J. Immunol. 99: 859-866.
- 13.- GORDON J. y colaboradores, 1958. Detection of Non precipitating antibodies in sera of individuals allergic to ragweed pollen by an in vitro method. J. Exp. Med. 108: 37-51.
- 14.- HARDEGREE M.C. y colaboradores, 1970. Immunization against neonatal tetanus in New Guinea. Bull. Wld. Hlth. Org. 43: 461-468.
- 15.- KALBAK M. y colaboradores, 1981. The antistreptolysin reaction. The State Serum Institute, Denmark Copenhagen. (Instructivo de Lab.)
- 16.- KESKAR M. y colaboradores, 1981. Comparison between haemagglutination and toxin neutralization for estimation of tetanus antibodies. Indian J. Med. Res. 7: 74-76.
- 17.- LEHNINGER L.A. 1978. Bioquímica. Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular. Omega S.A. Barcelona. Pags. 161-185.
- 18.- LINDSAY J.M. Muir and Jehanli A.M.T. 1985. A passive haemagglutination test for the detection of anti-nicotinic acetylcholine receptor antibodies. J. Immunol. Met. 84: 155-163.
- 19.- MICHAELSEN Terje E. and Eva Haug. 1985 Human IgG Subclass-Specific rabbit antisera suitable for immunoprecipitation in gel, ELISA and multilayer haemagglutination technique. J. Immunol. Met. 84: 200-203.

- 20.- PEREZ de la Mora C. y colaboradores, 1983. Desarrollo de la producción de inmunoglobulinas humanas específicas. II Comparación de técnicas para titulación in vivo e in vitro de antitoxina tetánica. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 25: 213-220.
- 21.- Record Epidemiological Weekly, 1986. 61: 138-140.
- 22.- Reporte técnico de la OMS No. de Serie 626. Requerimientos para sustancias biológicas No. 27. 1978 .
- 23.- Reporte técnico de la OMS No. de Serie 786. Requerimientos para sustancias biológicas No. 27. 1989.
- 24.- REY M.R. y colaboradores, 1978. Le test d'hemagglutination pasive dans l'evaluation de l'immunité antitetanique. Develop. Biol. Standar. 41: 55-62 .
- 25.- OMS Serie de Informes técnicos No. 361. Anexo 2 Normas para la inmunoglobulina humana. Normas para las sustancias biológicas. No. 14 Ginebra, 1967.
- 26.- SPAUN J. y colaboradores, 1961. International Standard for Antistreptolisin O. Bull. Wid. Hlth Org. 24 : 271-279.
- 27.- STAVITSKY B.A. 1953 .Mícomethod for the study of proteins and antibodies. J. Immunol. 72: 360-367.
- 28.- Steinitz Michael and Sara Tamir, 1984. The coating erythrocytes whit detergent solubilized molecules :A general Method for Improved coupliny of antigens and antibodies. J. Immunol. Met. 76: 27-38.
- 29.- Suplemento I Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos S.S.A. 5º ed. México ,1990. pag. 1881
- 30.- SUAREZ MORENO S.M. 1982. Prevalencia de portadores de estreptococo beta-hemolítico en escolares de la ciudad de Morelia. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis para obtener el título

de Q.F.B. Morelia Michoacan.

31.- THOMAS M.D. y colaboradores, 1963. Factors involved in the preparation and use of stable formalinized, tannic acid treated protein sensitised eritrocytes for detection of antigen and antibody. *J. Immunol.* 90 : 741-750.

32.- TODD E.W. 1932 Antigenic streptococcal hemolysin. *J. Exp. Med.* 55 : 267-280.

33.- ANONIMO, 1983. Usos apropiados de la Inmunoglobulina humana en la práctica clínica. *Bol. of Sanit. Panam.* 95 : 74-80.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**