
Trabajo Original

Producción de un anticuerpo de conejo anti-glóbulos rojos de carnero para utilizarlo en la valoración de la Actividad Hemolítica del Complemento (CH50).

Production of an anti-ram erythrocyte rabbit antibody for use in haemolytic activity assessment of CH 50 complement.

Dr. Arístides Lázaro Brito Machín¹, Dr. David Luna González², Téc. Jorge Méndez García³, Dr. Carlos Zaballa Martínez de Aparicio⁴

1. Especialista de primer grado en Laboratorio Clínico. Profesor Instructor
2. Especialista de primer grado en Inmunología Clínica. Profesor Instructor.
3. Técnico Medio en Veterinaria
4. Especialista de primer grado en Laboratorio Clínico. Profesor Asistente

RESUMEN

La valoración de la Actividad Hemolítica del Complemento (CH50) constituye un medio diagnóstico en el que se mide la capacidad de la vía clásica del complemento para lisar eritrocitos de carnero óptimamente sensibilizados con un anticuerpo anti-eritrocitos de carnero (hemolisina), cuya actividad esta en función de la cantidad y calidad de cada una de los componentes proteicos del complemento. Con el propósito de obtener una hemolisina capaz de sensibilizar adecuadamente a los eritrocitos de carnero, se sometieron a conejos adultos a inoculaciones repetidas y crecientes de antígeno de Forssman presentes en la superficie celular de los hematíes de carnero con lo cual se lograron inmunizar a los conejos contra este antígeno y obtener un anticuerpo en conejo contra eritrocitos de carnero, el cual fue titulado obteniéndose una dilución de 1:200 como título óptimo para la sensibilización de los eritrocitos de carnero, y su posterior utilización en la Valoración de la Actividad Hemolítica del Complemento.

DeCS: ENSAYO DE ACTIVIDAD HEMOLITICA DE COMPLEMENTO, HEMOLISINAS.

ABSTRACT

The assessment of the haemolytic activity of complement (CH50) is a diagnostic means used to measure the capacity of the classic route of the complement to lyse ram erythrocytes optimally sensitized with an anti- ram erythrocyte antibody (haemolysin) whose activity depends on the quantity and quality of each of the proteinic components of the complement. With the purpose of obtaining a haemolysin able to sensitize appropriately ram erythrocytes adult rabbits were subjected to repeated and increasing inoculations of Forssman antigen present in the cellular surface of ram erythrocytes with which it was possible to immunize the rabbits against this antigen and to obtain a rabbit antibody against ram erythrocytes, which was titled , with a dilution of 1:200 being obtained as an optimum title for sensitizing ram erythrocytes, and their later use to assess the haemolytic activity of the complement.

MeSH: COMPLEMENT HEMOLYTIC ACTIVITY ASSAY, HEMOLYSINS.

INTRODUCCIÓN

El complemento es un sistema complejo, constituido por proteínas denominadas componentes del complemento y designadas con la letra C. Los componentes protéicos son sintetizados por el hígado y están normalmente presentes en la sangre como moléculas funcionalmente inactivas ¹. El complemento es muy importante como parte de los mecanismos de defensa contra infecciones ². Una secuencia de interacciones puede ser activada por formación de complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) a través de la vía clásica o por sustancias sin función de anticuerpo a través de la vía alternativa, o de la properdina. Sea por una u otra vía de activación, los componentes del complemento una vez activados, interactúan unos con otros, y con las membranas celulares en una compleja pero controlable vía que termina en la lisis de la célula comprometida ¹. Sin embargo la acción del complemento no siempre es beneficiosa. La potente reacción mediada por este sistema complejo no siempre actúa normal y puede escapar a los mecanismos de control causando serios daños a las propias células del huésped ³.

El estudio del complemento como auxiliar diagnóstico es importante. Los niveles del complemento fluctúan en diferentes procesos de enfermedad. Las alteraciones más frecuentes del complemento son aumentos de su nivel, pues casi todos sus componentes actúan como reactantes de fase aguda. Sin embargo, la principal aplicación clínica de los análisis del complemento es la detección de individuos con niveles disminuidos para determinar la presencia, el grado y las posibles consecuencias de un proceso inmune activo ^{1, 4, 5}.

Los análisis de laboratorio para valorar el sistema del complemento son varios y cada laboratorio debe determinar el o los sistemas de análisis más apropiados para su aplicación.

Los métodos más apropiados para la valoración del complemento en nuestro medio son los que se basan en la determinación del efecto citotóxico de los componentes del complemento sobre los glóbulos rojos (GR) específicamente sensibilizados, lo que es conocido como Actividad Hemolítica del Complemento (CH50) ^{6, 7, 8}. La unidad hemolítica 50% o CH50 corresponde al recíproco de la dilución del suero capaz de lisar el 50% de las células óptimamente sensibilizadas. Como cada una de las 11 proteínas de la vía clásica es necesaria para la hemólisis, en este análisis se mide la capacidad de los componentes de la vía clásica del complemento para lisar eritrocitos de carnero sensibilizados con cantidades óptimas de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero (hemolisina) ^{6, 9, 10}.

Es fundamental para la valoración de la Actividad Hemolítica del Complemento sensibilizar adecuadamente a los glóbulos rojos de carnero con hemolisina de forma que el anticuerpo anti-eritrocitos de carnero se fije adecuadamente a los eritrocitos de carnero (sensibilización) ^{6, 9, 10}. La posterior unión de los componentes del complemento a la hemolisina sobre la superficie de los hematíes de carnero desencadena la activación de la vía clásica del complemento que termina con la lisis de los glóbulos rojos y la liberación de hemoglobina proporcionalmente al número de células lisadas. A veces esto resulta tarea difícil, en especial, por las características antigénicas de los GR de carnero utilizada para inmunizar los conejos y obtener la hemolisina.

La hemolisina se obtiene por inmunización de conejos adultos con eritrocitos de carnero, pudiéndose utilizar los glóbulos de conejo enteros o el estroma celular. Cuando se preparan hemolisinas por los métodos utilizados el producto final obtenido difieren en cuanto a calidad. Esto se debe a que los glóbulos del carnero tienen dos grupos de antígenos: los isófilos, termolábiles y destructibles por el calor a 100°C y los heterófilos, termoestables correspondientes a los antígenos de Forssman. En el caso de inmunización con glóbulos de rojos intactos se obtienen anticuerpos contra antígenos isófilos y heterófilos los que dificultan la estandarización de los ensayos de medición de la Actividad Hemolítica del Complemento, mientras que cuando la inmunización se hace con estroma celular, los anticuerpos formados son anti-Forssman del tipo inmunoglobulina M, que son las hemolisinas que deben ser utilizadas en los estudios de inmunohemólisis ^{6, 9, 10}.

La técnica de producción de hemolisinas se ha llevado a cabo en varios laboratorios a escala mundial. En Cuba su producción fue realizada a escala no comercial en el Instituto de Hematología e Inmunología de Ciudad de la Habana el cual transfirió la tecnología al Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX), centro con capacidad productiva, pero aún con limitaciones en cuanto a transportación, entrega segura y oportuna, por lo que dada la necesidad de contar con un procedimiento de laboratorio que permita evaluar la vía clásica del complemento sirvió de fundamento para la producción en este centro de la hemolisina de conejo anti-glóbulos rojos de conejo imprescindible para la valoración de la Actividad Hemolítica del Complemento y de esta forma resolver las necesidades territoriales en lo que se dispone del producto para la cobertura nacional.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un trabajo de carácter experimental, en el Laboratorio Provincial de Inmunología con sede en la Facultad de Ciencias Médicas de Sancti Spiritus. La investigación se realizó en dos etapas. Una primera en la que sometimos a conejos adultos a inoculaciones repetidas y crecientes de antígeno de Forsman presentes en el estroma celular de los glóbulos rojos de carnero previamente calentados con lo que se logró sensibilizarlos y obtener anticuerpos de conejo anti-glóbulos rojos de carnero (hemolisina). En un segundo momento se comprobó si esta hemolisina era capaz de unirse a los eritrocitos de carnero y sensibilizarlos por lo que se tituló la hemolisina midiendo directamente la hemólisis provocada sobre los correspondientes hematíes en presencia del complemento.

Obtención de la hemolisina (anticuerpo de conejo anti-glóbulos rojos de carnero) para la determinación de la Actividad Hemolítica del Complemento (CH50)^{6, 9, 10}.

Obtención de la suspensión de estroma de glóbulos rojos de carnero.

Se obtuvo sangre de carnero en un frasco estéril con solución anticoagulante y teniendo en cuenta todas las medidas de asepsia y antisepsia. Después de varios lavados con solución salina fisiológica 0,85%, los glóbulos rojos de carnero fueron lisados en ácido acético al 2% y el estroma celular fue lavado múltiples veces con buffer acetato 0,0001 Molar, pH5,0±0,05. La suspensión celular así preparada se colocó en un Erlenmeyer pyrex y se calentó durante una hora a 100°C por inmersión en un baño de agua hirviendo. La suspensión fue enfriada y transferida asepticamente a un recipiente estéril.

Inoculación de los conejos con el estroma celular de los glóbulos rojos de carnero.

Después de afeitar y limpiar con alcohol la piel de una de las orejas del conejo, se localizó y canalizó la vena marginal por donde se le administró muy lentamente la dosis establecida según el esquema de inoculación. Después de realizar esto se observó el animal por un tiempo prudencial.

Esquema de sensibilización⁶.

Inyectar por vía endovenosa 0,1 ml de la suspensión celular.

Inyectar cada 2 días 1 ml de la suspensión, hasta un total de 5 inyecciones.

Inyectar cada 2 días 2 ml de la suspensión, hasta un total de 5 inoculaciones.

Obtención y conservación del suero de conejo.

Cuatro o cinco días después de la última inyección se le extrajo sangre y se obtuvo el suero agregándosele un volumen igual de glicerina (dilución 1:1) y colocó en refrigeración (4°C) donde se preserva por largos periodos.

Titulación de la hemolisina^{6, 9, 10}.

Para determinar la cantidad de anticuerpo que debía ser usado para recubrir óptimamente los glóbulos rojos de carnero, el anticuerpo (hemolisina) debe ser titulado. Diluciones seriadas de la hemolisina fueron incubadas con cantidades constantes de glóbulos rojos de carnero. Después de la incubación con las diluciones de hemolisina, los glóbulos rojos fueron mezclados con una cantidad constante de complemento (suero de un paciente sano) a una concentración predeterminada que lisa un 50% aproximadamente de los glóbulos rojos recubiertos, e incubados de nuevo. Después de este tiempo los eritrocitos lisados fueron removidos por centrifugación, y el porcentaje de células lisadas se estimó por la liberación de hemoglobina en el sobrenadante. Usando papel gráfico semilogarítmico (semilog.), las diluciones de hemolisina (variable independiente, X) fueron plateados en la escala logarítmica, contra el porcentaje de células lisadas (variable dependiente, Y) ploteado en la escala lineal, y el punto de máxima lisis fue determinado (donde la línea alcance una meseta o pico). En este punto de meseta, las células estaban sensibilizadas al máximo. La concentración óptima fue definida como 2 veces el valor del punto de meseta, para garantizar un exceso de anticuerpos, y que estos no constituyan un factor limitante en la valoración de CH50.

Preparación de las diluciones de hemolisina.

Se prepararon diluciones de hemolisina 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000, 1:2000, 1:2500, 1:3000, 1:4000, 1:8000, usando como diluyente buffer veronal gelatina (BVG²⁺).

Preparación de los glóbulos rojos de carnero.

Se tomaron 5 ml de sangre de carnero conservadas durante 5 a 7 días en solución de Alsever, y se le adicionó 45 ml de BVG²⁺. Se mezcló bien y después de varios lavados en BVG²⁺ se desechó el sobrenadante y se reconstituyó el sedimento con BVG²⁺ hasta hacer una suspensión celular al 5% (1×10^9 células/ml).

Preparación y conservación de la fuente de complemento.

Se obtuvo sangre no coagulada, de un sujeto supuestamente sano, de la cual se obtuvo el suero, y se almacenó a -70°C, donde las proteínas del complemento se conservan durante mucho tiempo^{11, 12}.

Sensibilización de los glóbulos rojos de carnero.

Se mezclaron rápidamente por agitación constante, 0,2 ml de la suspensión celular de glóbulos rojos de 1×10^9 /ml con cada 0,2 ml cada una de las diluciones de hemolisina preparadas con anterioridad y se incubaron por 15 minutos a 37°C, para lograr una óptima unión de la hemolisina con los glóbulos rojos de carnero (sensibilización).

Procedimiento de titulación.

Después de sensibilizar los glóbulos rojos (GR) con hemolisina, la suspensión celular quedó a una concentración de 5×10^8 células/ml. Posteriormente se diluyó el suero humano normal (fuente de complemento) 1:30 con BVG²⁺ y se procedió a la titulación como se ilustra en la siguiente tabla No. 1.

Todos los tubos fueron incubados por 1 hora a 37°C. Los tubos 10,11 y 12 son los controles del ensayo (control de hemolisina, fondo común, y 100% de lisis), respectivamente).

Una vez concluido el período de incubación, cada tubo fue sometido a centrifugación y la densidad óptica (DO) del sobrenadante se leyó a 541 nm. Se calculó la fracción de células lisadas (Y), sustrayéndole la DO del fondo común de lisis (tubo No. 11) a cada valor de DO de cada una de las muestras y dividiendo el resultado entre la DO del tubo control con 100% de lisis tal como se expresa a continuación:

$$Y = \frac{[DO \text{ de la muestra} - DO \text{ del fondo común}]}{[DO \text{ del } 100\% \text{ de lisis} - DO \text{ del fondo común}]}$$

Una vez realizada la titulación inicial de la hemolisina, la misma fue titulada mensualmente hasta su total utilización, para evaluar su estabilidad en el tiempo, y eliminarla en caso de variar su titulación.

Además, una vez que se comenzó a utilizar la hemolisina en el trabajo diario del laboratorio, se escogieron aleatoriamente 52 sueros de pacientes con indicación estudio de la Actividad Hemolítica del Complemento, y se le realizó, a ciegas CH50, tanto con la hemolisina obtenida por nosotros, como utilizando la recibida de LABEX. A los resultados se les realizó estudio de correlación lineal de Pearson, y se la aplicó el test t de student para demostrar estadísticamente si existían diferencias significativas entre los dos resultados.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete SPSS, y se trabajó con un nivel de significación de $\alpha=0,05$. Los resultados se muestran en tablas.

RESULTADOS

El porcentaje de lisis del fondo común fue del 3%; resultado este satisfactorio ya que el porcentaje de lisis del fondo común no debe ser superior al 5% del total de lisis ($Y \leq 0,05$) y el tubo con hemolisina pero que no tenía complemento (tubo No. 10) fue del 4% siendo también aceptable ya que no debe ser superior al 10% del total de lisis ($Y \leq 0,10$).

Usando papel gráfico lineal, se ploteó el porcentaje de lisis en el eje de las Y y la dilución de hemolisina (1/dilución de hemolisina) en el eje de las X. La concentración óptima fue definida como la dilución de hemolisina donde la región de la meseta se une con la parte descendiente de la curva. Los resultados ploteados fueron lineales en el rango de diluciones de hemolisina que se encontraban por debajo de la concentración óptima (hasta la zona de la meseta).

La concentración a usar para la sensibilización de los glóbulos rojos de carnero fue definida como dos veces la concentración óptima. En nuestro experimento la concentración óptima de hemolisina fue de 1:400 (ver tabla No. 2) por lo que debíamos utilizar una concentración de 1:200 para la sensibilización óptima de los glóbulos rojos de carnero.

Una vez titulada se comenzó a realizar los estudios de la Actividad Hemolítica del Complemento de los pacientes que, con indicación de CH50, asistían al Laboratorio de Inmunología con sede en la Facultad de Ciencias Médicas de Sancti Spíritus. Los resultados de los CH50 obtenidos utilizando la hemolisina producida por nosotros no se diferenciaron significativamente de la producido por LABEX, y la correlación fue excelente ($r=0,86$).

Además el estudio de estabilidad en el tiempo, demostró que no hubo cambio en la concentración óptima necesaria para la sensibilización adecuada de los glóbulos rojos de carnero. Después de 10 meses de uso, la hemolisina diluida 1:400 seguía consiguiendo la máxima lisis de los glóbulos rojos durante la titulación de la misma.

DISCUSIÓN

Los resultados demostraron que se logró una adecuada sensibilización de los conejos con el estroma celular de los glóbulos rojos de carnero, con la obtención de la hemolisina, de modo que contábamos con una hemolisina de excelente calidad y estabilidad. Una vez que la titulación fue realizada, esta no varió durante su conservación a -70°C . La fuente de glóbulos rojos de carnero no fue cambiada, por lo que no fue necesario repetir la titulación de la hemolisina con nuevas células.

Cuando se iba a valorar la Actividad Hemolítica del Complemento en el suero de un determinado paciente se mezclaban volúmenes iguales de hemolisina diluida 1:200 con glóbulos rojos de carnero a una concentración de 1×10^9 células/ml, se incubaba por espacio de 15 minutos a 37°C y se le añadía suero del paciente a investigar, el cual provocaría la lisis de los hematíes en función de la cantidad y calidad de los componentes de la vía clásica del complemento.

El análisis estadístico demostró que la hemolisina producida en este laboratorio, era de calidad comparable con la producida a escala industrial en los laboratorios LABEX de Santiago de Cuba, lo que apoyaba los éxitos de la producción a escala del laboratorio.

CONCLUSIONES

Se logró la sensibilización adecuada de los conejos con el estroma celular de los glóbulos rojos de carnero. Se obtuvo un anticuerpo en conejo anti-glóbulos rojos de carnero capaz de sensibilizar óptimamente a los glóbulos rojos de carnero. El título de hemolisina necesario para la sensibilización adecuada a los glóbulos rojos de carnero fue de 1:200. La hemolisina se mantuvo sin variación en su actividad sensibilizante durante un período de 10 meses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kuby J. The complement system. En: Kuby J. Immunology. New York: W H Freedman and Company; 1994.p.393-415.
2. Cecon ME, Diniz EM, Carneiro-Sampaio MM, Arslanian C, Diogo CL, Ramos JL, Vaz FA. [Immunological behavior (IgG, IgM, IgA) and total complement (CH50) of newborns infants with risk factors for early onset sepsis. Comparative analysis of newborns with and without infection]. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo. 1998; 53(6):303-310.
3. Silverman LM, Chistenson RH. Amino Acids and Protein. En: Burtis CA, Aswood ER. Tietz. Fundamentals of Clinical Chemistry. 4ta ed. Philadelphia : JB. Lippincott Company; 1996 .p.511-512.
4. Suyehira LA, Gewurz H. Complemento. En: Sonnewirt AC, Jarett L. Gradwohl Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico. La Habana: Científico Técnica; 1983. p.1131-1135.
5. Tanaka H, Yamakami K, Honjo S, Umeda T, Wakabayashi K, Oda T, Yoshizawa N. Complement activity among individuals at a ground self-defense force base. Nippon Eiseigaku Zasshi. 2001; 56(3):588-594.
6. Magni RA. Complemento. En: Magni RA. Inmunología e Inmunología Fundamentos. La Habana: Científico Técnico; 1982.p.206-207.
7. Jaskowski TD, Martins TB, Litwin CM, Hill HR. Comparison of three different methods for measuring classical pathway complement activity. Clin Diagn Lab Immunol. 1999; 6(1):137-139.
8. Ferriani VP, Barbosa JE, de Carvalho IF. Complement haemolytic activity (classical and alternative pathways), C3, C4 and factor B titres in healthy children. Acta Paediatr. 1999; 88(10):1062-1066
9. Harbeck RJ, Giclas PC. Diagnostic Immunology Laboratory Manual. New York: Raven Press; 1991.
10. Gaither TA, Frank MM. Complement. En: Henry JB. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Philadelphia : W.B. Sanders; 1991. p.830-846.
11. Kobayashi E, Kitano E, Kondo-H, Kitamura H. Complement activation in citrate plasma-inhibitory effect of anticoagulants on serum complement activation]. Rinsho Byori .1999; 47(2):160-164.
12. Souda N, Fujioka T, Kondou Y, Baba S, Hiwatashi S, Sibayama A, Katori S, Warabi H. [Studies on the conditions of blood sampling and storage for the liposome-based CH50 assay]. Rinsho Byori.. 1998; 46(10):1049-1055

ANEXOS

Tabla No. 1. Sumario del procedimiento de titulación de la hemolisina.

Tubos.	GR de carnero sensibilizados	Hemolisina	Volumen de hemolisina	BVG ² .	suero normal	Agua destilada
1	0,1 ml.	1:200	0,1 ml.	1,1 ml.	0,1 ml.	-
2	0,1 ml.	1:400	0,1 ml.	1,1 ml.	0,1 ml.	-
3	0,1 ml.	1:800	0,1 ml.	1,1 ml.	0,1 ml.	-
4	0,1 ml.	1:1000	0,1 ml.	1,1 ml.	0,1 ml.	-
5	0,1 ml.	1:1200	0,1 ml.	1,1 ml.	0,1 ml.	-
6	0,1 ml.	1:2500	0,1 ml.	1,1 ml.	0,1 ml.	-
7	0,1 ml.	1:3000	0,1 ml.	1,1 ml.	0,1 ml.	-
8	0,1 ml.	1:4000	0,1 ml.	1,1 ml.	0,1 ml.	-
9	0,1 ml.	1:8000	0,1 ml.	1,1 ml.	0,1 ml.	-
10	0,1 ml.	1:200	0,1 ml.	1,2 ml.	-	-
11	0,1 ml.	1:100	-	1,3 ml.	-	-
12	0,1 ml.	1:100	-	-	-	1,4

Tabla No. 2. Titulación de la hemolisina.

Tubos.	Dilución de hemolisina.	Porcentaje de lisis.
1	1:200	73%
2	1:400	78%
3	1:800	66%
4	1:1000	51%
5	1:1200	39%
6	1:2500	28%
7	1:3000	19%
8	1:4000	7%
9	1:8000	3%
10	1:200	4%
11	-	3%
12	-	100%