

EFFECTO DE LA IRRADIACION CON Co-60 EN LA GAMMAGLOBULINA HIPERINMUNE ANTIMENINGOCOCCICA

M. Galguera, S. Martínez, C. Campos, G. Sierra, A. Armet, R. Fernández
Centro Nacional de Vacuna Antimeningocócica, Ministerio de Salud Pública
La Habana, Cuba

E. Le Riverend
Centro Nacional de Biopreparados, Ministerio de Salud Pública
La Habana, Cuba

E. Padrón
Centro de Estudios Aplicados al Desarrollo Nuclear
La Habana, Cuba

Resumen

La gammaglobulina de donantes inmunizados con vacuna antimeningocócica BC cubana se utiliza actualmente en el tratamiento de la enfermedad meningocócica en nuestro país. Para tratar de eliminar inconvenientes que presentan los métodos de esterilización tradicionalmente usados (por pérdidas en el filtro y porque no se elimina el riesgo de infecciones virales) se realiza el estudio del efecto de la irradiación con Co-60 en la gammaglobulina antimeningocócica. La gammaglobulina se obtuvo por fraccionamiento etanólico y se irradió a diferentes dosis en solución con distintos estabilizadores y liofilizada. Los resultados de los controles químicos realizados permiten concluir que es factible aplicar la radioesterilización a este producto en forma liofilizada. La conservación de la actividad bactericida aun después de las dosis más altas de irradiación utilizadas confirma lo anterior.

EFFECT OF Co-60 IRRADIATION ON HYPERIMMUNE ANTIMENINGOCOCCUS GAMMAGLOBULIN

Abstract

Gammaglobulin from voluntary blood donors immunized with the Cuban BC antimeningococcus vaccine is now being used in our country for the treatment of the meningococcus disease. This study of the effect of Co-60 irradiation on antimeningococcus gammaglobulin was carried out to try to eliminate the inconvenients shown by the traditionally used sterilization procedures (losses in the filter and persistence of viral contamination). Gammaglobulin was obtained by ethanol fractionation and was irradiated at different doses in solution with different stabilizers and it was also lyophilized. Results of the chemical controls carried out lead to the conclusion that it is possible to use radiosterilization on this product in a lyophilized form. The preservation of bactericidal activity, even after the highest irradiation doses, confirms the above mentioned.

INTRODUCCION

La fracción gammaglobulina del plasma humano ha sido utilizada como tratamiento en múltiples enfermedades infecciosas. En nuestro laboratorio, se prepara una gammaglobulina hiperinmune (GGH) para el tratamiento de la enfermedad meningocócica [1]. Este preparado, como otros hemoderivados, puede transmitir diversas infecciones, por lo cual es necesario esterilizarlo. Ello no es posible por ningún procedimiento que incluya calor; por lo cual se utiliza un filtro bacteriológico.

La microfiltración tiene dos inconvenientes: se producen pérdidas por la adsorción en el filtro y los virus no son retenidos, por lo que no se elimina el riesgo de

las infecciones virales. Esta GGH es obtenida por fraccionamiento etanólico, método que elimina el riesgo de trasmisión del virus de la inmunodeficiencia humana [2], y en el caso de la hepatitis, se reduce la trasmisión, habiéndose reportado casos de hepatitis no A no B tras el tratamiento con estos preparados [3]. A nuestro producto final se le realizan pruebas que permiten garantizar la ausencia de estos dos virus.

Como la mayoría de los pacientes que se tratan son niños, que constituyen el grupo de mayor riesgo para la enfermedad meningocócica, y que, a su vez, son más susceptibles a la infección por virus como el citomegalovirus, el virus de Epstein-Barr, el herpes simple, etc., se necesita un método de esterilización que elimine esta posibilidad.

La capacidad de las radiaciones ionizantes para destruir los microorganismos está bien demostrada y se ha aplicado comercialmente con fines médicos [4]. Este método es especialmente importante cuando otros métodos químicos y físicos no pueden utilizarse, o no dan el resultado requerido. Por ello nos propusimos estudiar el efecto de las radiaciones ionizantes sobre la gammaglobulina hiperinmune antimeningocócica para evaluar su estabilidad en un rango de dosis, generalmente aceptado como esterilizante.

MATERIALES Y METODOS

Para la obtención de la GGH se partió de plasmas de donantes voluntarios, previamente inmunizados con la vacuna antimeningocócica BC de producción nacional, que tenían altos títulos de anticuerpos bactericidas. Se utilizó el método de fraccionamiento etanólico de Cohn-Oncley [5-6] con modificaciones, para hacer más económica la producción y aumentar el rendimiento del producto final [7].

El producto obtenido en el proceso de purificación se distribuyó por bulbos según las diferentes variantes que se someterían a irradiación. Estas fueron:

1. Gammaglobulina hiperinmune (50 mg/ml) en solución de agua destilada.
2. Gammaglobulina hiperinmune (100 mg/ml) en solución a partes iguales con albúmina humana al 10%.
3. Gammaglobulina hiperinmune (50 mg/ml) en solución de agua destilada a la cual se adicionó glicina.
4. Gammaglobulina hiperinmune (100 mg/ml) en solución a partes iguales con albúmina humana al 10% y glicina al 2,25%.
5. Gammaglobulina hiperinmune (80 mg/ml) en solución a partes iguales con albúmina humana al 10%, posteriormente liofilizada, procurando que el contenido de humedad fuera el mínimo.

La irradiación se realizó en una fuente de Co-60 soviética tipo MPX-25M, controlándose la temperatura ($+4 \pm 1^\circ\text{C}$); utilizándose las siguientes dosis de irradiación: 2,5; 5; 10; 15; 20 y 25 kGy.

Se realizó electroforesis en acetato de celulosa y determinación de proteínas por el método de Biuret como controles químicos de estabilidad de la GGH. Además se realizó la prueba de inocuidad en curieles y ratones según los requerimientos de la OMS para productos biológicos [8].

La conservación de la función biológica se evaluó mediante la determinación de anticuerpos bactericidas antimeningocócicos según el método descrito por Sáez-Nieto [9], el cual se basa en determinar la mayor dilución de muestra problema que destruye aproximadamente el 50% de los meningococos contenidos en 25 mcl de una suspensión previamente nor-

malizada. Los títulos de las muestras se determinan en diluciones dobles seriadas.

RESULTADOS

La gammaglobulina en solución y en ausencia de albúmina mostró cambios en su aspecto luego de ser sometida a la irradiación. De estas, la variante que no contenía glicina a la dosis de 10 kGy mostró un color blanco lechoso y a partir de 15 kGy se separó un precipitado con aspecto de albúmina de huevo desnaturalizada y un sobrenadante de igual color. En la variante que contenía glicina los cambios comenzaron a observarse a partir de 15 kGy, donde el producto irradiado se mostró más denso, con grumos y de aspecto lechoso. A las dosis de 20 y 25 kGy se separó un precipitado blanco y un sobrenadante transparente.

La gammaglobulina en solución que contenía albúmina humana al 10% no mostró cambios en su aspecto después de irradiada. Igual comportamiento tuvo la que se trabajó liofilizada.

En todas las formas en que se preparó la GGH y a todas las dosis de irradiación utilizadas, la prueba de inocuidad mostró resultados satisfactorios.

En la figura 1 se muestra el zimograma de la electroforesis en acetato de celulosa de la gammaglobulina irradiada sin albúmina y sin glicina. En ella se puede observar cambios en la movilidad electroforética de la fracción gamma a la dosis de 5 y 10 kGy, y a partir de 15 kGy la pérdida del patrón característico de esta fracción, tanto en el sobrenadante como en el precipitado obtenido.

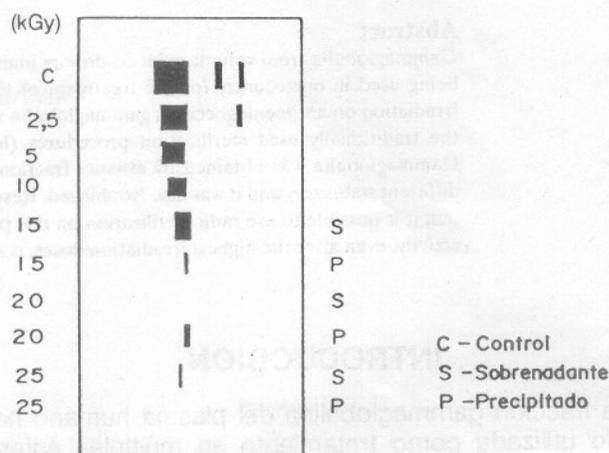


Figura 1
Gammaglobulina irradiada (solución sin glicina y sin albúmina).

En la gammaglobulina preparada sin albúmina, pero con glicina, los cambios en la movilidad electroforética se observaron a dosis de 10 y 15 kGy y la pérdida del patrón en la electroforesis se vio a partir de los 20 kGy.

Las gammaglobulinas en solución, preparadas a partes iguales con albúmina humana, mostraron un corrimiento del patrón electroforético de la fracción gamma hacia

el ánodo con respecto al control, el cual comenzó a la dosis de 10 kGy en el preparado que no contenía glicina (figura 2) y a igual dosis de irradiación en el que contenía la glicina.

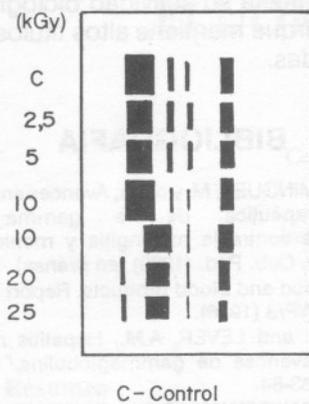


Figura 2
Gammaglobulina irradiada (solución + albúmina).

En la figura 3 se observa que la gammaglobulina liofilizada e irradiada no mostró cambios en su movilidad electroforética a ninguna de las dosis a que fue expuesta.

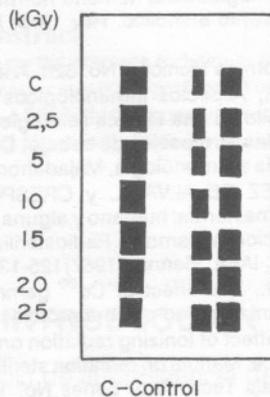


Figura 3
Gammaglobulina irradiada (lío filizada + albúmina).

La determinación de proteínas por el método de Biuret (figura 4) muestra que la concentración de proteínas en la gammaglobulina irradiada en ausencia de estabilizantes cae a partir de la dosis de 10 kGy. Esto no sucede en las gammaglobulinas que contienen albúmina y glicina, ya que independientemente de su forma de presentación (lío filizada o en solución), en ellas las medias de la concentración de proteínas se mantienen casi constantes a las dosis de irradiación a que fueron sometidas.

En la tabla 1 se presentan los resultados de la determinación de anticuerpos bactericidas antimeningocócicos realizados a muestras de la gammaglobulina lío filizada a diferentes dosis de irradiación.

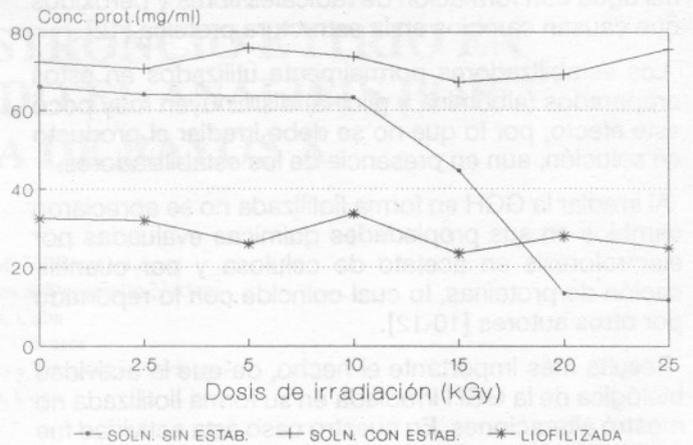


Figura 4
Determinación de la concentración proteica en gammaglobulina irradiada.

Tabla 1
Determinación de anticuerpos bactericidas en GGH lío filizada irradiada.

Dosis kGy	Título de ac. bact.
0 (control)	1: 512
2,5	1: 256
5	1:128
10	1:128
15	1:1024
20	1: 512
25	1:1024

En ella se puede observar que se mantienen los altos títulos, y que la diferencia en una dilución, considerada dentro del rango de error de la técnica, es aceptable.

DISCUSION

Aunque hemos encontrado pocos trabajos que estudien los efectos de la radioesterilización con Co-60 sobre preparados de gammaglobulina, algunos autores han reportado la posibilidad de utilizarla por las ventajas que ofrece, por ejemplo: la eliminación de la contaminación por virus, disminución de la capacidad pirogénica, no formación de componentes tóxicos en el producto y que se puede realizar en el envase final donde se comercializa, dada la elevada penetración de las radiaciones gamma [10].

No obstante, la radioesterilización en el caso de sustancias proteicas tiene el inconveniente de que las proteínas pudieran ser sensibles a este método, lo cual produciría cambios en sus propiedades químicas y por tanto en la actividad biológica [11].

Los resultados de este trabajo demuestran que la GGH en solución resulta notablemente afectada incluso a muy bajas dosis. Esto se debe al efecto de ionización

del agua con formación de radicales libres y peróxidos que causan cambios en la estructura proteica [12].

Los estabilizadores normalmente utilizados en estos preparados (albúmina y glicina) disminuyen muy poco este efecto, por lo que no se debe irradiar el producto en solución, aun en presencia de los estabilizadores.

Al irradiar la GGH en forma liofilizada no se apreciaron cambios en sus propiedades químicas evaluadas por electroforesis en acetato de celulosa y por cuantificación de proteínas, lo cual coincide con lo reportado por otros autores [10-12].

Resulta más importante el hecho, de que la actividad biológica de la GGH irradiada en su forma liofilizada no mostró alteraciones. En nuestro caso esta actividad fue evaluada por la técnica de anticuerpos bactericidas, cuyos resultados satisfactorios demuestran que la estructura de la inmunoglobulina no resulta alterada en ninguna de sus partes por el efecto de la irradiación, ya que la porción Fab que se une al antígeno (en este caso al meningococo) y la porción Fc, que es la responsable de la fijación del complemento en esta prueba, se tienen que mantener inalterables para que el resultado de la actividad bactericida de la gammaglobulina específica no se vea afectado.

Estos resultados nos permiten recomendar el uso de la irradiación con Co-60 para esterilizar gammaglobulina liofilizada. Aunque López-Martínez y colaboradores [10] demuestran la eliminación de la transmisión del virus de la hepatitis B con este método, es necesario profundizar en este aspecto, realizando estudios virológicos (técnicas inmunoenzimáticas, efecto citopático en cultivos, etc.) que lo confirmen no solo para este virus.

CONCLUSIONES

1. En ninguna de las muestras irradiadas se afectó la inocuidad del producto.
2. La irradiación de gammaglobulina con dosis esterilizantes no afecta sus propiedades químicas cuando esta se irradia liofilizada.
3. Si la irradiación se realiza en solución, los cambios químicos van desde la destrucción de la gam-

maglobulina (en ausencia de estabilizadores), hasta un corrimiento electroforético de esta fracción en presencia de albúmina y glicina.

4. La irradiación de GGH antimeningocócica en forma liofilizada no afecta su actividad biológica, lo que se demuestra porque mantiene altos títulos de anticuerpos bactericidas.

BIBLIOGRAFIA

- [1] GALGUERA DOMINGUEZ, M. y otros, Avances en inmunoterapia. Potencialidad terapéutica de la gamma hiperinmune antimeningocócica contra la meningitis y meningococcemia a meningococos. Rev. Cub. Ped. (1989) (en prensa).
- [2] PAHO/WHO, Blood and blood products. Report by the Director-General, EB79/PC/WP/3 (1986).
- [3] WEBSTER, A.D. and LEVER, A.M., Hepatitis no A no B tras administración intravenosa de gammaglobulina. Lancet (ed. en español) 8:6 (1986)83-84.
- [4] OSIPOV, V.B., RAKITSKAYA, G.A. y TROFIMOV, V.I., Aspectos actuales de la esterilización por radiaciones. Industria químico-farmacéutica. Revisión (en ruso) Serie 9 (1984) 1-37.
- [5] COHN, F.J. et al, Preparation and properties of serum and plasma proteins. A system for the separation into fraction of the protein in lipoprotein components of biological tissues and fluids, J. Amer. Chem. Soc. 68 (1946) 459-476.
- [6] ONCLEY, J. et al., The separation of the antibodies isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and beta-lipoprotein into sub-fractions of human plasma. J. Amer. Chem. Soc. 71 (1949) 541.
- [7] CADIZ, A. y otros, Ensayo de un método de obtención industrial en Cuba de una inmunoglobulina humana normal biológicamente activa por fraccionamiento etanólico. Rev. Cub. Farm. 11:1 (1977) 5-12.
- [8] OMS. Serie de informes técnicos. No. 626, Anexo 1 (1978).
- [9] SAEZ-NIETO, J.A., Aspectos inmunológicos de la *Neisseria meningitidis*. Desarrollo de una técnica serológica de medición de anticuerpos bactericidas. Protocolos de trabajo. Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología, Majadahonda, Madrid, 1975.
- [10] LOPEZ-MARTINEZ DE ALVA, L. y CRESPO CORTINA, M., Esterilización del plasma normal humano y alguna de sus fracciones por medio de irradiaciones gamma. Radiosterilization of Medical Products, Proc. series, IAEA, Vienna (1967)125-135.
- [11] ANTONI, F. et al., The effect of Co⁶⁰ gamma irradiation on various fractions of human blood-plasma proteins. op cit., 107-114.
- [12] ANTONI, F., The effect of ionizing radiation on some molecules of biological importance. Manual on radiation sterilization of medical and biological materials Tech. Rep. Series No. 149, IAEA, Vienna (1973)13-15.
- [13] GERGELY, G.A. et al., Studies of gamma ray-irradiated human immunoglobulin. Radiosterilization of Medical Products., Proc. Series, IAEA, Vienna (1967)115-124.