

## Artículos Originales

Instituto Finlay  
Hospital Pediátrico "Juan Manuel Márquez"

### COMPOSICIÓN DE INMUNOGLOBULINAS EN LA INMUNOGLOBULINA HUMANA ANTIMENINGOCÓCICA

Amador Alberto Camero Santiesteban,<sup>1</sup> Julio A. Balboa González,<sup>2</sup> Mayté del C. Nerey Olivares,<sup>2</sup> José A. Malberty Agüero,<sup>3</sup> Marta Paradoa Pérez,<sup>4</sup> Lázaro G. Joó Sánchez<sup>5</sup> y V. Gustavo Sierra González<sup>4</sup>

#### RESUMEN

---

Se determinó por turbidimetría las concentraciones de IgG, IgA e IgM, se cuantificó IgE con el UMELISA-IgE del SUMA, y se estudió por un método inmunoenzimático la composición de subclases de IgG específica contra proteínas de meningococo B. Se encontraron concentraciones de IgG de 47,98; 47,80 y 48,10 g/L, el contenido de IgA fue menor o igual que 0,50 g/L, la concentración de IgM se encontró alrededor de 0,25 g/L y los niveles de IgE fueron mayores de 200 UI/mL. Se considera que están presentes anticuerpos IgG específicos de las 4 subclases con predominio de IgG1. Una mayor presencia de IgG1 pudiera estar asociada con un mayor valor de actividad específica.

*Descriptores DeCS:* NEISSERIA MENINGITIDIS/inmunología; ANTICUERPOS BACTERIANOS/análisis; IGG/análisis; IGA/análisis; IGM/análisis; IGE/análisis; NEFELOMETRIA Y TURBIDIMETRIA/métodos; TEST DE ELISA/métodos.

---

La inmunoglobulina humana anti-meningocócica (IGHAM) es una inmunoglobulina hiperinmune preparada a partir de plasma de donantes adultos sanos que han sido inmunizados con la vacuna antimeningocócica cubana BC (VA-

MENGOC-BC<sup>R</sup>), primera en el mundo con efectividad probada contra los meningococos del grupo B. La IGHAM posee un alto título de anticuerpos (Acs) con actividad bactericida que hacen posible la bacteriólisis dependiente de complemento,

---

<sup>1</sup> Licenciado en Biología. Instituto Finlay.

<sup>2</sup> Licenciado en Bioquímica. Instituto Finlay.

<sup>3</sup> Doctor en Medicina. Instituto Finlay.

<sup>4</sup> Doctor en Medicina. Hospital Pediátrico "Juan Manuel Márquez".

<sup>5</sup> Licenciado en Bioquímica y Biología. Instituto Finlay.

y se ha demostrado su efectividad al incrementar la sobrevida de niños con meningitis y/o meningococemia aún con un alto número de factores de pronóstico desfavorable.<sup>1,2</sup>

Los requerimientos en preparaciones de inmunoglobulinas para uso parenteral exigen que al menos el 90% del producto sea IgG monomérica y que el resto de las inmunoglobulinas estén presentes en cantidades muy reducidas, que ésta sea lo menos modificada posible y mantenga su capacidad opsonizante y de unir complemento, así como otras propiedades biológicas. Se recomienda además que la concentración de IgA debe ser muy baja, ya que ésta puede presentarse como impureza y causar reacciones anafilácticas en pacientes sensibilizados; se designa como inmunoglobulina hiperinmune aquélla que contenga al menos 5 veces el título de anticuerpos de una preparación estándar.<sup>3</sup>

La presencia de otras clases de inmunoglobulinas, la composición de subclases de IgG y la conservación de sus propiedades fisiológicas varían según el método empleado en la preparación de la inmunoglobulina.<sup>4</sup> La distribución de subclases puede influir en la eficacia de las preparaciones de inmunoglobulinas para uso intravenoso, ya que algunos anticuerpos específicos pertenecientes a determinadas subclases han sido identificados como importantes en varias enfermedades infecciosas.<sup>5,6</sup>

Consideramos por tanto útil conocer el contenido de IgG, IgA, IgM e IgE de la IGHAM, estudiar la composición de subclases de IgG en 3 lotes de la preparación y contribuir de esta forma a una caracterización más completa del producto.

## MÉTODOS

*Obtención de IGHAM.* Se fraccionaron 3 lotes del producto a partir de plasma de voluntarios inmunizados con VAMENGOC-BC<sup>R</sup> seleccionados por su concentración

de anticuerpos específicos contra proteínas del meningococo B (mayor o igual que 25 U/mL por SUMA). El proceso se desarrolló según las modificaciones realizadas por Cádiz<sup>7</sup> al método de Cohn-Oncley.<sup>8,9</sup>

Se realizaron los ensayos de control establecidos por la Norma Cubana, NC 26-205 de 1990.<sup>10</sup> Estos ensayos incluyen la determinación de la concentración de proteínas totales según el método de Biuret y la detección de Acs específicos a las proteínas de VAMENGOC-BC<sup>R</sup>, mediante un método inmunoenzimático<sup>11</sup> que utiliza una solución de proteínas de membrana externa de la cepa B4:P1.15 como recubrimiento de la fase sólida (20 µg/mL) y un conjugado de anti-IgG humana con fosfatasa alcalina. Como control negativo se seleccionaron muestras de suero de individuos no vacunados con títulos de Acs específicos contra proteína vacunal por ELISA menores de 500 U/mL (grupo de no vacunados); el control positivo se preparó mezclando muestras de 14 sueros humanos obtenidos 4 semanas después de aplicada la segunda dosis de la vacuna, con títulos mayores o iguales que 25 U/mL por SUMA. Tanto el patrón de ELISA como el de SUMA tienen actividades específicas expresadas en unidades arbitrarias no equivalentes porque el coeficiente de correlación entre ambas técnicas aunque indica una asociación estadísticamente significativa, no permite la predicción de un valor. Sin embargo, la utilidad del valor de corte utilizado por SUMA está avalado para la selección de mezclas de plasma hiperinmune con su aplicación en más de 5 000 donaciones de plasma de vacunados.

*Determinación de IgG, IgA e IgM.* Las cuantificaciones se realizaron por turbidimetría en un espectrofotómetro Shimadzu 160 A, con un juego de reactivos Boehringer Mannheim. Se utilizaron patrones Precimat IgG, IgA e IgM para la

calibración y suero control Nor Partigen Behring.

*Determinación de IgE.* Se cuantificó IgE mediante un ensayo ultramicroenzimático (UMELISA-IgE, Centro de Inmunoensayo).

*Determinación cualitativa de la actividad de subclases de IgG contra las proteínas de VAMENGOC-BC<sup>R</sup>.* Se realizó un método inmunoenzimático en condiciones similares a la determinación de anticuerpos específicos totales<sup>11</sup> con un sistema extravidina-biotina para la detección de subclases. Los conjugados anti IgG1-4 biotina (SIGMA) diluidos 1:1 000 fueron incubados 1 h a 37 °C y el conjugado extravidina-fosfatasa alcalina a una dilución 1/2 000 se incubó 30 min a 37 °C. A continuación se añadió el sustrato constituido por 10 mg de p-nitrofenilfosfato en 10 mL de solución reguladora dietanolamina pH 9,8 y se incubó 120 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Las placas fueron leídas a 405 nm pasados 30, 90, 120 y 180 min de incubación con el sustrato.

## RESULTADOS

En la tabla 1 se observan las concentraciones de IgG, IgM e IgA obtenidas por el método turbidimétrico en los 3 lotes de IGHAM.

TABLA 1. Concentraciones de IgG, IgM, IgA obtenidas por turbidimetría para los 3 lotes de IGHAM estudiados

Lotes	IgG (g/L)	IgM (g/L)	IgA (g/L)
1001	47,98	0,25	0,50
1003	47,80	0,23	0,43
2001	47,10	0,26	0,48

En la determinación de IgE se encontraron valores mayores que 200 U/mL en los 3 lotes.

En la tabla 2 se presentan los resultados de las concentraciones de proteínas totales

y el porcentaje de las inmunoglobulinas analizadas en los 3 lotes del producto.

TABLA 2. Concentración de proteínas totales y porcentajes IgG, IgM e IgA en la IGHAM

Lotes	Concentración de proteínas (g/L)	IgG (%)	IgM (%)	IgA (%)
1001	108,71	44,13	0,23	0,45
1003	106,76	46,06	0,22	0,41
2001	126,37	38,06	0,20	0,38

La concentración de Acs específicos y la actividad específica contra proteínas de membrana externa de meningococo B (cepa B4:P1.15) se muestran en la tabla 3. Los 3 lotes cumplen con la especificación de calidad para actividad específica establecida en 150 U/mL.<sup>10</sup>

TABLA 3. Concentración de Acs y actividad específica contra proteínas de Neisseria meningitidis grupo B

Lote	Concentración de Acs específicos (U/mL)	Actividad específica (U/mg)
1001	13 927,227	290,2
1003	13 380,869	279,9
2001	15 227,427	317,6

Los resultados de la determinación de subclases por el método inmunoenzimático para distintos tiempos de incubación con el sustrato se muestran en la tabla 4.

## DISCUSIÓN

Como se observa en la tabla 1, los valores de IgG en los 3 lotes están cercanos a la concentración normal de IgG de la preparación (50 g/L),<sup>10</sup> aunque el porcentaje de IgG del total de proteínas fue inferior en el lote 2001, producto de una mayor cantidad de albúmina añadida a este lote (tabla 2). De acuerdo con las especificaciones químicas, la concentración de proteínas de nuestro producto debe estar

TABLA 4. Valores de DO a diferentes tiempos de incubación con el sustrato

Muestra	Subclase	30 min	60 min	90 min	120 min
L 1001 1 : 500	IgG 1	0,106	0,155	0,207	0,256
	IgG 2	0,072	0,086	0,101	0,117
	IgG 3	0,070	0,078	0,086	0,096
	IgG 4	0,067	0,072	0,078	0,083
L 1003 1 : 500	IgG 1	0,109	0,159	0,212	0,263
	IgG 2	0,072	0,084	0,097	0,111
	IgG 3	0,070	0,077	0,084	0,092
	IgG 4	0,066	0,071	0,075	0,079
L 2001 1 : 500	IgG 1	0,122	0,186	0,250	0,315
	IgG 2	0,070	0,084	0,098	0,113
	IgG 3	0,071	0,078	0,087	0,094
	IgG 4	0,067	0,071	0,076	0,080
Mezcla de sueros de no vacuna- dos 1 : 100	IgG 1	0,077	0,095	0,112	0,131
	IgG 2	0,069	0,076	0,083	0,092
	IgG 3	0,067	0,074	0,079	0,085
	IgG 4	0,066	0,070	0,074	0,079
Mezcla de suero de vacunados 1 : 100	IgG 1	0,172	0,298	0,426	0,551
	IgG 2	0,075	0,091	0,108	0,126
	IgG 3	0,070	0,078	0,086	0,096
	IgG 4	0,063	0,067	0,072	0,077

entre 100 y 140 g/L, por lo cual los 3 lotes cumplen los requerimientos exigidos.<sup>10</sup>

Las concentraciones de IgM e IgA pueden considerarse aceptables si se comparan con los valores referidos para 14 preparaciones estudiadas por *Romer y otros* en 1982;<sup>12</sup> los procedimientos por los cuales se obtuvieron esos productos incluyeron tratamientos tan diversos como degradación enzimática, tratamiento con polietilenglicol o  $\beta$ -propiolactona, reducción y alquilación y adsorción con DEAE-Sephadex. En otro estudio comparativo de las impurezas presentes en las preparaciones de inmunoglobulinas intravenosas se refieren valores de IgA entre 4,3 y 5,9 g/L en 3 lotes de Venimmun<sup>R</sup> (Behring) y valores entre 0,95 y 1,6 mg/mL en 3 y 5 lotes de Intraglobin F<sup>R</sup> (Biotest) y Sandoglobulin<sup>R</sup> (Sandoz), respectivamente.<sup>13</sup>

Los niveles de IgE encontrados son superiores a los que refiere un estudio realizado en 10 lotes de Intacglobin<sup>R</sup> (entre

53 y 84 U/mL), en 1 lote Sandoglobulin<sup>R</sup> (180 U/mL), en 1 lote de Biagini (20 U/mL) y en 1 lote de la Cruz Roja Suiza (40 U/mL) y similares a la concentración determinada en 3 lotes de Endobulin<sup>R</sup> Immuno GmbH. (Castillo JR. Evaluación de una inmunoglobulina intravenosa. Control de la calidad y su uso clínico. Trabajo para optar por el título de Especialista en Inmunología Clínica. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". 1992:31-2).

La infusión de preparaciones de inmunoglobulinas intravenosas que contienen IgE, debe teóricamente estar seguida por la unión de la IgE a los receptores Fc de los basófilos y mastocitos por la liberación de sustancias vasoactivas seguida de alérgenos, lo que da lugar a reacciones anafilácticas; sin embargo, no hay información de que preparaciones de inmunoglobulinas intravenosas que contienen IgE hayan causado tal anafilaxis pasiva, ni existe correlación entre los niveles

de Acs de la clase IgE en inmunoglobulinas intravenosas y las reacciones adversas en general.<sup>14</sup>

Para realizar el análisis comparativo entre las subclases se calcularon los cocientes de las densidades ópticas (DO) de las subclases 1, 2 y 3 entre el valor de DO para la IgG4. En la medida en que aumenta el tiempo de incubación se incrementan los valores de DO por lo cual a un tiempo de 2 h se pueden apreciar mejor las diferencias entre subclases. Se ha observado que el límite de detección aumenta en dependencia del tiempo de la reacción enzima-sustrato aún después de 15 d de incubación con el p-nitrofenilfosfato (PNPP).<sup>15</sup>

La lectura de las DO determinadas en una dilución 5 veces mayor que la utilizada en las mezclas de sueros de vacunados y no vacunados, indican la presencia de Acs IgG de las 4 subclases en los 3 lotes del producto. El mayor valor de DO para la IgG1 se obtuvo en el lote 2001 y coincide que este lote tuvo una mayor actividad específica, lo que sugiere una posible asociación entre la concentración de IgG1

y la actividad específica del producto. De esta forma para los 3 lotes estudiados las mayores DO encontradas corresponden a la IgG1 y las menores a la IgG4, este resultado reafirma un predominio de IgG1 que está en correspondencia con la elevada actividad bactericida mediante la activación de la vía clásica del complemento demostrada en el producto,<sup>1,2</sup> así como con la actividad opsonizante, factor determinante en la protección contra *Neisseria meningitidis*.<sup>16,17</sup>

Ya ha sido demostrado previamente que la administración de VAMENGOC-BC<sup>R</sup> estimula la producción de las 4 subclases de IgG con un marcado predominio de IgG1, un aumento discreto de IgG2 y bajos niveles de IgG3 e IgG4 (Ferriol XR. ELISA para la detección de subclases de IgG anti-proteínas de VAMENGOC-BC<sup>R</sup>. Determinación de la presencia de IgA e IgM específicas contra las proteínas de esta vacuna. Trabajo de Diploma para optar por el título de Licenciado en Bioquímica. Facultad de Biología. Universidad de La Habana. 1992:25-30).

## SUMMARY

---

IgG, IgA and IgM concentrations were estimated by turbidimetry, IgE was quantified aided by UMELISA-IgE from SUMA and the composition of IgG-specific subclasses to B meningococcal proteins was studied by means of an immunoenzyme procedure. It was found that IgG concentrations amounted to 47.98; 47.80 and 48.10 g/L, the IgA content was lower than or equal to 0.50 g/L IgM concentration was 0,25 g/L approximately and IgE levels exceeded 200 UI/mL. It is considered that there are IgG antibodies in the 4 IgG subclasses of which IgG1 is the predominant. An increased presence of IgG1 could be associated to a higher value of specific activity.

*Subject headings:* NEISSERIA MENINGITIDIS/inmunology; ANTIBODIES, BACTERIAL/analysis; IGG/analysis; IGA/analysis; IGM/analysis; NEPHELOMETRY AND TURBIDIMETRY/methods; ENZYME LINKED INMUNOSORBENT ASSAY/methods.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Galguera MA. Uso de gammaglobulina hiperinmune específica en el tratamiento de la enfermedad meningocócica B. Rev Cubana Hematol Hemoter 1990;3:377-89.

2. Galguera MA, Sierra. G, Campa C, García L, Sotolongo F, Izquierdo L, et al. Obtención de gammaglobulina hiperinmune antimeningocócica y su uso potencial en el tratamiento de la enfermedad meningocócica en Cuba. Resultados preliminares. Rev Cubana de Hematol Hemoter 1988;4:60-72.
3. WHO. Appropriate uses of human immunoglobulin in clinical practice. Memorandum from an IUIS\WHO. Meeting Bulletin of the World Health Organization 1982;60:43-7.
4. Hässig A. Requirements for Modern Intravenous Immunoglobulin Preparation and Their Safe Clinical Use. Triangle 1987;26:23-32.
5. Sfürsen H, Wedege E, Rosenquist E. IgG subclass antibodies to serogroup B meningococcal outer membrane antigens following infection and vaccination. APMIS 1990;98:1061-9.
6. Herrmann DJ, Hamilton RG, Barington T. Quantification of human IgG subclass antibodies to *Hemophilus influenzae* type B capsular polysaccharide. J Immunol Methods 1982;148:102-14.
7. Cádiz A. Ensayo de un método de obtención industrial en Cuba de una inmunoglobulina humana normal biológicamente activa por fraccionamiento etanólico. Rev Cubana Farm 1977;11:5-12.
8. Cohn JE, Strong LE, Hughes WL. Preparation and properties of serum and plasma proteins. A system of separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. J Am Chem Soc 1946;24:459-76.
9. Oncley JL, Melin M, Richert DA, Cameron JW, Gross PM Jr. The separation of the antibodies isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and  $\beta$ -lipoprotein into subfractions of human plasma. J Am Chem Soc 1949;71:541-9.
10. Comité Estatal de Normalización. Inmunoglobulina humana antimeningocócica. Norma Cubana de Especificaciones de Calidad 1990;NC 26-205.
11. Sotolongo F. *Neisseria meningitidis*: aspectos teórico - prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. La Habana: Ediciones Finlay, 1995:96-100.
12. Römer J, Morgenthaler JJ, Scherz R, Skvaril F. Characterization of various immunoglobulin preparations for intravenous application. Vox Sang 1982;42:62-73.
13. Lundblad JL, Mitra G, Sternberg MM, Schroeder DD. Comparative studies of impurities in intravenous immunoglobulin preparations. Rev Infect Dis 1986;8:382-90.
14. Yap PL, Williams PE. The safety of IVIG preparations. En: Yap PL, ed. Clinical applications of intravenous immunoglobulin therapy. Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, New York and Tokyo: Churchill Livingstone;1992:43-62.
15. Díaz Romero J, Ootschoorn IM. Detection of antibodies to *Neisseria meningitidis* group B capsular polysaccharide by a liquid-phase-ELISA. Polysialic Acid. Roth J, Rutishauser U, Troy II FA. (eds). Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland, 1993:50-61.
16. Lehmann AK, Halstensen A, Vollset SE, Sfürsen H, Bjuen G. Immunization against serogroup B meningococci, opsonin response in vaccines as measured by chemiluminescence. APMIS 1991;99:769-72.
17. Yang KD, Bathras JM, Shigeoka AO, James J, Pincus SH, Hill HR. Mechanisms of Bacterial Opsonization by Immune Globulin Intravenous: Correlation of Complement Consumption with Opsonic Activity and Protective Efficacy. J Infect Dis 1989;159:701-7.

Recibido: 29 de diciembre de 1997. Aprobado: 14 de mayo de 1998.

Lic. Amador Alberto Camero Santiesteban. Calle 306 No. 318 A entre 3ª y 3ª A Santa Fe, municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.