

Obtención de un reactivo monoclonal hemoclasificador Anti-A para el sistema de grupos sanguíneos ABO

René A Rivero¹, Lilia E Suárez¹, Antonio A Bencomo¹, Reneé A González¹, Juan M González¹, José M Ballester¹, Agustín Lage², Teresita Rodríguez², Blanca Rosa Tormo², Joaquín Villán², Rafael Magadán², Leonor M Navea³, Marta Dubed³, Ledia Góngora⁴, Yelena Suárez⁴, Orlando R Serrano⁴, José Luis Aviñó⁴

¹Instituto de Hematología e Inmunología

²Centro de Inmunología Molecular

³Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil

⁴Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX), Universidad Médica, Santiago de Cuba

RESUMEN

Los sueros hemoclasificadores para el sistema de grupos sanguíneos ABO se utilizan para garantizar la compatibilidad de la transfusión. Cuando se obtienen de donantes humanos la calidad y disponibilidad son muy variables, por lo que se decidió introducir en Cuba la preparación de un reactivo basado en anticuerpos monoclonales (AcM) murinos con especificidad Anti-A. Los anticuerpos se caracterizaron por métodos inmunoquímicos y serológicos frente a un panel de eritrocitos humanos con la aplicación de las técnicas de hemaglutinación en láminas portaobjeto, centrifugación en tubos y microplacas, y se determinó su potencia (título), avidez e intensidad de reacción. Los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas seleccionados y el líquido ascítico del clon IHI-15 se evaluaron en dos talleres internacionales de AcM contra antígenos eritrocitarios y se establecieron los procedimientos para la producción industrial del producto. Se efectuaron ensayos de terreno con 1 928 donantes de sangre de distintas regiones y se determinó su estabilidad en anaquel por dos años. El hibridoma IHI-15 secreta IgM Anti-A que no reacciona cruzadamente con otros antígenos de grupos sanguíneos, reconoce a los principales subgrupos de A y AB y a algunas variantes débiles de A, reacciona por métodos inmunohistológicos frente a antígenos intracitoplasmáticos (aparato de Golgi) en células gástricas y por ELISA, frente a estructuras H tipo 3, pero no con los oligosacáridos A comunes. Además mostró una potencia mayor de 1:64 y de 1:8 frente a eritrocitos A₁ y A₂B, una avidez menor que 5 y 10 segundos frente a esos fenotipos, respectivamente, una intensidad de 2+, una especificidad diagnóstica del 100% y una sensibilidad mayor del 99% cuando se comparó con su equivalente de Biotest AG. El resultado representa un aporte económico, social y científico para Cuba.

Palabras clave: Grupos sanguíneos, sistema ABO, anticuerpos monoclonales, hibridomas

Introducción

En los seres humanos se identifican cuatro fenotipos principales dentro del sistema ABO de grupos sanguíneos, que son A, B, O y AB y designan la presencia o la ausencia de los antígenos A y B. La transfusión de sangre continúa siendo un arma terapéutica imprescindible en la medicina moderna, por lo que la compatibilidad entre el donante y el receptor a través de la determinación de los grupos ABO y Rh(D), es un requisito indispensable para garantizar un tratamiento sin riesgos para la vida del paciente [1]. En Cuba y otros países del mundo la mayoría de los reactivos biológicos que se emplean para clasificar la sangre se derivan del plasma o suero de personas que se inmunizan deliberadamente o, en menor medida, como consecuencia de recibir múltiples transfusiones o embarazos, o por ambos. La producción de antisueros policlonales humanos confiables y de alta calidad para la tipificación de sangre es una tarea laboriosa y consume mucho tiempo, por lo que el suministro estable de este tipo de reactivos en cantidad y calidad se hace cada día más difícil, además de los riesgos inherentes a la transmisión de enfermedades a través de las inmunizaciones [2]. La aplicación de la tecnología de hibridomas desarrollada por Köhler y Milstein [3] para la producción de anticuerpos monoclonales (AcM) murinos y su empleo para preparar reactivos hemoclasificadores de nuevo

tipo despertó un elevado interés internacional a partir de la década de los años 80 [4]. Como prueba de ello se han efectuado cuatro talleres/simposios internacionales sobre este tema patrocinados por la Sociedad Internacional de la Transfusión Sanguínea (ISBT, siglas en inglés) [5]. Ningún país del llamado Tercer Mundo posee un producto comercial similar obtenido en su propio territorio. La producción industrial de estos reactivos implica el establecimiento de un sistema de aseguramiento de la calidad, donde la documentación es esencial y por lo tanto, está relacionada con todos los aspectos de las buenas prácticas de producción (BPP), las buenas prácticas de laboratorio (BPL) y las buenas prácticas clínicas (BPC) [6-8]. Este proyecto se realizó con el objetivo de contribuir a la introducción en Cuba de nuevos reactivos hemoclasificadores basados en AcM con especificidad para los antígenos del sistema de grupos sanguíneos humanos ABO. Para esto se intentó generar hibridomas murinos secretores de AcM con especificidad para el antígeno A del sistema ABO de grupos sanguíneos humanos, caracterizar los AcM por criterios inmunoquímicos y serológicos, formular un reactivo hemoclasificador monoclonal murino Anti-A, que cumpliera con los criterios de calidad internacionales, evaluar en centros de referencia la especificidad y utilidad de los AcM, escalar la producción según las buenas prácticas de producción

1. Watkins WM. The ABO blood group system: historical background. *Transfus Med* 2001;11:243-65.

2. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M. *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 10th Ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications;1997.

3. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-7.

4. Hughes-Jones NC. Monoclonal antibodies as potential blood typing reagents. *Immunol Today* 1988;9:68-70.

5. Le Pendu J, Henry S. Section 2: Immunohistochemical, immunohistological and serological analysis of monoclonal antibodies with carbohydrates. Coordinator's report. *Transfus Clin Biol* 2002; 9(1):55-66.

6. Bruce M, Hoppe PA, Kochman SA, Le Pennec PY, Moore PBL, Vaak D. A report: "Reagents for the 1990's". *Immunohematology* 1991;7:57-64.

7. Centro Estatal para el Control de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) de la República de Cuba: Guía para la evaluación de los diagnosticadores. Anexo: Diagnosticadores en Inmunohematología;1996.

(BPP) en un centro acreditado como productor de diagnosticadores, introducir un sistema analítico de evaluación de la actividad biológica y crear la base documental para el aseguramiento de la calidad, evaluar el producto terminado en ensayos de terreno, y evaluar la estabilidad en anaquel del producto terminado.

Materiales y métodos

Los experimentos de fusión celular se desarrollaron a partir de una línea de plasmacitoma de ratón P3-X63.Ag8.653 (X63) y esplenocitos de ratones Balb/c inyectados con eritrocitos completos obtenidos a partir de sangre periférica de donantes, por un nuevo procedimiento patentado por los autores [9]. Las células se clonaron al menos tres veces por dilución limitante para garantizar la monoclonalidad. Para garantizar la protección y permanencia de los hibridomas de interés, las líneas celulares se sometieron a procedimientos confiables de criopreservación a -80 °C y en N₂ líquido (-196 °C). Se obtuvo líquido ascítico murino (LAM) derivado del clon IHI-15 Anti-A, mediante la inoculación de 10⁵ células en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c. El pesquisaje inicial de anticuerpos en los sobrenadantes del cultivo celular se realizó por la técnica de hemaglutinación en microplacas de 96 pocillos con un panel de eritrocitos humanos de los fenotipos A₁, A₂, A_x, B y O. Con el LAM se realizaron pruebas de especificidad, potencia, avidez, y comprobación de la ausencia de anticuerpos contaminantes, según los métodos recomendados por la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) del Gobierno de los EE.UU. [10, 11] y reconocidos por la ISBT y el Comité Internacional de Normalización en Hematología [6]. Los sobrenadantes de los clones de hibridomas obtenidos en el segundo experimento de fusión celular se remitieron además, a los laboratorios *Gamma-Biologicals Inc.*, de Houston, Texas, EE.UU., para su evaluación. Con reactivos formulados a partir de la dilución 2¹ del LAM se aplicó el AcM IHI-15 Anti-A en un ensayo intralaboratorio, para la determinación de grupos sanguíneos en muestras de donantes de sangre y de cordón umbilical, en paralelo con un suero hemoclasificador Anti-A policlonal humano de producción nacional. Después del escalado industrial, se repitió con una dilución del LAM clarificado, la evaluación previa al ensayo de terreno del producto terminado, y se utilizaron 300 nuevas muestras de sangre de donantes adultos no seleccionados así como 53 nuevas muestras de sangre de cordón umbilical.

Una muestra del sobrenadante de cultivo del hibridoma IHI-15 Anti-A, fue enviada a los laboratorios de referencia participantes en el III Taller Internacional de los siguientes países: Eslovenia, Gran Bretaña, Nueva Zelanda, EE.UU., Francia, Holanda, donde la muestra fue sometida a las siguientes pruebas: evaluación serológica, inmunohistológica, e inmunoenzimática (ELISA) frente a oligosacáridos sintéticos. El IHI-15 y los clones de hibridomas IHI-5 e IHI-4 también fueron evaluados en el IV Taller Internacional de AcM contra antígenos de eritrocitos humanos y relacionados, en laboratorios de Argentina, Eslovenia, Francia, Japón, Nueva Zelanda y Rusia, los cuales aplicaron pruebas serológicas, de ELISA, fotónicas con rayos láser de eritroagregometría y reacción específica con glicolípidos

naturales aislados por cromatografía de capa fina de alta resolución mediante ensayo inmunoenzimático (EIA-TLC).

Se trasladaron cinco criotubos que contenían las células congeladas del clon IHI-15 Anti-A al Centro de Inmunología Molecular (CIM) para los trabajos de escalado industrial de la producción del reactivo hemoclasificador. Se estableció un sistema analítico de evaluación de la actividad biológica del AcM IHI-15 Anti-A y del reactivo formulado a partir de este AcM y se redactaron los procedimientos de operación estándares (POE) para todo el proceso productivo, la formulación, el llenado, etiquetado y el envase de dichos reactivos.

Se realizaron dos ensayos de terreno, uno antes del escalado industrial y otro después de la obtención del producto terminado. En los Bancos de Sangre Provinciales de Ciudad de La Habana (1^{er} y 2^{do} ensayos), Santiago de Cuba (2^{do} ensayo), Villa Clara (1^{er} ensayo), Cienfuegos (2^{do} ensayo), y en los Municipales de 10 de Octubre y Guanabacoa (2^{do} ensayo), así como en el Servicio de Transfusiones del Hospital Clínico-Quirúrgico "Hermanos Ameijeiras" (1^{er} y 2^{do} ensayos) y se siguieron las recomendaciones del CECMED [7] y criterios de la FDA [12]. Para las pruebas de estabilidad se utilizaron tres lotes del reactivo Anti-A. Las mediciones de reconocimiento específico se realizaron con una periodicidad bimensual durante 2 años (para los frascos mantenidos a una temperatura entre 2 y 8 °C). 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 21-25 °C).

Resultados

De los hibridomas obtenidos en la primera fusión, se seleccionaron 14 clones que reconocen a los grupos sanguíneos A y AB. De los hibridomas generados en la segunda fusión, se detectaron 12 clones con reconocimiento específico para el antígeno A. La eficiencia de fusión en el primer experimento fue de 95.31% y en el segundo de 91.27%. Los hibridomas clonados se criopreservaron a -80 °C y en vapores de N₂ líquido (-196 °C) en alcuotas de 1.5 mL, con 10⁶ células por mL y una viabilidad celular mayor del 95%. En ratones Balb/c, el clon IHI-15 Anti-A fue capaz de generar LAM en un volumen promedio de 3.5 mL por ratón cuando se inocularon 10⁵ células por cavidad peritoneal cuando la producción se llevó a la escala industrial. Se determinó que los AcM IHI-15, IHI-5 e IHI-4 secretados por los correspondientes clones seleccionados se corresponden con las Igs de ratón clase IgM. Los resultados de las pruebas de especificidad y potencia (título) del IHI-15 indicaron el reconocimiento del antígeno A en los fenotipos de grupos que lo portan, incluyendo células A_x y A_xB de adultos, con un título mayor para A₁ que para el resto de los grupos sanguíneos. Para los clones IHI 5 y 4, los resultados de potencia e intensidad de reacción con paneles celulares de *Gamma-Biologicals Inc.*, mostraron la capacidad de estos sobrenadantes de hibridomas de aglutinar fuertemente a los fenotipos A₂ y A_n, y con poca avidez a las variantes débiles de A (A₃ y A_x). Para la formulación del hemoclasificador

8. American Association of Blood Banks. Technical Manual (13th Edition), Bethesda: AABB;1999.

9. US Food and Drug Administration. Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Recommended methods for blood grouping reagents evaluation. Docket No. 84S-0181. March, 1992:1-53.

10. US Food and Drug Administration. Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Points to consider in the manufacture of *in vitro* monoclonal antibody products for further manufacturing into blood grouping reagents and anti-globulin. Docket No. 91-N-0466, March, 1992.

11. René A Rivero Jiménez, Lilia E Suárez Batista, Antonio A Bencomo Hernández, René de la Asunción González Sampedro, Juan M González González. Procedimiento para la obtención de líneas celulares de hibridomas de ratón secretoras de anticuerpos monoclonales que identifican a los hematíes de grupos sanguíneos A y AB y aplicación de estos anticuerpos como reactivos hemoclasificadores. República de Cuba, Oficina Nacional de Inveniones, Información Técnica y Marcas. No. de registro: CU 22402. Año: 1995. Entidad titular: Instituto de Hematología e Inmunología (IU). Clasificación internacional: C12N/ 5/00; 5/08//GOIN 33/577; 33/80.

12. US Food and Drug Administration. Center for Biologic Evaluation and Research (CBER). Points to Consider in The Design of Field Trials for Blood Grouping Reagents and Anti-Human Globulin. Docket No. 91N-0467, 1^a. Draft;1992.

monoclonal Anti-A se seleccionó el clon IHI-15. Cuando el LAM derivado del clon IHI-15 se enfrentó a muestras de eritrocitos del grupo B, tratados con papaína, no se detectó ninguna reacción falso-positiva. No se encontraron anticuerpos contaminantes contra antígenos eritrocitarios de los siguientes sistemas: Lewis, Kell, Rh, MNSs, Lutheran, Kidd, Duffy y Diego. La reactividad frente a eritrocitos débiles indicó que el AcM IHI-15 reconocía inicialmente a eritrocitos de los siguientes fenotipos: A₃, A_{el}, A_{m-like}, A₀B₀, A₁B₂, A₂B, A₃B y A_x, y no reconocía a los eritrocitos de la variante A_{end}.

En el estudio realizado con sangre periférica de donantes adultos y con muestras de sangre de cordón umbilical se encontró 100% de especificidad y sensibilidad cuando se comparó con un suero humano policlonal Anti-A de producción nacional. Los resultados de un segundo ensayo de aplicabilidad, en la evaluación preterreno del producto terminado, indicaron que el 98.04% de las muestras de sangre de cordón umbilical evaluadas reaccionaron adecuadamente y de las muestras de sangre de donantes adultos no seleccionados, el 99% reaccionó con coincidencia con ambos reactivos.

Se determinó que el producto validado en ensayos de terreno en Cuba tiene una especificidad diagnóstica del 100% por todos los métodos evaluados y una sensibilidad que varía desde 99.56% para el método de hemaglutinación en láminas hasta 99.78% por el método de centrifugación en tubos.

Los tres lotes 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, 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 (Tabla 1).

La aplicación práctica de este resultado científico con BPP, trajo como consecuencia la producción del reactivo Hemo-CIM® Anti-A en el Laboratorio de Anticuerpos y Biomodelos Experimentales (LABEX), centro científico-productivo de la Universidad Médica de Santiago de Cuba, donde las estadísticas indican los niveles de producción y comercialización a través de CIMAB SA (Tabla 2).

Discusión

Se introdujo en el país la obtención de reactivos hemoclasificadores con la aplicación de la tecnología de hibridomas por lo que se generaron hibridomas murinos secretores de AcM con especificidad para el antígeno A del sistema ABO de grupos sanguíneos humanos. De la primera fusión, se escogió el clon IHI-15 Anti-A para su caracterización serológica y molecular, por su patrón de especificidad y el vigor del crecimiento de las células en los cultivos, así como por su estabilidad como línea celular [13]. De la segunda fusión, los clones IHI-5 e IHI-4 se seleccionaron para una caracterización más detallada por su patrón de reconocimiento de los eritrocitos A₁ y A₂. Se determinó que estos AcM son Igs de clase IgM, con actividad aglutinante y el LAM derivado del clon IHI-15 Anti-A, por su especificidad, potencia, avidéz e intensidad permite formular un reactivo monoclonal murino Anti-A.

Se evaluó en el III y IV Taller Internacional de AcM contra antígenos eritrocitarios y relacionados, con

Tabla 1. Comparación del reactivo Hemo-CIM®Anti-A en cuanto a puntuación y potencia con 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 tres determinaciones con tres muestras diferentes de eritrocitos A₂B

resultados satisfactorios. En el III Taller, investigadores de Eslovenia informaron que el sobrenadante del hibridoma IHI-15 se consideró entre las mejores ya que aglutinó con más altos títulos y fuerza que los demás, a los grupos débiles A₃, A₂B y A_x [14]. Los de Gran Bretaña encontraron que este sobrenadante reaccionaba débilmente con eritrocitos A₂B seleccionados por su pobre expresión del antígeno A [15]. Cuando en Nueva Zelanda evaluaron al AcM IHI-15 los resultados fueron adecuados en cuanto a especificidad y reacción con A₁, A₂ y A₂B [16]. En los EE.UU. se informó que el sobrenadante IHI-15 reaccionó fuertemente frente a todas las células con antígeno A, de forma similar a los mejores sobrenadantes recomendados para formular un reactivo Anti-A [17]. En Francia se publicó que el sobrenadante no cumplió con las exigencias de la regulación francesa como reactivo hemoclasificador por su bajo título y baja avidéz frente a las mezclas de A₁ y A₂, respectivamente; no obstante, el sobrenadante reconoció el antígeno en muestras de eritrocitos añejados [18]. También se informó que el sobre-nadante IHI-15 Anti-A identificó a las células epiteliales en la mucosa pilórica y duodenal sólo en un área supranuclear (aparato de Golgi), además, se encontró que podía tener una rara reactividad cruzada a nivel de las glándulas de Brünner con secretores O y B [19]. En Holanda se publicó que el IHI-15 Anti-A, no reaccionó con los oligosacáridos sintéticos A-tri-PAA ni con A-tetra-I-PAA, pero tampoco con el resto de los oligosacáridos evaluados (B-tri, B-di, H-tri-I)[20, 21]. En el IV Taller, en Japón [22] y Eslovenia [23] se comprobó la especificidad pre-establecida de los AcM IHI-15, IHI-5 e IHI-4. Por otra parte, en Cuba se informó que los AcM IHI-15, IHI-5 e IHI-4 no reconocen a los eritrocitos de los fenotipos A₂BH^w pero sí a las variantes débiles A₂B, así como a los eritrocitos de adultos y de sangre de cordón de los subgrupos A₁ y A₂ [24]. En los estudios de Rusia se detectó por ELISA que los AcM reaccionaron con fuerza contra la estructura H tipo 3, A sal y AB sal, pero no con los oligosacáridos sintéticos conjugados

13. Rivero RA, Suárez LE, Bencomo AA, González R, González JM, Palma LE et al. Generación de un hibridoma de ratón secretor de anticuerpos monoclonales contra el antígeno del grupo sanguíneo A del sistema ABO humano. *Biotechnol Aplicada* 1995;12(1):27-9.

14. Pretnar K, Curin V. Report of section 2A serology: anti-A, anti-B and anti-A₂B reagents. *Transfus Clin Biol* 1997;1:19-22.

15. Williams M, Lubenko A. Report on Section 2A Antibodies: ABH and other glycoconjugates - Serology. *Transfus Clin Biol* 1997;1:17-8.

16. Harrison D, Mason D, Pinder L, Harding RY. Report on Section 2A Antibodies: ABH and other glycoconjugates - Serology. *Transfus Clin Biol* 1997;1:23-27.

17. Beck ML, Kowalski MA, Kirkegaard JR, Pierce SR, Orr DL. Report on Section 2A Antibodies: ABH and other glycoconjugates - Serology. *Transfus Clin Biol* 1997;1:29-34.

18. Janus G, Prigent N, Sanchez A, Multon L, Bourin Ph, Joussemet M, et al. Report on Section 2A Antibodies: ABH and other glycoconjugates - Serology. *Transfus Clin Biol* 1997;1:35-40.

19. Le Pendu J, Le Cabellec M, Bara C. Immunohistological analysis of antibodies against ABH and other glycoconjugates in normal human pyloric and duodenal mucosae. *Transfus Clin Biol* 1997;1:41-6.

20. Rieben R, Korchagina EY, Bovin NV, Daha MR. Specificity of monoclonal antibodies against ABH and related structures tested by ELISA with synthetic glycoconjugates. *Transfus Clin Biol* 1997;1:47-54.

21. Rivero R, Suárez L, Bencomo A. Características serológicas y análisis inmunohistológico del anticuerpo monoclonal IHI-15 anti-A: resultados de su evaluación en Nantes. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1998;14(3):158-66.

Tabla 2. Niveles de producción y ventas del producto Hemo-CIM® Anti-A

Concepto	Años					
	1999	2000	2001	2002	2003	Total
No. de frascos de 5 mL	717	2 222	2 677	422	1 884	9 750
No. de determinaciones	71 700	222 200	267 700	42 200	188 400	975 000
Valor de comercialización (pesos cubanos)	2 509.50	7 777.00	9 369.50	3 763.80	16 227.79	55 185.59

Fuente: Dirección de LABEX

con PAA A tri, A di, A tipo 1 y A tipo 2, por lo que se enmarcaron dentro del grupo 3 [25]. En las pruebas de Francia y Argentina cuando aplicaron el método fotónico para medir el intercambio de energía durante la reacción de aglutinación de los AcM IHI-15, IHI-5 e IHI-4, se comprobó que tenían un valor de unidades de energía normalizada de 0.40, 0.75 y 0.35 con eritrocitos A₁ y 0.58, 0.81, y 0.50 con eritrocitos A₂ (respectivamente), mientras que los valores con eritrocitos O y B estaban siempre por debajo de 0.0022 (no reacción) [26]. En Nueva Zelanda se determinó que los AcM IHI-15, IHI-5 e IHI-4 mostraban reactividad frente a las estructuras de los glicolípidos, y quedaron clasificados dentro del grupo A-IV [27, 28].

Se escaló la producción en el CIM, para lo cual se creó el sistema analítico y la documentación para el aseguramiento y control de la calidad del producto terminado [29]. Esto permitió que la agencia reguladora nacional (CECMED) otorgara el Registro Sanitario del producto con el número D9611-51. El producto validado en ensayos de terreno, en Cuba, tiene una especificidad diagnóstica de 100% por todos los métodos evaluados y una sensibilidad que varía desde 99.56% para el método de hemaglutinación en láminas hasta 99.78% por el método de centrifugación en tubos [30, 31]. Se demostró que el producto terminado es estable a 4 °C por dos años [32]. 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 OMS, de la FDA y la Comunidad Europea (CE), mientras que frente a eritrocitos A₂B los valores al inicio del estudio fueron mayores, aunque al final del estudio fueron similares en comparación con los patrones de la OMS, mientras que con el patrón de la FDA y CE se obtuvo una puntuación menor, pero HEMO-CIM Anti-A cumple con los requisitos de calidad recomendados por la OMS en cuanto a potencia, intensidad y avidez [33].

Aunque el reactivo se produce en LABEX, Santiago de Cuba, y se comercializa por CIMAB SA en el país, existen retos para el equipo de trabajo, como generar nuevos hibridomas secretores de AcM con especificidad para los antígenos del sistema de grupos sanguíneos ABO y Rh, para completar un juego diagnóstico con todas las especificidades útiles para la clasificación de la sangre, incluidas las variantes con fenotipos más débiles. Evaluar la posibilidad de introducir el clon IHI-15 E5 Anti-A en un sistema de cultivo en fermentadores, con medios libres de suero, para disminuir los costos de producción del reactivo Hemo-CIM[®] Anti-A, que ahora depende de la obtención de LAM en ratones BALB/c, o de otras alternativas productivas como la búsqueda de líneas de ratones singénicos más eficientes en la producción de la materia prima. Formular nuevos reactivos hemoclasificadores Anti-A a partir de posibles mezclas de AcM derivados de nuevos clones de hibridomas que reconozcan a las variantes con expresión débil del antígeno A y permitan aumentar el espectro diagnóstico del reactivo a estas variantes y producir un patrón de referencia nacional. También sería necesario, evaluar este producto en nuevos ensayos de terreno con la

aplicación de la técnica de hemaglutinación en microplacas, una vez que la técnica esté disponible en la red de Bancos de Sangre del país; normalizar la técnica de cuantificación de la IgM murina para incluir la concentración de IgM como criterio dentro de los parámetros del control de la calidad del proceso productivo y de comparación de lotes, según la experiencia de otros productores.

La producción de reactivos hemoclasificadores de uso humano con la aplicación de la tecnología de hibridomas para la generación de AcM se realizó por primera vez en Cuba, lo que permitió contar con un número de hibridomas secretores de AcM *in vitro* contra el antígeno A del sistema de grupos sanguíneos ABO con una caracterización completa, para la formulación de reactivos hemoclasificadores y colocó a Cuba entre los países (todos desarrollados) con esta tecnología para la producción de reactivos hemoclasificadores, al IHI de La Habana, y a LABEX de Santiago de Cuba en el selecto grupo de laboratorios que en el mundo se dedican a la generación y desarrollo de AcM contra antígenos de eritrocitos humanos. Como consecuencia del envío de muestras para la evaluación de AcM cubanos en los talleres internacionales de AcM contra antígenos de eritrocitos y relacionados, por primera vez en la historia de la ISBT y sus talleres internacionales, Cuba también participó con un laboratorio evaluador de AcM para las especificidades determinadas por carbohidratos (sistemas ABO. Lewis, P.), a través del Laboratorio de Inmunoematología del IHI, lo que contribuyó de forma sustancial a la visibilidad internacional de la ciencia cubana, ya que los resultados de esta participación se publicaron en Internet en forma de resúmenes en la página web del Instituto Nacional de la Transfusión Sanguínea de Francia y en la revista científica francesa *Transfusion Clinique et Biologique*, de amplia circulación y elevado factor de impacto internacional.

Desde el punto de vista científico una producción industrial basada en AcM implica un nivel de normalización superior, ya que se basa en una sola molécula, con la avidez y la intensidad de reacción adecuada, que no depende de sujetos humanos, y que teóricamente es eterna, siempre que se mantengan criopreservadas las células del hibridoma de origen.

Con este resultado se pudo comenzar a sustituir parcialmente la actual producción del reactivo de origen humano con los siguientes beneficios sociales: disminución del número de donantes especiales que se inmunizan deliberadamente en la red nacional de Bancos de Sangre para poder garantizar los volúmenes de producción del reactivo policlonal Anti-A y disminución del riesgo de transmisión de enfermedades por vía sanguínea en el país, tanto por la disminución en el número de donantes de plasma hiperinmune que ahora se inmunizan con sustancias específicas obtenidas de meconio humano, como por la disminución del uso del reactivo de origen humano. Si se importaran los volúmenes necesarios de reactivos hemoclasificadores Anti-A monoclonales costarían aproximadamente \$10.00 USD por frasco de 200 determinaciones, lo que representa un costo anual de \$200 000.00 USD para satisfacer una demanda potencial de 4 000 000 de determinaciones Anti-A en

22. Takahashi J, Seno T, Yamashita N, Tanaka F, Hirayama F, Yamano H, et al. Reactivity of monoclonal antibodies against ABH, Lewis and P-related antigens. *Transfus Clin Biol* 2002;9:61.

23. Pretnar Hartman K, Šprohar M, Curin Serbec V. Report on antibodies against ABO antigens. Section 2- Serology. En: URL: <http://w.w.w.ints.fr/4th-workshop/reports>, 2001.

24. Alfonso Valdés Y, Bencomo Hernández AA, Díaz Salazar M, Rivero Jiménez RA. Havana Report on Section 2: Serology of antibodies to ABO and other carbohydrate antigens. *Transfus Clin Biol* 2002;9:62.

25. Lapenkov M, Nikolaeva T, Bovin N, Korchagina E. Some Features of epitope specificity of anti-ABO and Lewis monoclonal antibodies. En: URL: <http://w.w.w.ints.fr/4th-workshop/reports>, 2001.

26. Rasia RJ, Valverde JR, de Isla N, Stoltz JF, Rapaille A, Sondag D. Photonic test of monoclonal antibodies-Section 2. *Transfus Clin Biol* 2002;9:61.

27. Campbell J, Henry S. Specificity mapping of monoclonal antibodies using glycolipids and immunostained thin layer chromatograms. *Transfus Clin Biol* 2002;9:61.

28. Rivero RA, Bencomo AA, Suárez LE, Alfonso Y, Díaz M. Evaluación internacional de tres anticuerpos monoclonales anti-A (Sistema ABO de grupos sanguíneos humanos) generados en Cuba. *Rev Argentina de Transfusión* 2003; XXIX (1/2).

29. Suárez LE, Hernández A, Rivero RA, Bencomo AA, Rodríguez T. Sistema analítico de evaluación de la actividad biológica del reactivo hemoclasificador Hemo-CIM[®] Anti-A. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2000;16(2):132-7.

30. Suárez L, Rivero R, Bencomo A, Díaz T, González J, Fernández J, et al. Ensayo de terreno de anticuerpos monoclonales hemoclasificadores obtenidos en Cuba. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1997;13:63-9.

31. Rivero RA, Suárez LE, Bencomo AA, González R, Martínez MN, Tormo BR, et al. Ensayo de terreno de los reactivos monoclonales Hemo-CIM[®] Anti-A y Hemo-CIM Anti-B como productos terminados. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1998;14(3):167-75.

32. Suárez L, Rivero R, Pérez N, Bencomo A, Torres F, Martínez M, et al. Reactivo hemoclasificador monoclonal cubano Hemo-CIM[®] Anti-A: Estudio de estabilidad. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1999;15(2):137-43.

33. Holburn AM, Moore BPL, David-West AS, Lema RA, Kasili EG, Cazal P, et al. The Production of ABO and D (Rh) Grouping Reagents. OMS LAB/81.1;1981.

el país por año. Han surgido propuestas de firmas extranjeras por adquirir estos clones de hibridomas.

Agradecimientos

Al aguerrido colectivo del Instituto de Hematología e Inmunología, y en especial a los técnicos de laboratorio Lourdes Estrella Palma Salgado, Amarilis Salazar Antúnez, Lissette Orbeal Aldama y Miriam García Echevarría, por su trabajo manual. Al Dr. Porfirio Hernández Ramírez (DrC.Med.), Dra. María Elena Alfonso Valdés, Lic. Rinaldo Villaescusa Blanco (MCs.)

y Lic. Gisela Martínez Antuña (DrC.Biol.) y otros que con ojo crítico revisaron el manuscrito e hicieron valiosas sugerencias. A todos los que contribuyeron a la ejecución de los ensayos de terreno en los Bancos de Sangre de Santiago de Cuba, Villa Clara, Cienfuegos, y Ciudad de la Habana. A los colegas de CEMPALAB que produjeron los primeros lotes de líquido ascítico murino en el proceso de escalado industrial. A los trabajadores de LABEX que asimilaron la tecnología y llevan el peso de las producciones y a los de CIMAB SA que comercian este producto. A los donantes voluntarios de sangre.