

Producción de suero de Coombs en carneros inmunizados con globulinas humana opsonizadas

Coombs serum production in sheep immunized with human globulin opsonized

Dr. Rodisnel Rodríguez Leyva^I; Dr. Jesús Menéndez Corona^{II}; Dr. Eglis Silveira Sánchez^{II}; Dr. Dalgis Paneque Tamayo^{II}

^IInstituto de Hematología e Inmunología. Ciudad de La Habana, Cuba.

^{II}Banco de Sangre Provincial. Granma, Cuba.

RESUMEN

Se obtuvo suero antiglobulínico (Coombs) con el empleo de un inóculo consistente en un inmunocomplejo (IC) inmunoglobulina (Ig) humana-antiglobulina humana en carnero, como opsonina para favorecer la respuesta inmune. Se inmunizaron 18 carneros divididos en 3 grupos de 6: el primero y el segundo destinados a producir anti-IgG y anti-C3, respectivamente. Estos, a su vez, subdivididos en subgrupo A: en el que se empleó el método tradicional de obtención de suero de Coombs; y B: en el que se usó el adyuvante completo de Freud en la dosis inicial y el IC en la fase de mantenimiento. Al tercer grupo solo se le administró el IC puro (subgrupo A) y en una dilución 1:200 (subgrupo B). En los carneros de los subgrupos 1B y 2B se obtuvieron títulos más elevados de anti-IgG y anti-C3dg, que en los inmunizados por el método tradicional. La respuesta de anticuerpos en los animales que se inmunizaron con los IC (3A y 3B), fue más rápida y de mayor título que las obtenidas por el método tradicional (1A y 2A) o el método combinado (1B y 2B). La respuesta en el subgrupo 3B fue más prolongada, al parecer por un efecto de dosis.

Palabras clave: suero antiglobulínico, inmunización, inmunocomplejo, opsonina, suero de Coombs, adyuvante completo de Freud.

ABSTRACT

An antiglobulin serum (Coombs) was obtained using a consistent inoculum in a immunocomplex (IC) the human immunoglobulin (Ig)/human antiglobulin in the sheep by example, the opsonin to favor the immune response. Eighteen sheep were immunized divided into three groups of 6 each: The first and second aimed to produce anti-IgG and

anti-C3, respectively. In turn, these were divided into the A subgroup: in which we used the traditional method of Coombs's serum obtaining and B group in which we used the Freud's whole adjuvant in initial dose and the IC in the maintaining phase. Third group received the pure IC (A subgroup) and at a dilution of 1:200 (B subgroup). In sheeps from the 1B and 2B subgroups it was possible to obtain higher titration of anti-IgG and anti-C3dg than those immunized by means of the traditional method. The antibody response in animals immunized with the ICs (3A and 3B) was faster and of higher titration than those obtained by traditional method (1A and 2A) or the combined method (1B and 2B). The response in the 3B subgroup was lengthier apparently by a dose effect.

Key words: Antiglobulin serum, immunization, immunocomplex, opsonin, Coombs's serum, Freud's whole adjuvant.

INTRODUCCIÓN

En las anemias hemolíticas, la destrucción de los hematíes ocurre por diferentes causas; una de ellas es la mediada por anticuerpos clasificada como anemia hemolítica inmune (AHI).^{1,2} La detección de inmunoglobulinas (Igs) y complemento en la membrana de los hematíes y de los anticuerpos anti-eritrocitarios en el suero de estos pacientes, es un proceder muy empleado en inmunohematología para hacer el diagnóstico serológico de esta entidad.

Con este fin, desde el año 1945 hasta la actualidad, se utiliza la prueba de antiglobulina humana (PAG), descrita por Coombs.³ Para la óptima realización de esta técnica es necesario contar con un juego de reactivos poliespecíficos y monoespecíficos, generalmente policlonales, y un panel de células fenotipadas.⁴⁻⁸ Los sueros monoespecíficos reconocen las Igs (especialmente la IgG) o el complemento, sobre todo el fragmento C3dg; y los poliespecíficos reconocen ambas especificidades.⁹ En el caso de los policlonales, los reactivos se obtienen del suero de animales inmunizados con Igs y C3 humanos purificados o mediante el uso de suero total como inmunógeno, lo que es menos conveniente. Este procedimiento se hace siguiendo normas internacionales con el objetivo de preservar la confiabilidad y reproducibilidad del ensayo.^{4,10,11}

El método tradicional de obtención del suero de Coombs consiste en inmunizar los animales con Igs y complemento utilizando como adyuvante para ambos inmunógenos, el adyuvante completo de Freud (ACF) en la primera dosis, y el adyuvante incompleto de Freud (AIF) en dosis sucesivas.^{4,9,12}

Uno de los componentes del ACF es el bacilo de Calmette Gueri, cuya disponibilidad no es frecuente y su manipulación resulta riesgosa, puesto que la auto-inoculación de forma accidental, puede tener consecuencias que van desde el granuloma hasta una vasculitis local o sistémica. Además, el proceder es laborioso y puede generar en el animal un granuloma que con frecuencia se infecta y pone en riesgo su salud.^{3,7}

La opsonización de antígenos (Ags) extraños es una de las funciones de las Igs, mediante la cual se facilitan la fagocitosis y la formación de inmunocomplejos (IC) circulantes que participan en el proceso de regulación y formación de células de memoria, así como en la maduración de la afinidad en los centros germinales de los órganos linfáticos secundarios. De este modo, hacen que la respuesta frente a estos Ags sea más eficiente.^{9,13}

En el presente trabajo se inocularon IC formados por Igs humanas opsonizadas (IHO) y C3dg opsonizado, como una alternativa para lograr mayores títulos de anticuerpos y una respuesta más perdurable.

MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se seleccionaron 18 carneros que se dividieron en 3 grupos, cada uno de 6 animales. Los grupos 1 y 2 se destinaron a la producción de anti-IgG y anti-C3, respectivamente. En cada grupo se seleccionaron 3 carneros para formar un subgrupo A, en el que se empleó el método de obtención tradicional;¹² con los restantes se formó el subgrupo B, en el que se usó el ACF en la dosis inicial y el IC en la fase de mantenimiento. El tercer grupo se destinó también a producir anti-IgG, pero solo se le administró el IC en suero puro (subgrupo A) y en una dilución 1:200 (subgrupo B), sin ACF ni AIF en ninguna de las dosis.

Como fuente de inmunoglobulinas humanas se empleó una mezcla de suero de 3 pacientes con mieloma IgG, suministrado por el Departamento de Inmunoquímica del Instituto de Hematología e Inmunología (IHI).

El inmunógeno C3 del complemento fue preparado por el método de la inulina, destinado a obtener un suero monoespecífico anti-C3 con actividad anti-C3dg.¹⁴

Las opsoninas se obtuvieron a partir de un suero antiglobulínico poliespecífico de referencia obtenido en carnero y suministrado por el Departamento de Inmunoematología del IHI.

Tanto el ACF como el AIF fueron obtenidos manualmente en el laboratorio siguiendo las indicaciones de *Margni*.¹² Los inmunocomplejos se prepararon al mezclar el inmunógeno con el suero antiglobulínico poliespecífico de referencia a partes iguales seguido de una incubación a 37 °C durante 1 hora. Finalmente, se inoculó 1 mL de esta mezcla a los carneros según el esquema de inmunización. Se consideró como tiempo cero (T0) el día de la primera dosis; la segunda dosis fue a los 24 días (T1); la tercera a los 1,5 meses (T2); la cuarta a los 2 meses (T3); la quinta a los 3 meses (T4); y la última dosis fue a los 5 meses (T5). Para el monitoreo de la producción de anticuerpo por los animales se extrajo sangre cada vez que se inmunizó.

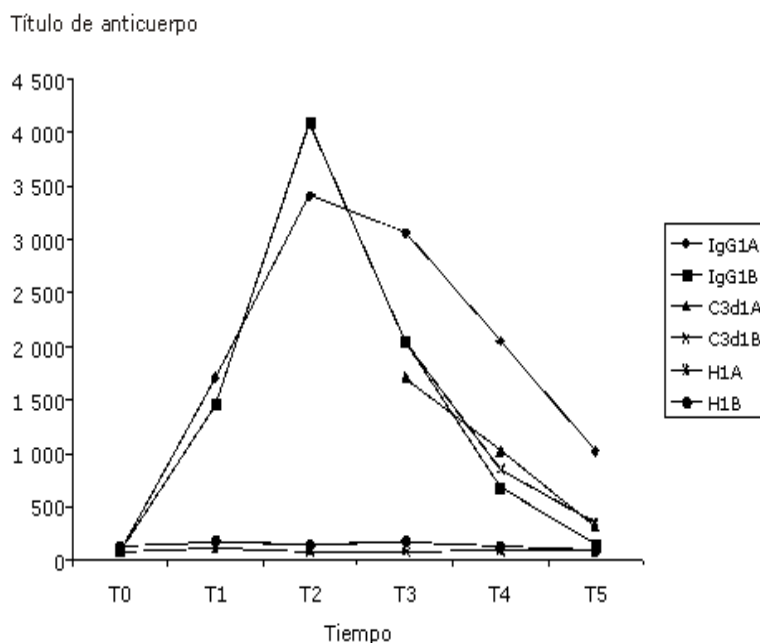
Para medir la concentración de anticuerpo anti-IgG en los animales inmunizados se usó el método de la titulación por diluciones dobles del suero, las que se enfrentaron a una suspensión al 5 % de eritrocitos humanos RhD positivos sensibilizados con anticuerpos IgG anti-D policlonal. Para la actividad anti C3dg se emplearon hematíes sensibilizados con esta inmunoproteína a partir del tiempo 3.

Para determinar la presencia de heteroaglutininas se usaron hematíes de los grupos O, A y B. La metodología seguida para todas estas determinaciones cumplió las recomendaciones de la OMS (Organización Mundial de la Salud) y el FDA (*Food and Drug Administration*, EE.UU.), así como las regulaciones emitidas por el CECMED (Centro para el Control de la Calidad de los Medicamentos, Cuba).¹⁵

La dinámica de la respuesta en los animales se caracterizó mediante una curva para cada subgrupo, confeccionada en la versión electrónica 6 del programa *Statistic*. Para ello se utilizó la media de los títulos de anti-IgG y anti-C3dg observados en los carneros de cada subgrupo y en cada tiempo, calculada por el método del logaritmo de base 2.

RESULTADOS

En la figura 1 se observan los resultados obtenidos en los carneros del grupo 1 destinados a la elaboración de anti-IgG. La producción de anti-globulina humana generada en los carneros vacunados con IC aumentó de forma similar a la de los animales vacunados por el método tradicional. Sin embargo, los títulos al final del estudio disminuyeron a concentraciones similares a las iniciales.

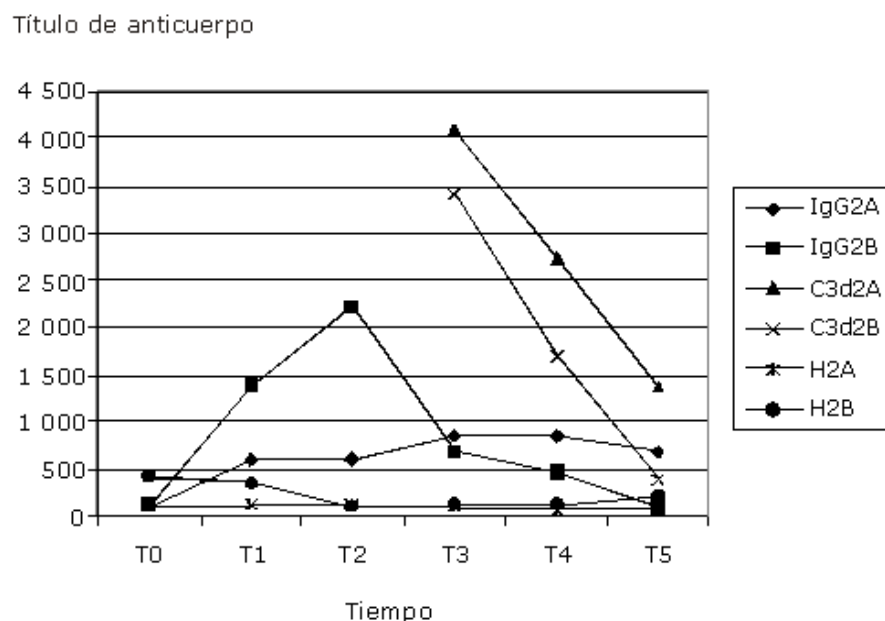


T0: tiempo 0, el día de la primera dosis; T1: segunda dosis (24 días); T2: tercera dosis (1,5 meses); T3: cuarta dosis (2 meses); T4: quinta dosis (3 meses); T5: última dosis (5 meses).
 IgG1A: título de anticuerpos anti-IgG del subgrupo 1A; IgG1B: título de anticuerpos anti-IgG del subgrupo 1B;
 C3d1A: título de anticuerpos anti-C3dg del subgrupo 1A; C3d1B: de anticuerpos anti-C3dg del subgrupo 1B;
 H1A: heteroaglutininas del subgrupo 1A; H1B: heteroaglutininas del subgrupo 1B.

Fig. 1. Dinámica de respuesta de anticuerpos anti-IgG, anti-C3dg y heteroaglutininas en carneros destinados a producir anti-IgG.

Se verificaron títulos elevados de anti-C3dg en ambos subgrupos, superiores en los animales en que se empleó el inmunógeno opsonizado. Al igual que en los de anti-globulina humana, estos disminuyeron hasta los valores iniciales.

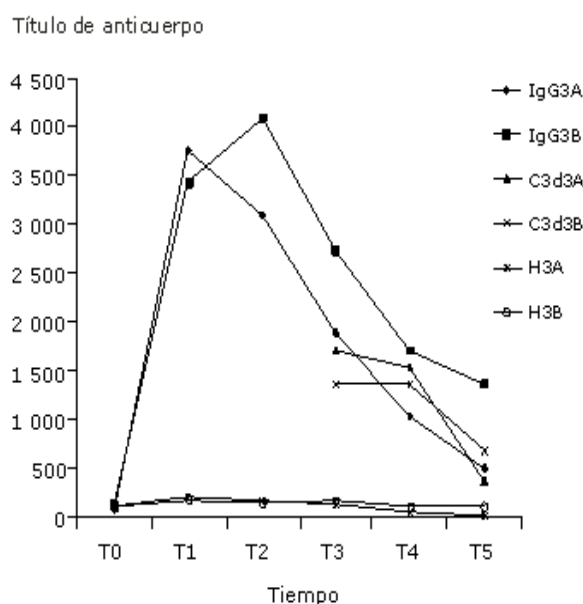
En los animales del grupo 2 destinados a la producción de anti-C3dg, se observó que en los que se empleó el C3 opsonizado, los niveles de anti-globulina fueron superiores al de los animales en los que se empleó el método tradicional (fig. 2). A pesar que se alcanzaron altas concentraciones de anti-C3dg en el subgrupo en el que se usó el C3dg opsonizado, se observó una disminución a los valores iniciales.



T0: tiempo 0, el día de la primera dosis; T1: segunda dosis (24 días); T2: tercera dosis (1,5 meses); T3: cuarta dosis (2 meses); T4: quinta dosis (3 meses); T5: última dosis (5 meses).
 IgG2A: título de anticuerpos anti-IgG del subgrupo 2A; IgG2B: título de anticuerpos anti-IgG del subgrupo 2B;
 C3d2A: título de anticuerpos anti-C3dg del subgrupo 2A; C3d2B: de anticuerpos anti-C3dg del subgrupo 2B;
 H2A: heteroaglutininas del subgrupo 2A; H2B: heteroaglutininas del subgrupo 2B.

Fig. 2. Dinámica de respuesta de anticuerpos anti-IgG, anti C3dg y heteroaglutininas en carneros destinados a producir anti-C3dg.

En los carneros del grupo 3 que se inmunizaron solamente con IHO ([fig. 3](#)), en solo 24 días se obtuvo una producción de anti-globulina que alcanzó niveles tan elevados como los encontrados a los 1,5 meses por el método tradicional.



T0: tiempo 0, el día de la primera dosis; T1: segunda dosis (24 días); T2: tercera dosis (1,5 meses); T3: cuarta dosis (2 meses); T4: quinta dosis (3 meses); T5: última dosis (5 meses).
 IgG3A: título de anticuerpos anti-IgG del subgrupo 1A; IgG3B: título de anticuerpos anti-IgG del subgrupo 1B;
 C3d3A: título de anticuerpos anti-C3dg del subgrupo 1A; C3d3B: de anticuerpos anti-C3dg del subgrupo 1B;
 H3A: heteroaglutininas del subgrupo 3A; H3B: heteroaglutininas del subgrupo 3B.

Fig. 3. Dinámica de respuesta de anticuerpos anti-IgG, anti C3dg y heteroaglutininas en carneros inmunizados solamente con inmunoglobulinas humanas opsonizadas.

En el subgrupo en el que se diluyó el inmunógeno no se afectó la dinámica en la producción de anticuerpos y los valores de anti-globulina al final del estudio se mantuvieron superiores a los de aquellos en los que se usó el inóculo puro.

La producción de Acs específicos superó a la de los heteroanticuerpos en los 3 grupos (figuras 1, 2 y 3).

DISCUSIÓN

No se conocen comunicaciones previas que permitan comparar los resultados obtenidos con los esquemas utilizados en este estudio.

La presencia de anti-C3dg se ha encontrado en suero de animales inmunizados con suero total. Esta actividad impide obtener suero de Coombs mono específico anti-IgG, ya que es difícil eliminar estos anticuerpos por adsorción.⁴ Es por ello que es necesario utilizar un inmunógeno purificado para la obtención de anti-IgG,^{4,12} preferentemente las cadenas pesadas de esta inmunoglobulina. Sin embargo, la presencia de anti-IgG humana en el grupo destinado a la producción del suero mono específico anti-C3dg, no constituyó una dificultad, ya que esta actividad puede neutralizarse con el empleo de hematíes insuficientemente lavados necesarios para la adsorción de las heteroaglutininas.⁴

Los niveles de anti-globulina alcanzados en los carneros inmunizados con inmunoglobulina humana y C3 opsonizados, pusieron de manifiesto la capacidad adyuvante de estas opsoninas.

La caída de los niveles de anticuerpos generados por los IC que se observó en los grupos 1 y 2 en el transcurso del estudio podría estar relacionada con un efecto regulador producido por la concentración de inmunocomplejos libres sobre las células B, que se describe como dependiente de la dosis.^{9,13} Este efecto fue más evidente al observar que los niveles de anticuerpos se mantuvieron estables en el subgrupo 3B, donde el inmunógeno fue diluido 200 veces. Algunos autores consideran que los inmunocomplejos desempeñan un papel importante en la maduración de la afinidad de los linfocitos B en los centros germinales de los folículos linfoides, presentes en los órganos linfoides periféricos.^{9,13}

Se ha demostrado que el aumento de la concentración de anticuerpos en las respuestas inmunes secundarias se debe a la estimulación de células de memoria que mantienen bajos niveles de Acs. Los anticuerpos en bajas concentraciones potencian la respuesta al actuar como opsoninas y formar IC, que al depositarse en las células dendríticas foliculares, presentan Acs a los linfocitos B. Esto puede explicar por qué en los animales vírgenes se obtuvo una respuesta a corto plazo y con niveles similares a los observados en los carneros previamente inmunizados. En muchos experimentos se ha demostrado que dosis muy elevadas de inmunógeno pueden generar tolerancia,^{9,13} por lo que la caída de los niveles de anticuerpos anti-globulínicos en los carneros vacunados con IC, pudiera responder a que la dosis de IHO utilizada fue muy elevada para las dosis de mantenimiento.

La producción de heteroaglutininas no se potenció debido a que el suero de carnero que se utilizó para opsonizar los inmunógenos estaba adsorbido con glóbulos humanos.

Las observaciones realizadas en este trabajo sugieren que el empleo de IC en bajas concentraciones como fuente de inmunógeno, ofrece una alternativa en la producción de suero de Coombs, con la que se obtiene una respuesta de Acs anti-IgG y anti-C3 más rápida y de mayor concentración que la observada cuando se utiliza el ACF.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gehrs BS, Friedber EC. Autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol* 2002;69:258-71.
2. Petz LD, Garratty G. Immune hemolytic anemias. 2 ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004.
3. Coombs RRA, Mourant AE, Race RR. A new test for detection of weak and "incomplete" Rh antibodies. *Brit J Exp Pathol* 1945;25:255.
4. Issit PD, Smith TR. Evaluation of antiglobulin reagents. A seminar on performance evaluation. Washington DC: American Association of Blood Banks; 1976. pp. 25-73.
5. The department of health and Social Security. Health Service Management Antiglobulin Test. False negative results, HN (Hazard) (83) 625 Nov 1983.
6. Wright MS, Issit PD. Anti-complement and the indirect antiglobulin test. *Transfusion* 1979;19:688-94.
7. Howard JE, Winn LC, Gottlieb CE, Grumet FC, Garratty G, Petz LD. Clinical significance of de anti-complement components of antiglobulin antisera. *Transfusion* 1982;22:269.
8. Howell P, Giles CM. A detailed serological study of five anti-Jk3 sera reacting by antiglobulin technique. *Vox Sang* 1983;45:129- 38.

9. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Inmunología Básica y Clínica. 11 ed. México DF: El Manual Moderno; 2007.
10. Engelfriet CP, Overbecke MAM, von dem Borne AEGKr. Autoimmune hemolytic anemia. Sem Hematol 1992;29:3-12.
11. Voak D, Downie DM, Moore BPL, Ford DS, Engelfriet CP, Case J. Replicate test for the detection and correction of error in anti-human globulin (AHG) test: Optimum conditions and quality control. Hematology 1988;21(1):3-16.
12. Margni RA. Inmunología e Inmunoquímica. La Habana. Ediciones Revolución; 1982.
13. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology. 4 ed. Madrid: WB Saunders; 2002.
14. Engelfriet CP, Holburn AM, Leikola J, Lothe F. The production of anti-human globulin reagent for use in Inmunohematology. Lab/84.1, WHO, 1992.
15. Resolución 5. Recomendaciones para la evaluación de los diagnosticadores para uso en Inmunohematología. CECMED. Cuba, 1997.

Recibido: 8 de junio del 2010.

Aprobado: 22 de junio del 2010.

Dr. *Rodisnel Rodríguez Leyva*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, Ciudad de La Habana, CP 10800, Cuba. Tel (537) 643 8695, 643 8268, Fax (537) 644 2334. e-mail: ihidir@hemato.sld.cu

Website: <http://www.sld.cu/sitios/ih>