

## Producción

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

# EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RECONOCIMIENTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES CONJUGADOS: IOR T3, T4 Y T8

Lic. Liliana Pérez Toledo,<sup>1</sup> Dr. Alejandro Álvarez García,<sup>1</sup> Téc. Yondel Torranzo Soto,<sup>1</sup> Lic. Rafael Magadán Figueroa,<sup>2</sup> Lic. Yamilé Perdomo,<sup>2</sup> Lic. Ignacio Vidal García<sup>1</sup> y Dr. Jorge Pérez Ávila<sup>1</sup>

## RESUMEN

En la infección por VIH la evaluación secuencial de los valores de linfocitos CD3, CD4 y CD8 aportan información para el establecimiento del estado clínico y el pronóstico de los pacientes. Disponer de reactivos óptimos, producidos en nuestro país, para su uso en citometría de flujo, implica un ahorro sin que se afecte la calidad. El Laboratorio Diagnóstico del Instituto de Medicina Tropical (IPK) correlacionó el porcentaje de linfocitos reconocidos por los anticuerpos monoclonales (AcMs) conjugados producidos por el Centro de Inmunología Molecular (CIM) (CIMAB SA, La Habana, Cuba) [ior T3, T4 y T8] frente a sus similares de la casa comercial DAKO AG (Dinamarca), en muestras de pacientes en diferentes estadios de la enfermedad, tomados aleatoriamente. Los resultados del coeficiente de correlación para cada AcM utilizando una regresión simple, fueron los siguientes: CD3=0,932; CD4=0,986; CD8=0,958. Con este estudio se demostró que los AcMs conjugados de la serie ior (CIMAB SA) se comportan, en cuanto a porcentaje de reconocimiento, de forma similar a los de la casa comercial DAKO, lo que posibilita el diagnóstico y monitoreo de los pacientes VIH/SIDA cubanos.

*Descriptor DeCS:* CITOMETRIA DE FLUJO; TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO; INFECCIONES POR VIH.

Los leucocitos presentan una gran cantidad de moléculas marcadoras en su superficie, algunas de las cuales aparecen

momentáneamente en etapas particulares de la diferenciación o de la activación celular. Las proteínas marcadoras de membrana se

<sup>1</sup> Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

<sup>2</sup> Centro de Inmunología Molecular.

pueden usar para distinguir las diferentes poblacionales celulares, y muchas de ellas se pueden identificar por medio de anticuerpos monoclonales (AcMs) específicos.<sup>1,2</sup> El desarrollo de estos anticuerpos, conjugados con diferentes fluorocromos, que se pueden usar en análisis por medio de citometría de flujo, ha revolucionado y propiciado grandes avances en el análisis de diferentes subpoblaciones de linfocitos. Así, la citometría de flujo ha emergido como una herramienta importante y poderosa en la diferenciación de subpoblaciones celulares.<sup>3</sup>

El análisis de las subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica se puede aplicar para evaluar el estado inmunológico,<sup>4,6</sup> e incluso proporcionar información importante para la identificación de diferentes padecimientos.<sup>7,8</sup> De igual forma, se ha demostrado que proporciona datos con valor pronóstico en cáncer gástrico<sup>9</sup> y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA);<sup>10</sup> en esta última enfermedad se ha comprobado que el monitoreo de las subpoblaciones linfoides, específicamente el conteo absoluto de linfocitos CD4, tiene tanto valor pronóstico como terapéutico.<sup>11</sup>

En la actualidad todo trabajo relacionado con el control evolutivo de los infectados y ensayos clínicos de nuevas drogas, conlleva obligatoriamente la cuantificación de los linfocitos T CD4+, el descenso del número absoluto de éstos está considerado como uno de los más potentes marcadores predictivos de evolución a SIDA, tanto en pacientes tratados como no tratados.<sup>11</sup>

En la mayoría de los laboratorios, el método estándar para la determinación del nivel de linfocitos T CD4+, es la citometría de flujo. Entre sus ventajas se encuentran: exactitud, precisión, rapidez y capacidad para procesar un gran número de muestras en corto tiempo;<sup>12</sup> tiene el inconveniente de que el equipo, su mantenimiento y reactivos son muy costosos. Disponer de

AcMs conjugados, producidos en nuestro país, con la calidad requerida para este tipo de estudio, hace más económico el diagnóstico y lo garantiza para todos los pacientes VIH/SIDA, así como para el resto de la población de pacientes inmunocomprometidos.

En el presente trabajo se evaluaron los AcMs conjugados con isotiocianato de fluorescencia (Fict), producidos por el CIM (CIMAB SA, La Habana, Cuba), frente a sus similares de la casa comercial DAKO AG (Dinamarca) y su correlación en cuanto a porcentaje de reconocimiento.

## MÉTODOS

### DISEÑO

Se realizó un estudio comparativo por citometría de flujo de los AcMs-Fict ior T3, T4 y T8 comercializados por CIMAB SA, frente a sus similares de la casa comercial DAKO AG, en pacientes VIH/SIDA.

### POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio se realizó con 51 individuos VIH/SIDA provenientes del Sanatorio de Santiago de las Vegas y del IPK, tomados aleatoriamente, en los diferentes estadios de la infección y un grupo de 10 sujetos supuestamente sanos, trabajadores del IPK. Su rango de edad era de 18 a 40 años.

### COLECTA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

A cada una de las personas, entre las 9 y 10 a.m. se le tomaron 1,5 mL de sangre por punción venosa, colectada en tubos que contenían EDTA como anticoagulante. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente (22-25 °C) y se marcaron dentro de las 2 horas siguientes a su obtención.

## MARCAJE Y FIJACIÓN DE LAS CÉLULAS

Se emplearon AcMs conjugados con Fict, listos para usar, de ambas casas comerciales con sus correspondientes controles de isotipo, estos últimos usados para identificar marcaje inespecífico; también se utilizó un tubo con células solamente, de cada paciente estudiado, para descartar autofluorescencia.

Las muestras se prepararon por el método de marcaje de sangre completa y lisis de eritrocitos. El proceso se realizó a temperatura ambiente y en la oscuridad. Se utilizó el siguiente procedimiento que se describe brevemente: en tubos Falcon de  $12 \times 75$  mm, se agregaron  $10 \mu\text{L}$  de los diferentes AcMs de ambas casas comerciales y  $100 \mu\text{L}$  de sangre total, se incubaron durante 20 min. Posteriormente se agregaron 2 mL de solución de lisis, se incubaron durante 10 min e inmediatamente después se centrifugaron a  $300 \times g$  durante 7 min. Se retiró el sobrenadante y el botón de células se resuspendió en 2 mL de solución balanceada de fosfato salino con formaldehído al 1 %, se centrifugó a  $300 \times g$  durante 7 min y este lavado se repitió una vez más en iguales condiciones. Los tubos se guardaron en la oscuridad a baja temperatura ( $4-8^\circ\text{C}$ ) hasta su análisis en el citómetro, que se realizó dentro de las 3 horas siguientes.

## ANÁLISIS EN EL CITÓMETRO DE FLUJO

Se utilizó un citómetro de flujo modelo Ortho Cytoron Absolute de la compañía a Johnson & Johnson, equipado con un láser de argón (488 nm), el cual se preparó para el análisis de las muestras; se adquirieron 10 000 eventos (células), con un mínimo de 2 000 linfocitos. Para el análisis de los resultados se determinó la pureza de la

región y el porcentaje de recuperación; también se analizó la dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) de la luz, que están relacionadas con el tamaño y la complejidad interna de las células, respectivamente.

Los resultados se analizaron en gráficos de puntos (citogramas); se observó el porcentaje de células positivas para cada caso y para cada AcM usado; en cada muestra se comprobó que se cumplieran los criterios de calidad requeridos para todos los casos, entre los que están: la pureza de la región de linfocitos, que fue mayor del 90 %; el porcentaje de recuperación de linfocitos, también mayor del 90 %; y finalmente se consideró que fueran analizados como mínimo 2 000 linfocitos. En cada experimento se incluyó un sujeto supuestamente normal, para verificar el ajuste de los detectores y comprobar la discriminación adecuada de la fluorescencia empleada.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre los valores del conteo de CD3, CD4 y CD8, obtenido con los AcMs de ambas casas comerciales, además se calcularon los estadígrafos: media ( $\bar{X}$ ), desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV). Las medias para cada AcM se compararon mediante la prueba de t de Student para muestras pareadas.

## RESULTADOS

En la tabla 1 se muestra la comparación de las medias para el porcentaje de células T aplicando la prueba t de Student en muestras pareadas, para las variables CD3, CD4, CD8 de ambas casas comerciales.

TABLA 1. *Media (X), desviación estándar (DE), y coeficiente de variación (CV) en la determinación de marcadores T con anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína*

	CD3		CD4		CD8	
	ior T3	Cd3 Dako	ior T4	Cd4 Dako	ior T8	Cd8 Dako
X	72,9	73,3	14,3	15,4	55,1	55,3
DE	12,9	12,7	10,9	11,4	14,1	13,9
CV	0,17	0,17	0,76	0,74	0,25	0,25
p		0,8633		0,587		0,9372

n=61 (51 VIH + y 10 seronegativos supuestamente sanos).

En la tabla 2 se puede observar el coeficiente de correlación lineal de Pearson para cada uno de los AcMs empleados en el estudio.

TABLA 2. *Coefficiente de correlación de Pearson para los AcMs comparados*

AcMs	r	p
ior T3-Fict Dako anti Cd3	0,93	< 0,001
ior T4-Fict Dako anti Cd4	0,98	< 0,0001
T8-Fict Dako anti Cd8	0,95	< 0,001

En ambas tablas se reflejan los resultados de pacientes y controles, independientemente de que el empleo de estos últimos fue dirigido fundamentalmente a garantizar el control de calidad de las mediciones realizadas en el citómetro de flujo.

## DISCUSIÓN

Los AcMs, para usar en citometría de flujo, constituyen unos de los reactivos

esenciales más costosos en el inmuno-fenotipaje. Un frasco de anti-CD3, CD4, CD8-Fict, comercializado por DAKO AG para 100 determinaciones, tienen una cotización que oscila entre 300 y 400 USD, cada uno. El Centro de Inmunología Molecular elaboró estos AcMs conjugados con Fict, con el objetivo de comercializarlos para citometría de flujo, cuya cotización en la actualidad es de \$ 125 MN para el mercado nacional. Nuestro trabajo se encaminó a evaluar la calidad de éstos en cuanto a porcentaje de reconocimiento, para una inmediata sustitución de los comerciales por los nacionales y garantizar el diagnóstico de estas subpoblaciones linfoides a los pacientes VIH/SIDA.

Los resultados presentados en las tablas anteriores confirman la similitud en cuanto a porcentaje de reconocimiento de los AcMs-Fict de ambas casas comerciales. Es de señalar de forma significativa el resultado del coeficiente de variación obtenido para los 3 reactivos de producción nacional.

Con este trabajo se ha demostrado la calidad de los AcMs-Fict producidos en Cuba por el Centro de Inmunología Molecular, por lo que se concluyó que se pueden utilizar en el diagnóstico y monitoreo de las subpoblaciones linfoides T CD4 + y CD8 +, con un ahorro considerable al país de moneda libremente convertible y que pueden utilizarse no sólo para el caso de las personas infectadas por el VIH, sino también en otras alteraciones en que se requiera una evaluación del estado inmunológico del paciente.

## SUMMARY

In VIH infection, sequential assessment of CD3, CD4, and CD8 lymphocytes values, provide information to establishment of clinical status and prognosis of patients. Availability of optimal reagents of national manufacture to use in flow cytometry, means a saving without to affect quality. Diagnostic Laboratory of "Pedro Kourf" Institute of Tropical Medicine (IPK) to correlates percentage of lymphocytes recognized by conjugate monoclonal antibodies (MAB), produced by Center of Molecular Immunology (CMI) (CIMAB S.A. Havana, Cuba) [ior T3, T4, and T8] versus homologous of DAKO AG commercial firm (Denmark) in randomized patient's samples

in different diseases stage. Results of correlation coefficient to each MAB, using single regression were as follow: CD3=0,932; CD4=0,986; CD8=0,958. This study corroborates that conjugated MAB of ior serie (CIMAB S.A.), behaves as for recognition percentage, in similar way to that of DAKO AG commercial firm, making possible diagnosis and monitoring of HIV/AIDS Cuban patients.

*Subject headings:* FLOW CYTOMETRY; LABORATORY TECHNIQUES AND PROCEDURES; HIV INFECTIONS.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parnes J. T-cell differentiation antigens: Proteins, genes and function. *Bioessays* 1987;4(6):255-9.
2. Hanne I, Erkeller Yuksel F, Lydyard P, Deneys V, DeBruyere M. Development and malnutritional changes in human blood lymphocyte subpopulation. *Immunol Today* 1992;13(6):215-8.
3. Ortiz R, Cortés L, González C, Cortés E, Betancourt M. Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de jóvenes mexicanos sanos: estudio por medio de citometría de flujo. *Bioquímica* 1999;24(1):18-22.
4. Deenitchina SS, Ando T, Okuda S, Kinukawa N, Hirakata H, Nagashmina A, et al. Cellular immunity in hemodialysis patients: a quantitative analysis of immune cell subsets by flow cytometry. *Am J Nephrol* 1995;15(1):57-65.
5. Kuhnert M, Strohmeier R, Stegmuller M, Halberstadt E. Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998;76(2):147-51.
6. Schaberg T, Theilalacker C, Nitschke OT, Lode H. Lymphocyte subsets in peripheral blood and smoking habits. *Lung* 1997;175(6):387-94.
7. Landay AI, Ault KA, Rabinovitch PS. Clinical flow cytometry. *Ann NY Acad Sci* 1993;677:169-73.
8. Parra C, Roldán E, Rodríguez C, Pérez de Oteyza J, Oteo E, López J, et al. Reconstitución inmunológica de los linfocitos de sangre periférica en pacientes tratados con trasplante de medula ósea. *Med Clin (Barc)* 1996;106:169-73.
9. Ohwada S, Iino Y, Nakamura S, Takeyoshi I, Tanahashi Y, Izumi M, et al. Peripheral blood T cell subsets as a prognostic factor gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1994;24:7-11.
10. Giorgy JV. Characterization of T lymphocyte subset alterations by flow cytometry in HIV disease. *Ann NY Acad Sci* 1993;677:126-37.
11. Choi S, Lagakos SW, Schooley RT, Volberding PA. CD4 + lymphocytes are incomplete surrogate markers for clinical progression in persons with asymptomatic HIV infection taking zidovudine. *Ann Intern Med* 1993;118:742-3.
12. AIDS Clinical Trial Group. *Virology manual for HIV laboratories*. Bethesda:ACTG Virology Laboratory,1994:

Recibido: 6 de mayo de 1999. Aprobado: 11 de octubre de 1999.

Lic. *Liliana Pérez Toledo*. Laboratorio de Diagnóstico. Subdirección de Atención Médica. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Autopista Novia del Mediodía Km 6, La Lisa. Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf: (537)220634. Fax: (537) 246051 y 220633. e mail:iperez@ipk.sld.cu