

Instituto de Hematología e Inmunología

REACTIVO HEMOCLASIFICADOR MONOCLONAL CUBANO HEMO-CIM ANTI-A. ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Lic. Lilia Suárez Batista,¹ Lic. René Rivero Jiménez,¹ Lic. Niuvis Pérez Pérez,²
Lic. Antonio Bencomo Hernández,¹ Ing. Frank Torres Barbosa,² Lic. Marta Martínez
Solís,¹ Dra. Renée González Sampedro¹ y Dra. Teresita Rodríguez Obaya²

RESUMEN

Los estudios de estabilidad de los reactivos fabricados a partir de anticuerpos monoclonales (AcM) de origen murino, son esenciales para obtener resultados adecuados en su aplicación práctica y constituyen un requisito indispensable en las buenas prácticas de producción, lo que permite establecer adecuadamente la vida de estos productos. Se usaron los métodos de hemaglutinación recomendados para medir la actividad biológica del producto Hemo-CIM anti-A expresada en la potencia, la avidez y la intensidad frente a un panel de eritrocitos del grupo A₁ y A₂B, que se incluyó por su baja expresión del antígeno A para demostrar más efectivamente cualquier deterioro que sufriera el reactivo. Se estableció que la vida útil del reactivo hemoclasificador producido en el Centro de Inmunología Molecular es de 2 años y se determinó que la temperatura de almacenamiento del producto está entre 2 y 8 °C. Además, los lotes que se colocaron diariamente en la meseta de trabajo durante 5 horas a 21 °C a partir del mes 0 y a los 8, 14 y 22 meses después de su producción, simulando las condiciones a la que los usuarios someten a estos reactivos, mantuvieron las características de calidad que se requieren para su uso, lo que demostró que con este producto se puede trabajar en esas condiciones.

Descriptor DeCS: JUEGO DE REACTIVOS PARA DIAGNOSTICO; SISTEMA DEL GRUPO SANGUINEO ABO/clasificación; ESTABILIDAD DE MEDICAMENTOS; VENCIMIENTO DE LOS MEDICAMENTOS; CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS; ANTICUERPOS MONOCLONALES.

El sistema ABO, primer sistema de grupo sanguíneo humano descubierto,¹ está dividido en 4 grupos básicos: A, B, AB y O, en dependencia del antígeno que se expresa en la superficie de los eritrocitos. Estos antígenos tienen gran importancia clínica,

particularmente en las transfusiones sanguíneas y en el trasplante de tejidos para asegurar la histocompatibilidad entre donante y receptor.²

Los AcM han ido remplazando exitosamente a los antiseros policlonales

¹ Instituto de Hematología e Inmunología.

² Centro de Inmunología Molecular.

humanos como diagnosticadores para el tipaje de los grupos sanguíneos;³ aunque esta sustitución no ha sido una tarea fácil ha abierto grandes perspectivas en la inmunohematología.⁴ La validación de los productos biotecnológicos hemoclasificadores monoclonales para uso diagnóstico *in vitro*, requiere de una detallada caracterización biológica y una evaluación de calidad para determinar si estos reactivos cumplen con los criterios reconocidos internacionalmente,⁵ por lo que se realizó un estudio de estabilidad para definir el tiempo de vida útil y las condiciones de almacenamiento de dicho reactivo con el objetivo de dar cumplimiento a las buenas prácticas de producción.

MÉTODOS

PREPARACIÓN DE LOS LOTES

Se utilizaron 3 lotes del reactivo Hemo-CIM anti-A (9601, 9602 y 9603) preparados a partir de los lotes de líquido ascítico 1.1.2, 2.1.2 y 53.2.7 producidos los 2 primeros en el CIM y el último en el Centro Nacional para Animales de Laboratorio (CENPALAB). Estos lotes de líquido ascítico se liberaron por el Departamento de Control de la Calidad del CIM como fuente de materia prima principal para la elaboración del producto final.

Para la producción de los líquidos ascíticos se utilizó el subclon E5 del hibridoma IHI-15. Este subclon se seleccionó en el Departamento de Desarrollo del CIM con la colaboración del Instituto de Hematología e Inmunología, por clonaje del hibridoma IHI-15, con el fin de mejorar la línea celular y poder conformar los bancos maestro y de trabajo. El pesquisaje de los sobrenadantes de cultivo se realizó por la técnica de hemaglutinación en placa de 96

pocillos de fondo en U frente a células de grupo A₁, A₂B, B y O, seleccionándose por ser el más potente.

La producción de los lotes de los reactivos hemoclasificadores Hemo-CIM anti-A se realizó siguiendo los procedimientos normalizados de operación (PNO) y lo establecido en los registros de lote para la formulación y para el llenado, etiquetado y envase de este reactivo en el Departamento de Producción del CIM. El producto final, formulado a partir de la dilución 1:2 del líquido ascítico en presencia de 0,05 M de sales de fosfatos, 17 g/L de NaCl, 1 % de BSA (Boseral, Organon Tecknika), 0,1 % de NaN₃ (Sigma) y 0,015 g/L de erioglaucina (BDH), se envasó en frascos de cristal de 5 mL con tapa de rosca y gotero curvo (IMEFA). Antes de utilizarlo en el ensayo estos lotes se evaluaron por el Departamento de Calidad y se liberaron por cumplir con las especificaciones de calidad establecidas para este tipo de reactivos por las agencias regulatorias.⁶

CANTIDAD DE FRASCOS PARA EL ESTUDIO

Se tomaron un total de 30 frascos por lote de forma aleatoria una vez que se liberaron.

TEMPERATURA A LA QUE SE MANTUVO EL PRODUCTO DURANTE EL ESTUDIO

Los 30 frascos de cada lote se almacenaron entre 2 y 8 °C durante 2 años, de ellos 2 frascos de cada lote se mantuvieron 5 horas diarias a 21 °C durante 4 meses. Este último proceder se realizó en el mes 0 y a los 8, 14 y 22 meses de producido el

reactivo, para simular las condiciones de trabajo a las que se someten estos productos en los centros donde se realiza tipaje sanguíneo.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL PRODUCTO HEMO-CIM ANTI-A

La actividad biológica del producto se define por la potencia, avidéz e intensidad del AcM Anti-A.⁶

DETERMINACIÓN DE LA POTENCIA DEL REACTIVO POR EL MÉTODO DE HEMAGLUTINACIÓN EN TUBO

El valor de la potencia del reactivo se expresó como la última dilución a la que se observó una aglutinación de 1+. El grado de reacción de la aglutinación se calculó de acuerdo con la siguiente escala: 4+ si se observa un solo grumo; 3+ si se observan varios grumos grandes; 2+ si se observan muchos pequeños grumos de igual tamaño; 1+ si se observa una granulación muy fina; 0 si la reacción es negativa.⁷ Los valores óptimos son mayores o iguales a 1:64 (2^{-6}) con células A_1 , y mayores o iguales a 1:16 (2^{-4}) con células A_2B , según las recomendaciones internacionales.⁶

DETERMINACIÓN DE LA AVIDEZ POR EL MÉTODO DE HEMAGLUTINACIÓN EN LÁMINA

El valor de la avidéz, o sea, el tiempo mínimo en que una vez mezclados el reactivo y la suspensión de hematíes se produce la aglutinación, se expresó en segundos. Los valores óptimos son menores o iguales a 5 segundos con células A_1 y menores o iguales a 10 segundos con células A_2B .⁶

DETERMINACIÓN DE LA INTENSIDAD DETERMINADA POR EL MÉTODO DE HEMAGLUTINACIÓN EN LÁMINA

El valor de la intensidad se expresó en cruces de acuerdo con la escala descrita anteriormente y tiene que ser igual o mayor que 2 cruces.⁶

PUNTUACIÓN

Se calculó de la suma de los grados de la reacción que se obtuvieron de cada dilución del reactivo por la técnica de hemaglutinación por centrifugación en tubo frente a cada muestra de eritrocitos utilizados según la relación siguiente⁸: 12 puntos para un grado de reacción de aglutinación de 4+; 10 para 3+; 8 para 2+ y 5 para 1+.

PANEL CELULAR Y CONDICIONES DE CONSERVACIÓN

Se utilizaron células de un donante de grupo A_1 y células A_2B de 3 donantes diferentes, que se mantuvieron congeladas en una disolución de glicerina 40 % (Merck) a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante el estudio. El panel se renovó cada 6 meses para asegurar su calidad. Se utilizaron las técnicas de congelación y descongelación de eritrocitos descritas por *Holburn* y otros.⁹ La calidad de los eritrocitos cada vez que se descongelaban se controló con el reactivo monoclonal hemoclasificador Seraclone anti-A (lote 132075) de la firma Biotest AG, RFA.

PROGRAMA DEL TIEMPO EN QUE SE EVALUÓ EL REACTIVO HEMO-CIM ANTI-A

1. Las mediciones de reconocimiento específico se realizaron con una perio-

dicidad bimensual durante 2 años (para los frascos mantenidos a una temperatura entre 2 y 8 °C).

2. Las mediciones de reconocimiento específico se realizaron con una periodicidad semanal durante 4 meses, hasta que se agotó el reactivo (para los frascos mantenidos diariamente durante 5 horas a 21 °C).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de regresión del comportamiento de la reactividad del producto Hemo-CIM anti-A frente a las células A₂B. Se determinó la pendiente y el intercepto y se estimó el tiempo de caducidad del reactivo en los diferentes tiempos y condiciones a las que se estudió éste.¹⁰ Los análisis se realizaron con el uso de los programas estadísticos automatizados Statistica y Excell, de Microsoft Corporation.

RESULTADOS

En los centros donde se realiza de forma habitual el tipaje de grupos sanguíneos ABO, por lo general los reactivos hemoclasificadores necesarios para esta clasificación se mantienen aproximadamente 5 horas en la mesa de trabajo a una temperatura que oscila de 21 a 25 °C y cuando se termina el trabajo se vuelven a guardar a una temperatura entre 2 y 8 °C. Este proceder se repite diariamente y se realiza hasta que se agota el contenido del reactivo en el frasco. Por esta razón, en el estudio de estabilidad del producto Hemo-CIM anti-A, este reactivo se sometió a similares condiciones, para determinar cómo se mantenían sus características de calidad. Para lograr esto, el producto que se había almacenado a 4 °C se sacó diariamente 5 horas de 21 a 25 °C

durante 4 meses (tiempo necesario para que se agotara el reactivo evaluándolo semanalmente) cuando el producto llevaba diferentes períodos de tiempo almacenado a 4 °C (mes 0 de producido y a los 8, 14 y 22 meses después de producido). Se determinó que este período de 4 meses era suficiente, pues superaba el tiempo real al que son mantenidos los reactivos en estas condiciones.

Los lotes 9601, 9602 y 9603 del reactivo monoclonal Hemo-CIM anti-A, que se colocaron diariamente en la meseta de trabajo durante 5 horas a 21 °C a partir del mes 0 y a los 8, 14 y 22 meses después de su producción, simulando las condiciones a las que los usuarios someten estos reactivos, mantuvieron las características de calidad que se requieren para su uso al igual que los que se dejaron durante el estudio entre 2 y 8 °C por 2 años (tablas 1 y 2).

Los valores de potencia y puntuación del producto Hemo-CIM anti-A frente a eritrocitos A₁ se mantuvieron durante el estudio por encima de los valores de los patrones de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS), de la Administración de Alimentos y Drogas del Gobierno de los Estados Unidos de América (FDA) y la Comunidad Europea (CE) (curso de la OMS en el Laboratorio Internacional de Referencia de Grupos Sanguíneos. Bristol, Reino Unido, 1997), mientras que frente a eritrocitos A₂B los valores al inicio del estudio fueron mayores, pero al final del estudio fueron similares en comparación con los patrones de la OMS y CE, mientras que con el patrón de la FDA se obtuvo una puntuación un poco más baja (tabla 3).

Se realizaron las curvas de regresión con respecto a la variación de la potencia y la avidéz del reactivo en el tiempo frente a cada una de las 3 células A₂B a los tiempos 0, 8, 14 y 22 de producido al reactivo (mantenido 5 horas a una temperatura de

TABLA 1. Potencia de reacción de los 3 lotes de Hemo-CIM anti-A conservados entre 2 y 8°C

Fecha mes/año	Panel celular	p ^a		
		Lote 1	Lote 2	Lote 3
3, 5, 7, 9 y 11/1996; 1, 3 y 5/1997	A ₁	10	10	10
	A ₂ B	6	6	6
	A ₂ B	6	6	6
	A ₂ B	7	7	7
7 y 9/1997	A ₁	10	10	10
	A ₂ B	6	6	6
11/1997 y 1/1998	A ₁	10	10	10
	A ₂ B	5	5	5
	A ₂ B	6	6	6
	A ₂ B	6	6	6
3/1998	A ₁	10	10	10
	A ₂ B	5	5	5
	A ₂ B	5	5	5
	A ₂ B	6	6	6

P^a: recíproco de la mayor dilución en la que se observa aglutinación (10 equivale a 1/2¹⁰ = 1/1024), en la técnica de centrifugación en tubos.

TABLA 2. Avidez e intensidad de reacción de los 3 lotes de Hemo-CIM anti-A conservados entre 2 y 8°C

Fecha mes/año	Panel celular	Lote 1		Lote 2		Lote 3	
		A ^b	I ^c	A ^b	I ^c	A ^b	I ^c
3, 5, 7, 9 y 11/1996 y 1 de 1997	A ₁	2"	4+	2"	4+	2"	4+
	A ₂ B	6"	2+	6"	2+	7"	2+
	A ₂ B	5"	2+	5"	2+	5"	2+
	A ₂ B	5"	2+	5"	2+	5"	2+
3,5/1997	A ₁	2"	4+	2"	4+	2"	4+
	A ₂ B	7"	2+	7"	2+	7"	2+
	A ₂ B	5"	2+	5"	2+	5"	2+
	A ₂ B	5"	2+	5"	2+	5"	2+
7, 9/1997	A ₁	2"	4+	2"	4+	2"	4+
	A ₂ B	5"	2+	5"	2+	5"	2+
11/1997	A ₁	2"	4+	2"	4+	2"	4+
	A ₂ B	7"	2+	7"	2+	7"	2+
	A ₂ B	5"	2+	5"	2+	5"	2+
	A ₂ B	5"	2+	5"	2+	5"	2+
1/1998	A ₁	2"	4+	2"	4+	2"	4+
	A ₂ B	7"	2+	7"	2+	7"	2+
	A ₂ B	6"	2+	6"	2+	6"	2+
	A ₂ B	5"	2+	5"	2+	5"	2+
3/1998	A ₁	2"	4+	2"	4+	2"	4+
	A ₂ B	10"	2+	10"	2+	10"	2+
	A ₂ B	6"	2+	6"	2+	6"	2+
	A ₂ B	5"	2+	5"	2+	5"	2+

A^b: avidez en segundos; I^c: intensidad en cruces de la fuerza de la reacción de aglutinación, escala de 4+ (máximo) a 0 (no aglutina), por la técnica de hemaglutinación en láminas.

TABLA 3. Puntuación y potencia del reactivo Hemo-CIM anti-A y los patrones de referencia de la Administración de Alimentos y Drogas del Gobierno de los Estados Unidos de América (FDA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Europea (CE)

Células	Parámetro	FDA	OMS	CE	Hemo-CIM anti-A Estudio de estabilidad	
					Inicio	Final
A ₁	Título	256	128	128	1024	1024
	Puntuación	92	73	77	93	90
A ₂ B	Título	64	32	64	64*	64
	Puntuación	57	36	53	59	41

* Promedio de 3 determinaciones con 3 muestras diferentes de eritrocitos A₂B.

TABLA 4. Valores de los interceptos y pendientes de la curva de regresión de la potencia y la avidéz frente a las células A₂B

Potencia	Células A ₂ B donante 1		Células A ₂ B donante 2		Células A ₂ B donante 3	
	Pendiente	Intercepto	Pendiente	Intercepto	Pendiente	Intercepto
Mes 0	0	6	0	6	-0,08	7,36
Mes 8	-0,16	6,63	-0,16	6,63	-0,23	7,58
Mes 14	NR	NR	NR	NR	-0,05	6,56
Mes 22	-0,09	5,36	-0,11	5,82	-0,13	6,00
Avidéz						
Mes 0	0,063	6,19	0,07	5,04	0,09	4,73
Mes 8	0,125	5,99	0,16	4,77	0,17	4,66
Mes 14	NR	NR	NR	NR	0,03	4,78
Mes 22	0,262	5,99	0,34	4,55	0,13	4,46

NR: no realizado.

21 °C). Se determinó el intercepto y la pendiente de cada curva (tabla 4), y por la intersección de las rectas de regresión con el valor límite de aceptación para la avidéz y la potencia, se estimó que el tiempo de caducidad de los lotes mantenidos a 21 °C es de 4 meses para todos los casos estudiados.

Todos los lotes reaccionaron frente al panel de hematíes por encima de los límites de aceptación recomendados por las agencias reguladoras internacionales y nacional para este tipo de reactivos, y el AcM Hemo-CIM Anti-A mantuvo:

- Una potencia mayor que 1:64 (2⁻⁶) con eritrocitos de grupo A₁ y 1:16 (2⁻⁴) con eritrocitos A₂B.

- Una avidéz menor que 5 segundos con eritrocitos de grupo A₁ y 10 segundos con eritrocitos A₂B
- Una intensidad igual o mayor que 2+.

DISCUSIÓN

El estudio de estabilidad de un nuevo producto biotecnológico establece el período de caducidad del mismo, período dentro del cual el producto cumple con los requisitos de calidad exigidos por las agencias reguladoras para este tipo de reactivo.

Se demostró que el reactivo Hemo-CIM anti-A es estable por un período de tiempo de 2 años, a una temperatura entre 2 y 8 °C.

Los eritrocitos A₂B tienen una baja expresión del antígeno A y se utilizan en la evaluación de los reactivos anti-A para demostrar más efectivamente el deterioro de cualquier reactivo hemoclasificador anti-A. Así, los valores de potencia obtenidos (32 y 64) frente a 3 muestras diferentes de

eritrocitos A₂B indican que estamos en presencia de un producto muy estable.

Los valores de potencia y puntuación obtenidos, comparados con los valores de los patrones de referencia de la FDA, la OMS y la CE, confirman la calidad de este producto.

SUMMARY

The stability studies of the reagents obtained from monoclonal antibodies of murine origin are essential to attain adequate results in their practical application and are also an indispensable requirement for good production practices, which allow to establish the life of these products adequately. The hemagglutination methods were used to measure the biological activity of the anti-A Hemo-CIM product expressed in power, avidity and intensity against a set of erythrocytes of group A₁ and A₂B that was included due to its low antigen A expression to show more effectively any deterioration suffered by the reagent. It was determined that the useful life of the hemoclassifier produced at the Molecular Immunology Center is of 2 years and the product may be stored at a temperature between 2 and 8 °C. Besides, the batches that were placed on the counter every day during 5 hours at 21 °C starting from month 0 and at 8, 14 and 22 months after its production, simulating the conditions under which the users maintain these reagents, kept the quality required for their use, demonstrating that one can work with this product under such conditions.

Subject headings: REAGEN KITS, DIAGNOSTIC; ABO BLOOD-GROUP SYSTEM/classification; DRUG STABILITY; DRUG EXPIRATION; DRUG QUALITY; ANTIBODIES, MONOCLONAL.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Landsteiner R. Über agglutinationsercheinungen normalen menschlichen. Blutwinen. *Klin Wochenschr* 1902;14:1132-4.
2. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M, ABO, Lewis, Ii, P groups. *Blood transfusion in clinical medicine*. 8 ed. Oxford: Blacwell Scientific, 1987:268-325.
3. Rouger P, Noizat-Pirenne F, Le Pennec PY. Advances in the use of monoclonal antibodies for blood group testing. *Transfus Clin Biol* 1997;4:345-9.
4. Beck ML, Kirkegaard JR. Annotation-Monoclonal ABO blood grouping reagents: a decade later. *Immunohematol* 1995;11:67-70.
5. Bruce M, Hoppe PA, Kochman SA, Le Pennec PY, Moore PVL, Voak D. Reagents for the 1990's. A report. *Inmunohematology* 1991;7:57-64.
6. US Food and Drug Administration. Recommended methods for blood grouping reagents evaluation. Docket No. 84S-0181. March, 1992:1-53.
7. Marsh WC. Scoring of haemagglutination reactions. *Transfusion* 1972;12:352-3.
8. Pretnar K, Curin V. Report of section 2A serology: anti-A, anti-B and anti-A,B reagents. *Transfus Clin Biol* 1997;1:19-22.
9. Holburn AM, Moore BPL, David-West AS, Lema RA, Kasili EG, Casal P, et al. The production of ABO and D (Rh₀) grouping reagents. Geneva: World Health Organization, 1981:5-25.
10. Ruberg SJ. Pooling data for stability studies: testing the equality of batch degradation slopes. *Biometrics* 1991;1059-69.

Recibido: 18 de agosto de 1998. Aprobado: 23 de octubre de 1998.

Lic. *Lilia Suárez Batista*. Instituto de Hematología e Inmunoterapia. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléfono (537) 578268. Fax (537) 338979. e-mail:ihidir@hemato.sld.cu