

## Plasma como muestra alternativa para cuantificar antitoxina tetánica

Ariel Menéndez-Barrios,<sup>1\*</sup> Pedro Sánchez-Frenes,<sup>1</sup> María de Jesús Sánchez-Bouza,<sup>2</sup> Andrés Alemañi-Co,<sup>2</sup> Sandra Gómez-Fonseca,<sup>3</sup> Rodney Kidman Nieves-Armas<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Banco de Sangre Provincial de Cienfuegos. Cienfuegos, Cuba.

<sup>2</sup>Universidad Médica de Cienfuegos “Raúl Dorticós Torrado”. Cienfuegos, Cuba.

<sup>3</sup>Hospital General Universitario “Gustavo Alderegía Lima”. Cienfuegos, Cuba.

email: arielmb@jagua.cfg.sld.cu

En los bancos de sangre de Cuba se cuantifica antitoxina tetánica, a partir del suero de donantes inmunizados, para producir una gammaglobulina humana específica. Se emplea un ensayo inmunoenzimático heterogéneo de tipo indirecto, que utiliza el suero como muestra analítica. En este trabajo se evaluó el posible empleo del plasma obtenido de la plasmaféresis como muestra alternativa, para minimizar el volumen de sangre total extraído a los donantes. Se seleccionó por muestreo aleatorio simple, 100 donantes de plasma que acudieron a donar entre octubre y noviembre del 2013. Para la obtención de suero se realizó una extracción de 5 mL de sangre por punción venosa, depositada en tubo de ensayo de cristal seco. La muestra de 1,5 mL de plasma se obtuvo al final de la donación, colectada en un tubo plástico con tapa. Se realizó la comparación de la diferencia de medias de ambos grupos, utilizando el programa estadístico informático SPSS para Windows. Los valores de antitoxina tetánica en suero fueron mayores que los del plasma. La media de las diferencias entre ambos grupos resultó estadísticamente significativa ( $p=0,00$ ). No se recomienda usar el plasma que se obtiene de la plasmaféresis como muestra analítica para este ensayo.

**Palabras clave:** inmunoensayos, bancos de sangre, UMELISA, antitoxina tetánica.

### Introducción

El tétanos es una enfermedad infecciosa causada por la acción de una neurotoxina sintetizada por *Clostridium tetani*, bacilo Gram positivo formador de esporas. A pesar de ser prevenible mediante la vacunación, el tétanos mantiene una significativa morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Por el contrario, para Cuba dejó de ser un problema de salud pública hace varias décadas. Actualmente el país exhibe una tasa de morbilidad inferior a 0,1 por cada 100.000 habitantes para esta enfermedad (1-3).

Dentro del abordaje terapéutico de esta enfermedad, se encuentra la inmunoterapia con el empleo de gammaglobulina antitetánica humana. Este anticuerpo neutraliza a la neurotoxina, reduce el curso y la severidad clínica de la enfermedad. La gammaglobulina se obtiene mediante el fraccionamiento industrial del plasma hiperinmune antitetánico proveniente de donantes inmunizados y seleccionados con altos títulos de anticuerpos. El plasma se recolecta por medio de

plasmaféresis automatizada seriada, procedimiento ético e inocuo que se realiza en el banco de sangre provincial de Cienfuegos al igual que en otros de Cuba desde finales del siglo pasado (4-6).

A estos donantes se les realiza una evaluación periódica clínica y de laboratorio que incluye estudios hematológicos, bioquímicos, serológicos, e inmunológicos, además de la valoración imprescindible del título de anticuerpos antitetánicos como garantía básica de calidad del plasma a fraccionar (7).

Para determinar el valor cuantitativo de los anticuerpos antitoxina tetánica, se han utilizado varios métodos *in vivo* e *in vitro*. El primer grupo lo conforman las pruebas de neutralización que miden directamente la actividad biológica de la antitoxina tetánica en animales de laboratorio. Esta prueba es sensible y específica, sin embargo, son caras, requieren personal altamente entrenado, un gran número de animales y gran volumen de suero para su ejecución. Dentro de los ensayos *in vitro* se encuentran la hemaglutinación pasiva, el radioinmunoensayo y el ensayo inmunoenzimático tipo

\* Ingeniero Químico. Profesor Asistente. Máster en Ciencias en Electroquímica.

ELISA, este último se utiliza ampliamente en la actualidad como herramienta eficaz para cuantificar antitoxina tetánica en suero humano, dado por su alta sensibilidad, fácil manejo y excelente automatización (8-10).

En los bancos de sangre de Cuba se emplea el UMELISA TETANUS (Centro de Inmunoensayo, La Habana, Cuba), ensayo inmunoenzimático heterogéneo de tipo indirecto, en el cual los anticuerpos antitoxina tetánica de la clase IgG, presentes en la muestra, se fijan al antígeno vacunal, el toxoide tetánico que reviste las placas de ultramicroELISA. Este examen se diseñó para emplear suero humano como muestra analítica, según recomienda la literatura interior del estuche (10).

No obstante, el empleo del plasma que se obtiene de la plasmaféresis, como muestra analítica alternativa, es una práctica que recomiendan algunos autores, con el objetivo de reducir el volumen extraído de sangre total para estudios de laboratorio, especialmente en individuos que participan en programas de aféresis repetitiva. La medida en cuestión persigue evitar la reducción de la concentración de hemoglobina y hierro sérico, sobre todo en mujeres donantes en edad fértil. Es importante conocer la influencia que pudiera conllevar sobre la calidad del ensayo UMELISA TETANUS esta modificación y evaluar si pudiera introducirse en la práctica diaria (11).

## **Materiales y Métodos**

Se realizó un estudio en el banco de sangre provincial de Cienfuegos, mediante una selección por muestreo aleatorio simple de 100 donantes de plasma hiperinmune antitetánico y plasma fresco normal que acudieron a donar durante los meses de Octubre a Noviembre del 2013.

### **Extracción, traslado y conservación de las muestras**

El suero se obtuvo a partir de la extracción de 5 mL de sangre por punción venosa, que se realizó antes de comenzar la donación. Se vertió la sangre en un tubo de ensayo de cristal seco y se mantuvo a temperatura de laboratorio (22-25°C) hasta que se logró la retracción espontánea del coágulo. Las muestras se centrifugaron a 1000 G y se decantó el mayor volumen de suero posible al seguir los procedimientos establecidos, para luego envasarse en tubo plástico con tapa. Para obtener la

muestra de plasma se tomó 1,5 mL directamente de la bolsa que se obtuvo al final de la donación y se dispensó en un tubo plástico con tapa. La plasmaféresis se realizó con un equipo colector de plasma PCS2 Haemonetics (Haemonetics Braintree MA) que emplea el citrato de sodio 4% como anticoagulante a una relación de 1 parte de citrato con 16 partes de sangre. Ambas muestras se rotularon e identificaron debidamente, conservándose a -20 °C hasta su evaluación por el laboratorio del banco de sangre provincial de Cienfuegos.

### **Técnica analítica**

La muestra se diluyó 1:400 con suero de carnero al 50% (v/v) y se colocaron 10 µL de esta dilución en las tiras de reacción conjuntamente con una curva estándar que se preparó a partir de un suero control de 50 UI/mL de concentración, luego se incubaron durante 30 min a 37 °C en cámara húmeda. Luego, se efectuaron cuatro ciclos de lavado con la solución tampón de TRIS-NaCl-tween 20, con el lavador automático de placas MAS-201, después se añadieron 10 µL de conjugado anti IgG humana/fosfatasa alcalina en cada uno de los pocillos de reacción y se incubó nuevamente 30 min a 37 °C. Posteriormente se lavaron las placas bajo las mismas condiciones ya descritas y se añadió el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil fosfato, dejándolo incubarse a temperatura del laboratorio (22-25°C) hasta lograr una fluorescencia del quinto punto de la curva entre 100-150 unidades de fluorescencia (UF). Finalmente se realizó la lectura en un equipo PR 521 de la tecnología SUMA, del Centro de Inmunoensayo (La Habana, Cuba). Cada ensayo se validó siguiendo los parámetros de control de calidad que se encuentran en la literatura interior del juego de reactivos. Todo el trabajo lo realizó un mismo analista en iguales condiciones de laboratorio (10).

### **Procesamiento estadístico**

Se calcularon los estadígrafos descriptivos fundamentales: media, desviación estándar, intervalo de confianza para la media (IC), y valores mínimos y máximos para todas las mediciones que se realizaron. Adicionalmente se ejecutó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para determinar si la muestra sigue una distribución normal. Se realizó una comparación de la media de las diferencias entre ambos grupos (suero y plasma), utilizando la prueba t para muestras pareadas.

**Tabla 1.** Estadígrafos descriptivos.

Muestra	N	Media (UI/mL)	DE (UI/mL)	IC Media (UI/mL)	Min (UI/mL)	Max (UI/mL)
Suero	100	9,0221	3,81939	1,5361 – 16,508	3,48	20,00
Plasma	100	7,0101	3,02244	1, 0871 – 12,933	1,90	17,00
Diferencia	100	2,0120	2,7977	-1,9315 – 5,955	-4,98	11,70

DE: Desviación estándar, IC: Intervalo de confianza.

**Tabla 2.** Comparación de la media de las diferencias.

Media de la diferencia (UI/mL)	IC media (UI/mL)	Prueba t para muestras pareadas
2,0120	-1,9315 - 5,955	p 0,00

IC: Intervalo de confianza.

Se fijó un nivel de significación igual o menor de 0,05 para todas las pruebas realizadas. Los cálculos se realizaron con el empleo del programa estadístico informático SPSS para Windows (*Statistical Product and Service Solutions*).

## Resultados

En la muestra estudiada se demostró su normalidad y se encontraron valores superiores de concentración de IgG antitoxina tetánica en suero con respecto al plasma. El valor de la media de los valores séricos de esta inmunoglobulina fue de 9,022 UI/mL (IC=1,5361-16,508 UI/mL); en cambio, cuando se utilizó el plasma que se obtuvo de la plasmaféresis como muestra analítica, el valor medio fue 7,010 UI/ mL (IC= 1, 0871-12,933 UI/ mL) (Tabla 1).

La media de las diferencias entre los valores de suero y plasma de cada donante fue 2,0120 (IC=1,9315-5,955) siendo significativos (p 0,00) los valores entre ambas muestras (Tabla 2).

## Discusión

La correcta selección pre-analítica del uso o no de anticoagulantes, cual utilizar y en qué proporción, constituyen una piedra angular de la calidad total en el trabajo de un laboratorio.

La utilización de plasma como muestra analítica alternativa al suero (plasma libre de fibrinógeno obtenido por el simple procedimiento de dejar coagular la muestra de forma espontánea después de depositarla en un tubo seco), presenta ventajas como la reducción en el tiempo en que se obtienen los resultados, de especial importancia en la atención al paciente grave. Además, se obtiene un mayor volumen de muestra, se evitan las interferencias y cambios inducidos por la coagulación y se disminuye el riesgo de hemólisis y trombocitólisis (12-14).

Por otro lado, la adición de anticoagulantes a la muestra, obstaculiza ciertos métodos analíticos al interferir en las reacciones, tal y como sucede con la inhibición enzimática en técnicas ELISA.

Por ejemplo, el citrato de sodio posee efecto inhibitorio sobre la actividad de la fosfatasa alcalina por la unión de este a cofactores enzimáticos como el Zinc. Sin embargo, si bien esta enzima se utiliza en el conjugado (Anti IgG humana/fosfatasa alcalina) del ensayo UMELISA TETANUS, es poco probable que el citrato de sodio 4% pueda interferir directamente, ya que el anticoagulante en el plasma se remueve durante el paso de lavado, después de la primera incubación y antes de la adición del conjugado (10-12, 14).

Otra desventaja del uso de anticoagulantes en los ensayos de laboratorio, es la modificación en la concentración de las cantidades medidas (error volumétrico por dilución). La proporción anticoagulante/sangre (1/16) que se utiliza en la plasmaféresis, introduce error volumétrico al mezclar una parte de citrato de sodio al 4 % con dieciséis partes de sangre total, diluyendo sustancias que se encuentran en el plasma humano en bajas concentraciones. A juicio de los investigadores, este particular, constituye el origen de la obtención de cifras más bajas, estadísticamente significativas, de concentración de IgG antitoxina tetánica en plasma con citrato de sodio 4% obtenido de la plasmaféresis, al compararse con las que se obtienen en el ensayo cuando se utiliza suero (12).

Generalmente el suero es la muestra de elección para el diagnóstico serológico de enfermedades infecciosas. Este puede ser esencial para ciertas técnicas inmunológicas como: fijación de complemento o pruebas de aglutinación; sin embargo, para otras pruebas: hemaglutinación, ELISA o inmunoblot, pueden utilizarse suero o plasma. Algunos juegos de reactivos que emplean métodos inmunoenzimáticos para cuantificar anticuerpos de la clase IgG antitoxina tetánica, incluyen el empleo de plasma heparinizado o con EDTA, como muestra alternativa al suero.

Cuando se decide utilizar el plasma como muestra analítica para los ensayos de química clínica, inmunología o serología, es recomendable seleccionar como anticoagulantes a la heparina o el EDTA en concentraciones de 0,75 mg/mL y 1 mg/mL respectivamente, mientras que el uso de citrato de sodio se reserva habitualmente para exámenes de hemostasia y la sedimentación globular en proporciones mayores que la que se empleó en este estudio (8, 12-14).

Los resultados de esta investigación y las evidencias que se encontraron durante la revisión bibliográfica, sugieren que no es recomendable usar plasma proveniente de la plasmaféresis como muestra analítica para cuantificar IgG humana antitoxina tetánica empleando el UMELISA TETANUS.

## Referencias

1. Jonghwan S, Jinjoo K, Kyoungjun S. Influences on Formation of Tetanus Antibody after Simultaneous Injection of Tetanus Immunoglobulin with Tetanus Vaccine. *J Korean Med Sci* 2012;27(8):934-8.
2. Rojas-Ochoa F. Tétanos, Difteria y Tos ferina. En: Rojas-Ochoa F. *Vacunas Cuba 1959 -2008*. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2011.p.117-9.
3. Jafarzadeh A, Shabani Z, Hassanabadi M, Rezayati MT, Nemat M, Sayadi AR, et al. Lower immunity to tetanus in cigarette smoker subjects. *JOHE* 2012;1(3):124-31.
4. Klein HG, Anstee DJ. Exchange transfusion and haemapheresis. In: Klein HG, Anstee DJ. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 11 ed. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2009.p.774-809.
5. Ballester-Santovenia JM, Alfonso-Valdés ME, Ballester-Planes L, Bencomo-Hernández A, Cortina-Rosales L, Macías-Abraham C, et al. *Procedimientos para bancos de sangre y servicios de transfusión*. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2009.
6. Klein HG, Anstee DJ. The transfusion of platelets, leucocytes, haemopoietics cells and plasma components. In: Klein HG, Anstee DJ. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 11 ed. Massachusetts: Blackwell Publishing; 2009.p.611-65.
7. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. *Obtención de plasma humano mediante plasmaféresis productiva automatizada, regulación No. 9/2006*. La Habana: CECMED; 2006.
8. IBL INTERNATIONAL. *Tetanus IgG ELISA. Enzyme immunoassays (microtiter strips) for the quantitative determination of IgG antibodies against Tetanus in human serum and plasma*. Hamburg: IBL INTERNATIONAL; 2013.
9. Cortez Diagnostics. *Anti-Tetanus Toxoid ELISA test kit*. California: Diagnostics Inc; 1994.
10. TecnoSuma. *UMELISA TETANUS, código UM 2010*. La Habana: Tecnosuma Internacional S.A; 2003.
11. Cable R, Glynn SA, Kiss JE, Mast AE, Steele WR, Murphy EL, et al. Iron deficiency in blood donors: the REDS-II Donor Iron Status Evaluation (RISE) study. *Transfusion* 2012;52(4):702-11.
12. Morán-Villatoro L. *Obtención de muestras sanguíneas de calidad analítica*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2006.
13. Miller H, Lifshitz MS. Pre-Analysis. In: McPherson R, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 21<sup>st</sup>. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.p.20-31.
14. Suardíaz-Pareras JH. Fase pre analítica. En: Suardíaz-Pareras JH, Cruz-Rodríguez CL, Colina-Rodríguez AJ. *Laboratorio Clínico*. La Habana: Editorial CienciasMédicas; 2007.p.11-7.

---

## **Plasma as alternatively sample to quantify tetanus antitoxin**

### **Abstract**

Tetanus antitoxin is quantified in Cuba at blood banks, from the serum of immunized donors, to produce a specific human gamma globulin. A heterogeneous indirect immunoenzymatic assay is used, using the serum as analytical sample. The possible use of plasma obtained from plasmapheresis as alternative sample was evaluated in this research, to minimize the volume of total blood extracted to the donors. One hundred plasma donors who came to donate between October and November 2013 were selected by simple random sampling. Serum sample was obtained for extraction of 5 mL of blood, deposited in dry glass tube. While the other sample took 1.5 mL of plasma in a plastic tube with cover, at the end of the donation directly of the unit of plasma collected. Comparison of the difference between the means of both groups was done using SPSS for Windows. It was found that the values obtained in serum were bigger than those obtained in plasma. Difference between the means of both groups was statistically significant ( $p < 0.00$ ). It is not advisable to use the obtained plasma of the plasmapheresis as analytic sample in this assay.

**Key words:** immunoassays, blood banks, UMELISA, tetanus antitoxin.

---

*Recibido: Octubre de 2014*

*Aceptado: Noviembre de 2014*