

GENERACION DE UN HIBRIDOMA DE RATON SECRETOR DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES CONTRA EL ANTIGENO DEL GRUPO SANGUINEO A DEL
SISTEMA ABO HUMANO

René A. Rivero, Lilia E. Suárez, Antonio A. Bencomo, Reneé González, Juan M.
González, Lourdes E. Palma, Amarylis Salazar

Instituto de Hematología e Inmunología, Apartado Postal 8070, C.P. 10800, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido en enero de 1994. Aprobado en diciembre de 1994.

Key words: Hybridoma, blood groups, monoclonal antibodies, abo system.

SUMMARY

Female Balb/c mice were immunized with blood group A (A_{int} variant) erythrocytes using our own booster schedule. Spleen cells from the immunized mice were fused with mouse cells of the P3-X63.Ag8.653 myeloma cell line. Screening of culture supernatants by a microplaque hemagglutination techniques revealed one hybridoma to be secreting a particularly potent anti-A antibody. This new murine monoclonal antibody (IH1-15) has been evaluated and found suitable as a blood-grouping reagent. Ascitic fluid derived from this hybridoma cell line contains a potent, avid, specific and sensitive antibody as demonstrated by its reactivity with a sample of 302 blood donors and 48 cord blood samples tested manually by three different methods and all were correctly grouped using this antibody. No false-positive reactions were obtained with papainized group B cells. Reagent prepared from IH1-15 detected most examples of A and all other A subgroups and A variants tested.

RESUMEN

El trabajo consistió en la inmunización de ratones Balb/c con hematíes humanos del grupo sanguíneo A (variante A_{int}) usando nuestro propio esquema de sensibilización, se fusionaron esplenocitos de los ratones inmunes con la línea de mieloma de ratón P3-X63.Ag8.653, se seleccionaron clones de células híbridas secretoras de anticuerpos utilizando para el pesquiasaje de los sobrenadantes de cultivo una técnica de hemaglutinación en microplacas, lo que reveló un clon secretor de anticuerpos anti-A particularmente potentes. Este nuevo anticuerpo monoclonal murino (IH1-15) se evaluó y resultó adecuado como reactivo hemoclasificador. El líquido ascítico derivado de este híbridoma contiene anticuerpos potentes, con avidez y especificidad, como se demostró por su reactividad frente a una muestra de 302 donantes de sangre y 48 de sangre de sangre de cordón umbilical que se probaron manualmente por tres métodos, todas clasificadas correctamente con el uso de este anticuerpo. No se

encontraron resultados falso-positivos cuando se evaluaron eritrocitos del grupo B tratados con papaína. El reactivo preparado a partir del clon IH1-15 detectó a la mayoría de las muestras A_x y de otros subgrupos y variantes de A evaluadas.

INTRODUCCION

En los seres humanos existen cuatro fenotípos principales de grupos sanguíneos dentro de la clasificación del sistema ABO, que son A, B, O y AB. Su importancia es decisiva para la transfusión inocua de sangre o glóbulos. Estos símbolos fenotípicos designan la presencia o la ausencia de los antígenos A y B. Las personas con sangre del tipo O poseen un antígeno que se designa con el símbolo H, y en muy raras ocasiones se encuentra un individuo H-negativo, cuyo grupo sanguíneo se define como *Bombay*. Dentro del grupo sanguíneo A, existen a la vez dos subgrupos importantes (A_1 y A_2) definidos estos por la reacción de los hematíes con la lectina anti-A *Dolichos biflorus* (grupo A_1) y la lectina anti-H *Ulex europeaus* (grupo A_2) y una variante intermedia que reacciona con ambos reactivos (variante A_{int}), junto a otras variantes menos comunes.

Aproximadamente el 80% de los individuos no sólo poseen antígenos de grupos sanguíneos en la superficie de sus células, sino que también segregan una forma hidrosoluble de antígenos A, B o H en su saliva y en otros líquidos tisulares de excreción.

Casi todas las personas que poseen sangre del tipo A, B u O presentan en su suero anticuerpos (isohemaglutininas) contra los antígenos A o B

cuando estos no forman parte de sus células; así, las personas del grupo A presentan generalmente anticuerpos naturales anti-B, las del grupo B presentan anticuerpos anti-A, las del grupo O presentan anticuerpos anti-A y anti-B, mientras que las del grupo AB no exhiben este tipo de anticuerpos (1).

Fue Landsteiner en 1900 quien descubrió estos anticuerpos capaces de aglutinas a los hematíes de su misma especie, con lo cual se creó el sistema ABO (2).

La presencia de estos anticuerpos obliga a clasificar la sangre en sus correspondientes grupos para evitar reacciones hemolíticas postransfusionales que ponen en peligro la vida de los pacientes.

La producción de antisueros policlonales confiables y de alta calidad para el tipaje de sangre es una tarea laboriosa y prolongada y, cada vez con mayor frecuencia, depende de la inmunización de seres humanos que después se utilizan como donantes especiales para producir, a partir de su sangre, este tipo de reactivos, lo que conlleva toda un conjunto de problemas, incluyendo aspectos éticos, médico-legales y epidemiológicos (3), por el riesgo de transmisión de determinadas infecciones por vía sanguínea (hepatitis B, hepatitis C, HTLV-I/II, citomegalovirus, virus de la inmunodeficiencia humana, etc.) y por la frecuencia con que aparecen en estos donantes enfermedades de tipo autoinmunes.

Por tales razones, la aplicación de la tecnología de hibridomas desarrollada por Köhler y Milstein (4) para la producción de anticuerpos monoclonales murinos (AcM) con aplicación como reactivos hemoclasificadores despertó un elevado interés y una prueba de ello es que ya se han efectuado dos talleres/simposios internacionales sobre este tema, uno en París (1987) (5) y otro en Lund, Suecia (1990) (6), sin embargo, la sustitución de los reactivos policlonales por monoclonales no es una tarea fácil. El problema radica en la naturaleza, tanto de los anticuerpos como de los antígenos involucrados en esta reacción (7).

Los antígenos de grupos sanguíneos no son proteínas, sino oligosacáridos cuya presencia y ubicación en la membrana eritrocitaria depende de enzimas codificadas genéticamente, por ejemplo, los dos principales subgrupos dentro del grupo A se deben a una diferencia en la expresión de los determinantes A (N-acetil galactosamina), las células A_1 poseen 1×10^6 determinantes A, mientras que las células A_2 tienen sólo $2,5 \times 10^5$. Tanto los genes A^1 como los A^2 codifican para la alfa-3-N-acetil-galactosaminil transfera-

sa, pero esta enzima difiere en sus propiedades cinéticas y la transferasa codificada por los genes A^2 es generalmente menos eficiente (8), pero al parecer, no sólo existe una diferencia cuantitativa, sino que se ha comprobado que las células A_1 tienen una estructura H tipo 2 extendida diferente a la de las células A_2 (8).

Aunque los AcM murinos contra antígenos de los grupos sanguíneos del sistema ABO se han utilizado como reactivos hemoclasificadores, esto generalmente se ha logrado creando mezclas de anticuerpos (9). Idealmente, estos anticuerpos deben tener una alta avidéz y potencia, deberían detectar a todas las variantes débiles del antígeno A, entre ellas a las variantes A_x . Estas características son muy poco frecuentes en un solo anticuerpo y de hecho, la mayoría de los AcM comerciales anti-A que cumplen con ese criterio son una mezcla de más de un AcM (9). Incluso, los sueros hemoclasificadores policlonales obtenidos del suero de donantes del grupo B no necesariamente detectan a estas variantes, y por lo tanto, usualmente se utilizan sueros policlonales anti-AB (de donantes del grupo O) para que las variantes A_x sean detectadas (10).

Por otra parte, reportes recientes indican que ciertos AcM anti-A que detectan a las variantes A_x ofrecen una reacción no deseada, porque estos reactivos son tan potentes que pueden aglutinar hematíes del grupo B que expresan cantidades mínimas del antígeno A en su superficie (11-13). La detección de este llamado fenómeno B(A) por tales anticuerpos podría dar lugar a un tipaje ABO incorrecto cuando no se realiza la prueba cruzada con el suero, como en los casos de retipaje de donantes, tipaje de sangre de cordón umbilical, o de recién nacidos. Otro informe indica que en el segundo taller/simposio internacional sobre AcM contra grupos sanguíneos y antígenos mencionados, se presentaron a evaluación un total de 16 AcM con especificidad anti-A, de los cuales ninguno era capaz de detectar a la variante débil A_{el} . Estos AcM se agruparon según su reactividad en seis categorías y sólo los de las categorías 1 y 2 eran capaces de detectar a algunas muestras de las variantes A_x (14).

MATERIALES Y METODOS

Generación de hibridomas

Los hibridomas se desarrollaron a partir de una fusión de la línea de plasmacitoma de ratón P3-X63.Ag8.653 (X63) y esplenocitos de un ratón Balb/c inyectado con hematíes completos con fenotipo A_{int} obtenidos a partir de la sangre periférica de un donante fenotipado con la ayuda de lectinas y reactivos hemoclasificadores policlonales humanos. El ratón se inyectó según un esquema de inmunización desarrollado por nuestro laboratorio, en cuatro ocasiones distintas a intervalos de siete días

para las tres primeras dosis y 10 días para la última, y se sacrificó tres días después de la inyección final. La dosis de hematíes en cada inyección fue de 4×10^7 células en 0,5 mL por vía intraperitoneal.

La fusión celular se realizó a temperatura ambiente según una modificación al procedimiento de Galfre *et al.* (15): se unieron $37,2 \times 10^7$ esplenocitos no lavados con $7,3 \times 10^6$ células del mieloma que se cultivaron previamente en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado, con medio sin suero en tubos de ensayo de poliestireno estériles con tapa de rosca de 50 mL de capacidad, se centrifugaron a $470 \times g$ durante 7 min a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

Una vez eliminado el sobrenadante totalmente, se le adicionó 1 mL de una solución de polietilén glicol 1 500 (PEG 1 500) al 50% en solución amortiguada con HEPES (75 mM), pH 7,2 a temperatura ambiente con incubación inicial de 1 min, y agitación suave, después de la cual se inició la adición subsecuente de solución amortiguadora de fosfatos (SAF) en proporciones de 100 μL cada 20 s durante el segundo min de incubación, cada 15 s durante el tercer minuto, cada 10 s durante el cuarto minuto, cada 5 s durante el quinto minuto, y para finalizar la dilución del PEG 1 500, se añadió SAF hasta completar un volumen de 10 mL, luego se centrifugó el tubo de ensayo a $30 \times g$ durante 7 min a temperatura ambiente y se eliminó totalmente el sobrenadante, mientras que el botón celular que contenía las células fusionadas, se resuspendió suavemente en un pequeño volumen de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB inactivado, L-glutamina (0,3 g/L), piruvato de sodio (1 mM), penicilina (100 U/mL), estreptomycinina (0,1 mg/mL), anfotericina B (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), hipoxantina (10^{-4} M), aminopterina (4×10^{-5} M), timidina ($1,6 \times 10^{-5}$ M), e insulina (20 UI/mL) (medio HAT-I), con HEPES (15 mM) y bicarbonato de sodio (2 g/L) como amortiguadores.

Posteriormente se completó con dicho medio hasta obtener una concentración final de 2×10^6 células/mL, que se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos que contenían una monocapa de células alimentadoras compuesta por macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones singénicos; las placas se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y CO_2 al 5%, con estrictas medidas para el mantenimiento de la esterilidad de los cultivos. Cuatro días más tarde, se eliminó totalmente el sobrenadante en cada pocillo y los cultivos se realimentaron con el mismo medio; a los 8 días de la fusión se inició el pesquisaje de anticuerpos en los sobrenadantes con el empleo de volúmenes de 100 μL para cada estudio y renovación total del medio de cultivo cada 4 días a partir de esa fecha.

Caracterización serológica inicial

El pesquisaje inicial de anticuerpos se realizó por la técnica de hemaglutinación en microplacas de 96 pocillos con fondo en U utilizando un panel de hematíes humanos al 2% tratados con bromelina a 37°C de los fenotipos A_1 , A_2 , A_x , B y O, en proporción volumen a volumen según el método recomendado por Voak *et al.* (16).

Clonaje celular

Los clones se re-clonaron tres veces por dilución limitante para garantizar la monoclonalidad del producto final.

Obtención de líquido ascítico

También se obtuvo líquido ascítico del clon mencionado, mediante la inoculación de 10^6 - 10^7 células en la cavidad peritoneal

de ratones Balb/c que habían recibido un día antes 0,5 mL de adyuvante incompleto de Freund.

Caracterización inmunohematológica

Con el líquido ascítico se realizaron pruebas de especificidad, potencia, avidéz, y comprobación de la ausencia de anticuerpos contaminantes, según los métodos recomendados por la Oficina de Alimentos y Drogas (FDA) del Gobierno de los Estados Unidos de América (17,18) y reconocidos por la Sociedad Internacional de la Transfusión Sanguínea y el Comité Internacional de Normalización en Hematología (19).

Pruebas serológicas

Técnica de centrifugación en tubos. Se colocaron 0,1 mL de la suspensión de hematíes al 2% y de cada dilución del líquido ascítico en tubos 10 x 75 mm, se mezclaron e incubaron por 5 min a temperatura ambiente y luego se centrifugaron 1 min a $100 \times g$. El botón celular se despegó cuidadosamente y la aglutinación se observó macroscópicamente. La intensidad de la reacción de hemaglutinación se graduó según el método de Marsch (20) (escala de 0 a 4+). El punto final de la titulación se consideró como el recíproco de la máxima dilución que ofrece una reacción 1+.

Determinación de la especificidad y la potencia

La especificidad, tanto en sobrenadantes como en el líquido ascítico, se determinó por la técnica anterior, usando hematíes tratados con enzimas (bromelina y papaína) y sin tratar. La potencia se determinó por titulación, de las diluciones dobles del líquido ascítico en solución salina fisiológica y con pruebas frente a un panel de células de fenotipos comunes y raros: A_1 , A_2 , A_x , A_1B , A_2B , A_3B , A_xB , B y O. Para comprobar la ausencia de reactividad frente a otros grupos sanguíneos, se emplearon hematíes que expresan los siguientes fenotipos Le^a , Le^b , I, K, k, Kp^b , Js^b , P_1 , D, C E, c, e, M, N, S, s, Lu^b , JK^a , JK^b , Fy^a , Fy^b , y Wr^a .

Pruebas de inhibición para comprobación de la especificidad

Las pruebas de inhibición para comprobar la especificidad de los AcM se realizaron tanto con saliva de individuos secretores de sustancia A y sustancia B hidrosoluble, como con estas sustancias obtenidas de meconio, se incubaron 500 μL de líquido ascítico con un volumen igual de saliva tratada y con sustancia A y sustancia B obtenida de meconio, durante 30 min a temperatura ambiente, luego se tomaron 50 μL de diluciones del líquido ascítico y se enfrentaron a hematíes de prueba A_1 (volumen a volumen) para detectar actividad aglutinante. Como control negativo se usó el mismo líquido ascítico incubado con solución salina sin estas sustancias.

Determinación de la avidéz y la intensidad de la reacción

Se probaron diluciones del líquido ascítico en solución salina fisiológica, frente a un panel de hematíes A_1 , A_2B , y A_x , usando suspensiones altamente concentradas de estas células. Una gota de la suspensión celular se colocó en un pocillo excavado y se mezcló con una gota de líquido ascítico diluido, con un reloj cronómetro se midió el tiempo en segundos hasta la aparición de una aglutinación 3+. Para conocer la intensidad de la reacción, al completar un minuto, se evaluó el tamaño de los grumos de aglutinación, según la escala de Marsch (19).

Para obtener las condiciones idóneas de concentración salina y pH del reactivo hemoclasificador monoclonal anti-A (producto final), formulado a partir de la dilución óptima del líquido ascítico derivado del clon IHI-15, se evaluó el efecto sobre la avidéz y la

intensidad de las siguientes concentraciones de CINA: 9, 13, 17, 21, 25 y 29 g/L frente a hemáties de los fenotipos A₁, A₂, A_x, A₂B, y A_xB, y los siguientes pH: 5,7 - 6 - 6,5 - 7 - 7,5 - 8 en SAF 0,1 M con hemáties A₁ y A₂.

Determinación de la clase y subclase de las inmunoglobulinas de ratón

Por doble inmunodifusión radial se determinó la clase y subclase de las inmunoglobulinas de ratón secretadas por este clon.

Aplicación de los AcM como reactivos hemoclasificadores

Con reactivos formulados a partir de la dilución óptima del líquido ascítico en SAF 0,1 M, pH 7,5, 17 g/L de CINA, 0,1% de azida sódica, 1% de albúmina sérica bovina y con la adición del colorante erio glucina (30 g/L) en una dilución 1:200, se aplicó el AcM anti-A para la determinación de grupos sanguíneos en 302 muestras de donantes de sangre que acudieron al servicio de transfusiones del Instituto de Hematología e Inmunología y en 48 muestras de sangre de cordón umbilical (con expresión débil de los antígenos), colectadas en el servicio de Gineco-Obstetricia del Hospital General Docente "Enrique Cabrera", en paralelo con un reactivo hemoclasificador anti-A policlonal humano de producción nacional, por los métodos de hemaglutinación por centrifugación en tubos, en láminas portaobjeto, y en microplacas de 96 pocillos con fondo en U, para determinar la especificidad y la sensibilidad del producto final.

Además se enfrentó a muestras de hemáties de algunos individuos que representan a las siguientes variantes débiles: A_{el}, A_{m-like}, A_{1,2}B, A_{o,o}B, A₂B, A₃B, A_x, y A_{end}.

Tabla 1

Reactividad de los sobrenadantes de 14 clones IHI frente a hemáties humanos de diferentes fenotipos*

Sobrenadantes Clones	Fenotipo de los hemáties de prueba				
	A ₁	A ₂	A _x	B	O
IHI-3	+	+	+	-	-
IHI-11	+	-	-	-	-
IHI-12	+	+	+	-	-
IHI-13	+	+	+	-	-
IHI-14	+	-	-	-	-
IHI-15	+	+	+	-	-
IHI-24	+	+	-	-	-
IHI-32	+	+	+	+	-
IHI-33	+	+	+	+	-
IHI-34	+	+	+	+	-
IHI-38	+	+	+	+	-
IHI-39	+	+	+	+	-
IHI-44	+	+	-	-	-
IHI-47	+	+	-	-	-

* Con la técnica de hemaglutinación en microplacas y por centrifugación en tubos

Clon Seleccionado

RESULTADOS

Este trabajo proporcionó AcM murinos (IHI-15) que se unen selectivamente a un epítipo específico de la membrana de los hemáties A y AB que expresan el antígeno A.

De los hibridomas obtenidos se seleccionaron 14 clones que reconocen a los grupos sanguíneos A y AB (tabla 1), de los cuales finalmente se seleccionó el clon IHI-15 anti-A para su caracterización serológica y molecular. Este clon se reclonó tres veces por dilución limitante para garantizar la monoclonalidad del producto final.

Los resultados de las pruebas de especificidad, título, pruebas de inhibición con saliva y con sustancia A y B obtenida de meconio, avidéz, e intensidad se muestran en las tablas 2, 3, y 4.

Tabla 2

Especificidad y título de hemaglutininas en el líquido ascítico derivado del clon IHI-15 frente a un panel de hemáties humanos de distinto origen y fenotipo

Fenotipo	Origen					
	Sangre Periférica Adultos			Sangre de Cordón umbilical		
	n	R	Título	n	R	Título
A1	3	+	262 144	5	+	65 536
A2	3	+	4 096	1	+	NR
Ax	2	+	4 096		NR	
A1B	1	+	32 788	4	+	8 192
A2B	3	+	16 384	2	+	NR
AxB	1	+	8 192		NR	
B	4	-	-	1	-	-
O	3	-	-	2	-	-

n- Número de muestras evaluadas

R- Reactividad

NR- No realizado

Tabla 3

Reactividad del líquido ascítico del clon IHI-15 en pruebas de inhibición con sustancias A y B obtenidas de saliva y meconio frente a hemáties del subgrupo A₁

Incubación con	Diluciones del líquido ascítico			
	200 ⁻¹	400 ⁻¹	800 ⁻¹	1 600 ⁻¹
Sustancia A secretada en saliva	1+	-	-	-
Sustancia B secretada en saliva	4+	4+	4+	4+
Sustancia A obtenida de meconio	1+	-	-	-
Sustancia B obtenida de meconio	4+	4+	4+	1+
Salina sin sustancia	4+	4+	4+	4+

Tabla 4

Pruebas de avidéz e intensidad de los anticuerpos secretados por el clon IHI-15 frente a los hematíes de prueba.

Líquido ascítico	Prueba	Panel de hematíes		
		A ₁	A ₂ B	A _x
Dilución 32	Avidéz "(segundos)	2"	4"	35"
En salina	Intensidad al minuto	4+	2+	1+

Para la formulación del hemoclasificador monoclonal anti-A derivado del clon IHI-15, la concentración óptima de ClNa se determinó en 17 g/L y el pH óptimo de la solución amortiguadora de fosfatos en 7,5 (tabla 5).

Cuando el líquido ascítico del clon IHI-15 se enfrentó a una muestra de 10 hematíes del grupo B tratados con papaína, no se detectó ninguna reacción falso-positiva por los métodos de hemaglutinación descritos anteriormente.

No se encontraron anticuerpos contaminantes ni reacciones cruzadas cuando el AcM se evaluó frente al panel compuesto por los hematíes de los siguientes fenotipos: Le^a, Le^b, I, K, k, Kp^b, Js^b, P₁, D, C, E, c, e, M, N, S, s, Lu^b, JK^a, JK^b, Fy^a, Fy^b, y Wr^a. Se determinó que el AcM IHI-15 es una inmunoglobulina de ratón clase IgM.

La posible utilidad como reactivo hemoclasificador se basa en la capacidad para reaccionar por los métodos internacionalmente establecidos con los hematíes humanos, pues en el estudio realizado en 302 muestras de sangre periférica de donantes adultos y en 48 muestras de sangre de cordón umbilical se encontró 100% de especificidad y sensibilidad cuando se comparó con el reactivo de referencia anti-A policlonal humano de producción nacional (tabla 6).

La reactividad frente a algunos individuos que representan a las variantes débiles indicó que este AcM reconoce a hematíes de los siguientes fenotipos: A_{el}, A_{m-like}, A_{o,o}B, A_{1,2}B, A₂B, A₃B y A_x, y no reconoce a los hematíes de la variante A_{end}.

Tabla 6

Reactividad del AcM IHI-15 hemoclasificador anti-A frente a muestras de sangre de adultos y de cordón umbilical según grupos sanguíneos en comparación con similar policlonal

Grupo	Sangre periférica		Sangre de cordón	
	n	% de reactividad con anti-A *AcM IHI-15 policlonal	n	% de reactividad con anti-A *AcM IHI-15 policlonal
A	125	100	11	100
B	44	0	8	0
AB	6	100	5	100
O	127	0	24	0
	302		48	

*Por tres métodos de hemaglutinación

Tabla 5

Avidéz e intensidad de reactivos hemoclasificadores formulados con ascitis del clon IHI-15 anti-A con diferentes concentraciones de NaCl y pH en la solución amortiguadora de fosfatos 0,1 M.

Fenotipo de Hematíes	A		I		A		I		A		I		A		I	
	Concentración de NaCl (g/L)															
	9		13		17		21		25		29					
A ₁ n= 2	2,5	3	1,75	3	2	3	2,75	3	3,5	4	6	4				
A ₂ n= 2	5	1	3	3	3	3	4,5	2	7	2	9	2				
A _x n= 2	38	1	51,5	1	31	1	ND		ND		ND					
A ₂ B n= 2	7,5	2	9	3	7,5	3	7,5	2	ND		ND					
A _x B n= 2	36	1	33	1	17	1	39	1	ND		ND					
pH SAF 0,1 M																
5,7		6		6,5		7		7,5		8						
A ₁ n= 2	5	3	4	3	4	3	3	3	2,5	9	3,5	3				
A ₂ n= 2	7	1	14	1	4	2	3,5	2	4	2	3,5	1				

A: Avidéz en segundos
 I: Intensidad en +
 Concentración de hematíes: 10%
 Dilución de la ascitis: 16⁻¹
 ND: No definido

DISCUSION

Las considerables ventajas que los reactivos hemoclasificadores basados en AcM poseen sobre los reactivos policlonales humanos convencionales, se han informado también por otros autores (21-23). Los AcM anti-A producidos en los últimos años en el extranjero muestran significativas mejoras con relación a sus similares anteriores (24-25) y algunos tienen características superiores a los reactivos policlonales humanos, por ejemplo, su reactividad con hematías A₂B (23).

Recientemente se describió un nuevo AcM, el BIRMA-1 anti-A, que es capaz de reconocer a las variantes A_x sin provocar el llamado fenómeno B(A), este anticuerpo fue capaz de detectar a 11 de 18 donantes con fenotipo A_x, lo que demuestra a su vez la diversidad de niveles antigénicos clasificados dentro de esta variante A_x (26). El fenómeno B(A) es un hecho natural sólo demostrado por AcM anti-A muy potentes (11-13).

Nuestros resultados indican que el clon HIH-15 secreta un AcM que detecta, por sí solo, a los hematías de algunos individuos que presentan el fenotipo A_x, hasta ahora en el 100% de las muestras de estas variantes que han estado a nuestro alcance (n= 4) y no ha detectado sustancia A en hematías B tratados con papaína, que son excelentes indicadores del fenómeno B(A)(26). Además indentifica a hematías de algunos individuos que representan a variantes muy débiles como A_{el}, A_{o,o}B, A_{1,2}, y A_{m-like}, y aunque no reconoció a una muestra de la variante Aend que se caracteriza por tener una expresión aún más débil del antígeno A (1) aparentemente estamos ante un AcM de singular valor.

Según las recomendaciones de la FDA (16), un reactivo para su evaluación como hemoclasificador anti-A debe reconocer, en pruebas de especificidad y título, al menos una muestra de hematías A₁ y tres muestras diferentes de sangre periférica de individuos A₂B, y para un hemoclasificador anti-A,B se requiere el reconocimiento, como mínimo dos muestras A₁, dos muestras A₂, cuatro muestras B, y tres diferentes muestras de las variantes A_x; el hemoclasificador derivado del clon IHI-15 satisface las exigencias como reactivo anti-A y podría utilizarse como parte de una mezcla de AcM para la formulación de un reactivo anti-A,B, por su capacidad para identificar a variantes A_x.

Por otra parte, la dilución 16⁻¹ del líquido ascítico en el reactivo hemoclasificador formulado a partir del AcM IHI-15 anti-A permite que si se le realizara al

producto final una serie de seis diluciones dobles no se afecta su reactividad por la técnica de hemaglutinación en tubos, frente a hematías A₁, y con una serie de cuatro diluciones dobles, tampoco se afecta la reactividad frente a los hematías A₂B, que se consideran buenos indicadores de hematías con expresión débil del antígeno A, lo que garantiza la calidad y estabilidad de este biopreparado con fines diagnósticos, según las recomendaciones internacionales.

El AcM IHI-15 anti-A se aplicó satisfactoriamente con la formulación y los métodos de hemaglutinación descritos anteriormente, en un ensayo de terreno en los Bancos de Sangre provinciales de Ciudad de La Habana, Santa Clara y Santiago de Cuba, para llegar a una cifra de más de 800 muestras evaluadas en paralelo con reactivos hemoclasificadores basados en AcM comerciales importados y policlonales humanos de producción nacional.

REFERENCIAS

1. MOLLISON, P.L.; C.P. ENGELFRIET and M. CONTRERAS (1987). *Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 8th Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pag 268-269.
2. LANDSTEINER, K. (1900). *Zbl. Bakteriol.* 27:357-363.
3. EDELMAN, L. (1984). Los anticuerpos monoclonales en inmunoematología: interés científico, aplicaciones prácticas y aspectos económicos de los reactivos empleados para la determinación de los grupos sanguíneos. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial (ONUDI). Simposio Latinoamericano sobre la Sangre y sus Derivados. *Conference Room Paper No. RLA/83/117/18*, Cartagena, Colombia, Noviembre.
4. KÖHLER, G. and C. MILSTEIN (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
5. ROUGER, P. and D. ANSTEE (1988). First International Workshop on Monoclonal Antibodies against Red Blood Cell and Related Antigens: Final Report. *Vox Sang* 55:57-61.
6. CHESTER, M.A.; U. JOHNSON; A. LUNDBLAD; B. LOW; L. MESSETER and B. SAMUELSON (ed). (1990). *Proceedings of the Second International Workshop and Symposium on Monoclonal Antibodies Against Human Red Blood Cells and Related Antigens*. Lund, Sweden. pag 1.
7. HUGHES-JONES, N.C. (1988). Monoclonal antibodies as potential blood typing reagents. *Immunol Today* 9:68-70.
8. WATKINS, W.M.; P. GREENWELL; A.D. YATES and P.H. JOHNSON (1988). Regulation of expression of carbohydrate blood group antigens. *Biochem.* 70:1597-1611.
9. MCGOWAN, A.; A. TOD; A. CHIRNSIDE et al (1989). Stability of murine monoclonal anti-A, anti-B, and anti-A,B ABO grouping reagents and a multi-centre evaluation of their performance in routine use. *Vox Sang* 56:122-130.

10. BRITISH PHARMACOPOEIA (1988). Vol ii, Appendix XV A, A187.
11. BECK, M.L.; J.T. HARDMAN and R. HENRY (1986). Reactivity of a licensed monoclonal anti-A reagent with group B cells. *Transfusion* **26**:572.
12. VOAK, D. (1987). The evaluation of monoclonal anti-A antibodies for use as blood grouping reagents. *Rev. Francais de Transfusion et Immuno-hematologie* **30**:363.
13. LAU, P.; S. SERERAT; J. BEATTY; R. OILSCHLAGER and J. KINI (1990). Group A variants defined with a monoclonal anti-A reagent. *Transfusion* **30**:142-145.
14. ORIOL, R.; B.E. SAMUELSSON and L. MESSETER (1990). ABO antibodies-serological behaviour and immuno-chemical characterization. *J. Immunogenetics* **17**:279-299.
15. GALFRE, G.; S.C. HOWE; C. MILSTEIN; W. BUTCHER and J.C. HOWARD (1977). Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. *Nature* **266**:550-552.
16. VOAK, D.; J.A.F. NAPIER; F.E. BOULTON; *et al.* (1990). Guidelines for microplate techniques in liquid-phase blood grouping and antibody screening. *Clin. Lab. Haemat.* **12**:437-460.
17. US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (1992). *Recommended Methods for Blood Grouping Reagents Evaluation*. Docket No. 84S-0181, March.
18. US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (1992). *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.
19. BRUCE, M.; P.A. HOPPE; S.A. KOCHMAN; P.Y. LEPENNEC; P.B.L. MOORE; D. VOAK (1991). A report: "Reagents for the 1990's". *Immunohematol.* **7**:57-64.
20. MARSH, W.C. (1972). Scoring of haemagglutination reactions. *Transfusion* **12**:352-353.
21. VOAK, D.; E. LENNOX; S. SACKS; C. MILSTEIN, J. DARNBOROUGH (1982). Monoclonal anti-A and anti-B: Development as cost effective reagents. *Med. Lab. Sci.* **39**:109-122.
22. TOD, A. and A. CHIRNSIDE (1988). Monoclonal antibody production: a cost comparison. *Med. Lab. Sci.* **45**:161-164.
23. MESSETER, L.; T. BRODIN, MA. CHESTER; B. LOW and A. LUNDBLAD (1984). Mouse monoclonal antibodies with anti-A, anti-B and anti-A,B specificities: Some superior to human polyclonal ABO reagents. *Vox Sang* **46**:185-194.
24. VOAK, D.; S. SACKS; T. ALDERSON; E. TAKEI; E. LENNOX; J. JARVIS; C. MILSTEIN and J. DARNBOROUGH (1980). Monoclonal anti-A from a hybrid-myeloma: Evaluation as a blood grouping reagent. *Vox Sang* **39**:134-140.
25. LOWE, A.D.; E.S. LENNOX and D. VOAK (1984). A new monoclonal anti-A culture supernatant with the performance of hyperimmune human reagents. *Vox Sang* **46**:29-35.
26. McDONAL, D.F. and J.M. THOMPSON (1991). A new monoclonal anti-A antibody BIRMA-1. A potent culture supernatant which agglutinates A_x cells, but does not give undesirable reactions with B cells. *Vox Sang* **61**:53-58.