

Desempeño de un método analítico para determinar la función Fc en concentrados de inmunoglobulinas elaborados en el Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba

Performance evaluation of an analytical method to determine the Fc function in immunoglobulin concentrates produced at Laboratorio de Hemoderivados of the National University of Córdoba

Noelia S. Bosio* , Adriana E. Oviedo* , Hugo D. Martínez* , María E. Bernardi .

Laboratorio de Hemoderivados; Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

*Estos autores contribuyeron equitativamente al desarrollo del trabajo.

✉ Noelia S. Bosio: noelia.bosio@unc.edu.ar

Recibido: 10 de noviembre de 2023. Aprobado: 29 de diciembre de 2023.

RESUMEN

La Inmunoglobulina G (IgG) tiene como principal función atacar y eliminar a cualquier antígeno extraño que haya ingresado al organismo, y es la principal responsable de la inmunidad humoral. La molécula de IgG está constituida por dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas, unidas entre sí por puentes disulfuro. Por acción enzimática, la IgG puede escindirse en fragmentos: un fragmento Fab, a través del cual la IgG se une al antígeno, y un fragmento cristalizante o fragmento Fc. Dado que este último media un gran número de mecanismos biológicos como, por ejemplo, la activación del sistema de complemento, resulta de vital importancia determinar su función en los concentrados purificados de IgG utilizados para realizar terapia de sustitución. En Farmacopea Europea (FE) se describe una técnica para la evaluación de la función Fc basada en la capacidad de la IgG de unirse a un antígeno adsorbido al glóbulo rojo (GR) y producir la lisis del mismo a través de la activación del sistema de complemento. Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar el desempeño del método descrito en FE, a través de los parámetros precisión, especificidad y veracidad, y analizar concentrados de IgG elaborados en el Laboratorio de Hemoderivados (LH) para administración endovenosa y subcutánea. A través del análisis de los parámetros antes mencionados, se demostró que el método analítico evaluado posee un desempeño satisfactorio para determinar la función Fc, garantizando la calidad y eficacia de los concentrados terapéuticos. Además, se concluyó que las diferencias en los procesos productivos para obtener concentrados de administración endovenosa o subcutánea no afectan la funcionalidad del fragmento Fc de la IgG.

Palabras clave: fragmento Fc; inmunoglobulina G; método.

ABSTRACT

The main function of Immunoglobulin G (IgG) is to attack and eliminate any foreign antigen that has entered the body, and it is primarily responsible for humoral immunity. The IgG molecule is composed of two heavy chains and two light chains, linked together by disulfide bridges. Through enzymatic action, IgG can be cleaved into fragments: a Fab fragment, in which IgG binds to the antigen, and a crystallizable fragment, or Fc fragment. Since the latter mediates several biological mechanisms, such as complement system activation, it is crucial to determine its function in purified IgG concentrates used for replacement therapy. The European Pharmacopoeia (EP) describes an assay for evaluating Fc function based on the ability of IgG to bind to an antigen adsorbed to red blood cells (RBC) and produce its lysis through complement system activation. The objectives of this study were to evaluate the performance of the method described in EP through the parameters of precision, specificity, and accuracy, and to analyze IgG concentrates produced at the Laboratorio de Hemoderivados (LH) for intravenous and subcutaneous administration. The analysis of said parameters demonstrated that the evaluated analytical method has satisfactory performance in determining Fc function, ensuring the quality and efficacy of therapeutic concentrates. Additionally, the study concluded that differences in the production processes to obtain concentrations for intravenous or subcutaneous administration do not affect the functionality of the Fc fragment of IgG.

Keywords: Fc fragment; immunoglobulin G; method.

INTRODUCCIÓN

La molécula de Inmunoglobulina G (IgG) es una glicoproteína producida por los linfocitos B o sus células derivadas (células plasmáticas) y representa el 80 % de las inmunoglobulinas totales con una concentración sérica que varía entre 600 y 1.800 mg%. Tiene un peso molecular de 150.000 Daltons y está formada por cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí por puentes disulfuro: dos cadenas de mayor tamaño (cadenas pesadas) y dos de menor tamaño (cadenas livianas). Las cadenas livianas poseen dos regiones: una que corresponde al extremo carboxílico que es constante y otra en el extremo amínico, la cual es muy variable. Las cadenas pesadas también poseen una región variable y otra constante. A su vez, mediante la utilización de enzimas tales como papaína o pepsina, la molécula de IgG puede ser separada en diferentes fragmentos. El tratamiento con papaína divide la IgG en dos fragmentos Fab idénticos y un fragmento Fc. Por otro lado, el uso de pepsina provoca una ruptura que resulta en la generación de un fragmento $F(ab')_2$ y un fragmento Fc (o pequeños fragmentos del mismo) (Figura 1)^[1-3].

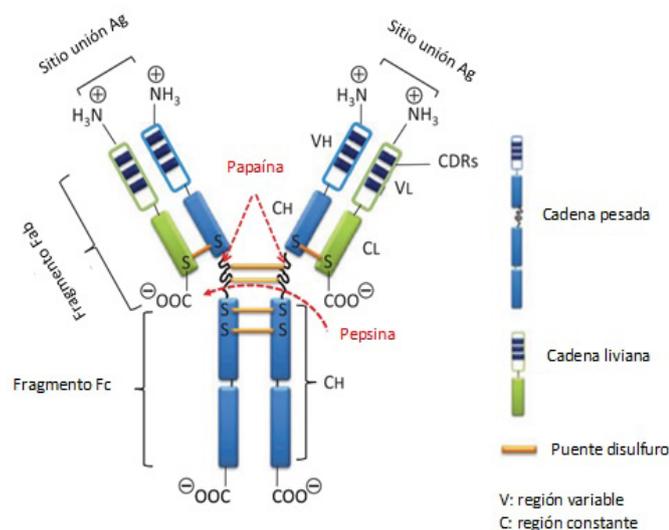


Figura 1: Estructura esquemática de la molécula de inmunoglobulina (Adaptado de Radosevich M, Burnouf, T. 2010).

A través de los fragmentos Fab y Fc, las inmunoglobulinas median un gran número de mecanismos tales como la neutralización inmune y las actividades inmunomoduladoras, las cuales dependen de la integridad estructural de la molécula. El reconocimiento del antígeno se produce a través del fragmento Fab. A su vez, mediante la unión al receptor de Fc presente en las células (macrófagos, polimorfonucleares o células NK), la IgG es capaz de ejercer una amplia variedad de funciones efectoras tales como la fagocitosis, la activación del sistema de complemento y la citotoxicidad mediada por anticuerpos, produciéndose, de esta manera, la eliminación del antígeno o agente extraño^[4].

Cuando existen ciertos defectos inmunológicos tales como inmunodeficiencias primarias, inmunodeficiencias secundarias, infecciones, desórdenes inflamatorios y padecimientos autoinmunes, incluyendo los de origen reumatológico, dermatológico, neurológico, hematológico, como así también en trasplantes, es necesario realizar terapia de reemplazo con concentrados de IgG que contienen como principio activo IgG polivalente^[5,6]. Dichos concentrados pueden administrarse a través de diferentes vías (endovenosa, subcutánea, intramuscular) y son elaborados a partir del plasma humano proveniente de la donación voluntaria de sangre y/o plasma. El Laboratorio de Hemoderivados (LH) es un laboratorio farmacéutico perteneciente a la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, cuya principal actividad es la elaboración de medicamentos derivados del plasma humano, como concentrados de IgG, utilizando un proceso de fraccionamiento etanólico en frío basado en el método de Cohn^[7]. Como materia prima, se emplean *poles* de plasma humano provenientes de más de 1.000 donantes, a fin de garantizar que los concentrados de IgG contengan un amplio espectro de anticuerpos que representen a aquellos que circulan en la población^[8,9]. Los procesos de purificación llevados a cabo a fin de obtener dichos concentrados incluyen etapas específicas de inactivación y/o remoción viral garantizando tanto la seguridad de los mismos como la integridad funcional de la IgG, la cual es crucial para su función como defensa del organismo y en su papel como responsable de la respuesta inmune humoral.

Para determinar la función Fc en preparados de IgG existe una técnica descrita en el capítulo dos (método de análisis) de Farmacopea Europea (FE)^[10] basada en la capacidad que posee la IgG de unirse a un antígeno adsorbido a un glóbulo rojo (GR) y, a través de su Fc, fijar y activar componentes del complemento y provocar la hemólisis de los mismos. La función Fc se determina al comparar el descenso de absorbancia (Abs) entre las muestras de referencia y problema, causado por la lisis de los GR en presencia de un complejo anticuerpo-(Fc)-antígeno-complemento. Luego, la liberación de hemoglobina producida durante la hemólisis de los GR se determina mediante la medición de la caída de Abs a una longitud de onda de 541 nm.

En el presente trabajo, se evaluó el desempeño de la técnica siguiendo el método A descrito en FE, con el fin de demostrar su capacidad de producir resultados confiables al determinar la función Fc en concentrados de IgG elaborados en el LH, asegurando así su calidad y eficacia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

- Human Immunoglobulin Biological Reference Preparation (BRP) batch 3 of EDQM, Council of Europe (Strasbourg, France): concentrado de inmunoglobulina humana reconstituido según indicaciones del fabricante. Según el folleto que acompaña esta preparación, el índice de función Fc de la muestra a ser examina-

da cumple con el test si el mismo no es menor que 60 %.

- Human Immunoglobulin pepsin treated (BRPt): Sample D BSP068 of EDQM, Council of Europe (Strasbourg Cedex 1): concentrado de inmunoglobulina humana tratado con pepsina reconstituido según indicaciones del fabricante.
- Albúmina Sérica Bovina (ASB) de Sigma (Saint Louis, USA).
- Ácido tánico de MP Biomedicals (Solon, Ohio).
- Antígeno de rubéola de Aalto BioReagents (Ag) (Dublin, Ireland).
- Complemento de cobayo: *pooles* de sueros de no menos de 10 animales (Córdoba, Argentina).
- Albúmina Sérica Humana (ASH 20 g%), Laboratorio de Hemoderivados (Córdoba, Argentina).
- Inmunoglobulina G endovenosa (IgGEV), Laboratorio de Hemoderivados (Córdoba, Argentina).
- Inmunoglobulina G subcutánea (IgGSC), Laboratorio de Hemoderivados (Córdoba, Argentina).

Soluciones de trabajo

- *Buffer* fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés): 0,15 M NaCl, 7,19 mM Na₂HPO₄ y 2,83 mM NaH₂PO₄, pH 7,2.
- Solución de calcio y magnesio: 0,40 M CaCl₂ y 2,14 M MgCl₂.
- *Buffer* barbital: 0,71 M NaCl, 25 mM barbital sódico, 1 mM CaCl₂ y 5,35 mM MgCl₂, pH 7,3.
- *Buffer* barbital-albúmina: 142 mM NaCl, 5 mM barbital sódico, 0,2 mM CaCl₂, 1,07 mM MgCl₂ y 0,15 % ASB.
- Ácido tánico: 10 mg% en PBS.
- Citrato de sodio: 3,2 %.

Preparación y recubrimiento de glóbulos rojos con antígeno de rubéola

Mediante punción venosa del pliegue interno del codo de un donante voluntario, se extrajo sangre entera grupo O^[11], empleando como anticoagulante citrato de sodio, y luego se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 min. Los GR sedimentados se lavaron tres veces con *buffer* PBS y, luego del lavado final, se preparó una suspensión de GR al 2 % (v/v) en PBS.

Esta suspensión se mezcló con un volumen igual de la solución de ácido tánico diluida 1:75 (0,133 mg%) en PBS y se incubó en baño maría a 37 °C por 10 min. Luego, se centrifugó a 2.500 rpm durante 10 min y los GR se lavaron dos veces con PBS, para posteriormente preparar una suspensión al 1 % v/v en el mismo *buffer*. Para sensibilizar los GR, el antígeno de rubéola (Ag) se diluyó 1:40 en PBS, y a 1,6 ml de la solución de Ag diluida se le agregaron 8 ml de GR preparados al 1 % v/v. Posteriormente, se realizó una incubación durante 30 min a 37 °C. Los GR sensibilizados fueron recolectados por centrifugación y lavados tres veces con *buffer* barbital-albúmina. Luego de la centrifugación final, se preparó una suspensión de GR al 1,33 % v/v en *buffer* barbital-albúmina y se midió la Abs a 541 nm de una dilución 1:10 de dicha suspensión, la cual debe encontrarse entre 1,0 ± 0,1. La cantidad de Ag empleado para la sensibilización de los GR fue analizada en ensayos previos en los que se emplearon diferentes concentraciones de Ag para finalmente definir como adecuada la dilución 1:40.

Preparación de las muestras

Como solución de referencia de la función Fc, se utilizó BRP, y como control complemento, *buffer* barbital-albúmina. Para llevar a cabo el ensayo, se tomó una alícuota de la muestra a analizar (referencia, problema) tal que la misma contuviera 30 mg de proteínas totales (esta concentración se definió luego de ensayos de prueba con 30 mg y 40 mg de proteína). Luego se diluyó cada muestra a un volumen final de 900 µl empleando *buffer* barbital-albúmina, se añadieron a cada una de ellas 100 µl de la solución de GR sensibilizados al 1,33 % v/v y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 1.000 µl de *buffer* barbital-albúmina, se realizaron dos lavados de los GR y el sedimento de GR se resuspendió finalmente en 200 µl del mismo *buffer*. Cada muestra fue analizada al menos por duplicado.

Medición de la hemólisis mediada por complemento

Cada tubo de reacción que contenía los 200 µl de muestra (control complemento, referencia, muestra problema) preparadas según el ítem "Preparación de las muestras", tratadas con los GR sensibilizados, fueron analizadas individualmente. A cada una de ellas se les adicionaron 600 µl de *buffer* barbital-albúmina (previamente atemperado a 37 °C), se homogeneizaron y se incubaron a 37 °C por 2 min. Pasado este tiempo, se agregaron 200 µl de complemento e inmediatamente se comenzó a medir la Abs a 541 nm durante 15 min, con la cubeta termostatzada a 37 °C, tomando lecturas en intervalos de 30 s en espectro Shimadzu UV-1800. Al graficar la Abs en función del tiempo, se obtuvieron curvas de hemólisis como las que se muestran en la **Figura 2**.

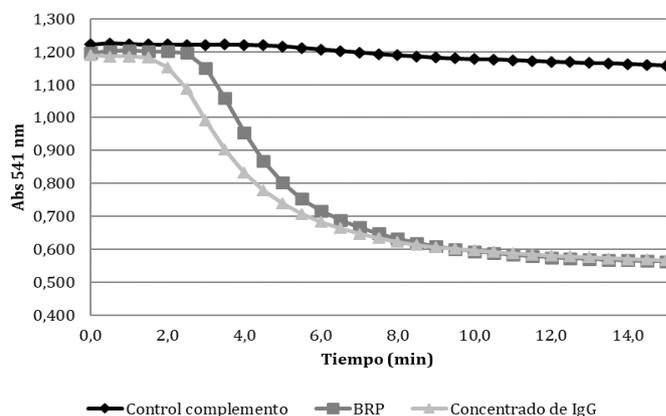


Figura 2: Curvas de hemólisis típica para control complemento, BRP y concentrado de IgG.

Cálculo del índice de la función Fc

Con los datos de Abs obtenidos para cada muestra (control complemento, referencia, problema), se realizó el cálculo del índice de la función Fc (IFc) de la siguiente manera: para cada muestra se segmentó la sección correspondiente al punto de inflexión de

la curva de hemólisis en intervalos de 30 s. Luego, se calcularon los deltas de Abs (ΔAbs) cada 30 s (pendientes). Para obtener la pendiente corregida (S') de cada muestra se consideró el mayor valor obtenido de $\Delta\text{Abs}/30$ s como pendiente (S_e), el cual se dividió por la Abs registrada al comienzo de la medición a $t=0$ (A_i):

$$S' = S_e / A_i$$

Se calcularon los valores promedios de pendiente corregida (S') tanto para el control complemento (S'_{C}) como para la muestra de referencia (S'_{BRP}). Luego, para la muestra problema se determinó el IFc de manera independiente, del siguiente modo:

$$\text{IFc} = (S' - S'_{\text{C}} / S'_{\text{BRP}} - S'_{\text{C}}) * 100$$

El resultado final se expresó como un porcentaje relativo a BRP (100 %). El IFc final para la muestra problema se expresó como la media aritmética de las determinaciones independientes. Para cumplir con el criterio de aceptación, el IFc de la muestra problema no debe ser menor al IFc declarado en el folleto que acompaña a la preparación de referencia, en este caso 60 %.

Desempeño del método

Según guías nacionales e internacionales^[12-16], los métodos analíticos normalizados solo deben comprobar su idoneidad y desempeño bajo las condiciones particulares de uso, con lo cual los mismos no requieren de una validación completa. Teniendo en cuenta que el método de determinación de la función Fc aplicado en el presente trabajo se encuentra codificado en FE, se planteó la necesidad de demostrar su desempeño para el uso propuesto y bajo las condiciones de trabajo existentes en el LH. Según las características del método, el mismo se clasifica como un método de categoría III: métodos para evaluar las características de desempeño. Para métodos incluidos dentro de esta categoría, solo se requiere la evaluación del parámetro precisión, no obstante, en el presente trabajo se ampliaron los parámetros de evaluación incluyéndose también veracidad y especificidad.

Precisión

La repetibilidad fue evaluada analizando seis muestras independientes de BRP en un mismo ensayo. Para precisión intermedia, se realizaron tres ensayos en tres días distintos, analizándose, en cada uno de ellos, tres muestras independientes de BRP.

Tanto para repetibilidad como para precisión intermedia los resultados fueron expresados a través de la desviación estándar (DE) y del coeficiente de variación porcentual (CV%).

Especificidad

Se utilizaron muestras que no poseen fragmento Fc en su estructura molecular tales como ASH y BRPt. Cada muestra fue analizada de manera independiente ($n=3$) en tres ensayos llevados a cabo en diferentes días. Se realizó un análisis estadístico de los resultados para identificar posibles diferencias significativas entre las muestras de ASH y BRPt en comparación con el control de complemento.

Veracidad

La muestra de referencia BRP fue analizada en un mismo ensayo, en seis determinaciones independientes. El resultado se expresó como porcentaje de recuperación (%R), considerando 100 % de IFc para la muestra de referencia.

Aplicación del método de determinación de la función Fc en muestras de concentrados de IgG

La determinación de la función Fc no se realiza de forma rutinaria en el LH, ya que no es un requisito de calidad para la liberación de lotes de concentrado final. Esta técnica se utilizó para evaluar la integridad del fragmento Fc y proporcionar información adicional a procesos de purificación ya validados, respaldados por años de experiencia en la producción de medicamentos derivados del plasma y por la presencia en el mercado de dichos productos.

El método descrito fue aplicado en concentrados de IgGEV y de IgGSC, obtenidos en LH, mediante procesos productivos que poseen diferencias en algunas etapas tales como las de inactivación viral. En este trabajo, se evaluaron tres lotes de IgGEV y tres de IgGSC, por duplicado. Los resultados fueron analizados estadísticamente a fin de evaluar la existencia o no de diferencias significativas entre los IFc obtenidos para los concentrados de administración endovenosa y los de subcutánea.

Análisis estadístico

Se empleó el test de Student a dos colas utilizando el software Infostat^[17] a fin de comprobar la existencia o no de diferencias significativas entre dos medias experimentales, considerando un valor p menor a 0,05 como significativo estadísticamente.

RESULTADOS

Precisión

Los resultados de los parámetros repetibilidad y precisión intermedia se muestran en la **Tabla 1** y en la **Tabla 2**, respectivamente.

Especificidad

En la **Tabla 3** y en la **Tabla 4** se muestran los resultados promedio de los triplicados de S' tanto del control complemento como de las muestras de ASH y de BRPt, respectivamente.

Veracidad

Los resultados de %R se muestran en la **Tabla 5**.

A modo de resumen, el CV% obtenido para repetibilidad fue del 5 %, mientras que para precisión intermedia fue del 9 %. El %R de la muestra de referencia BRP fue de 105 ± 5 %.

Los resultados del análisis estadístico demostraron que no existieron diferencias significativas entre los resultados de S' de ASH (p valor = 2.78) y de BRPt (p valor = 2.78) frente al control complemento.

Determinación de función Fc en muestras de concentrados de IgG

Los resultados obtenidos al analizar distintos lotes de concentrados de IgGEV y IgGSC se expresaron como la media aritmética \pm DE de las determinaciones individuales y se muestran en la **Tabla 6**.

Los resultados obtenidos al analizar distintos lotes de concentrados de IgGEV y IgGSC se expresaron como la media aritmética \pm DE de las determinaciones individuales y se muestran en la **Tabla 6**.

Todos los preparados analizados cumplieron con el requisito establecido para este método, no menor al 60 % (según información del folleto BRP), y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de IFc obtenidos para los concentrados de IgG de administración endovenosa vs. los de administración subcutánea (p = 0,44).

TABLA 1: REPETIBILIDAD.

IFc 1	IFc 2	IFc 3	IFc 4	IFc 5	IFc 6	Promedio	DE	CV%
105	107	112	104	104	96	105	5	5

TABLA 2: PRECISIÓN INTERMEDIA.

Ensayo 1			Ensayo 2			Ensayo 3			Promedio	DE	CV%
IFc 1	IFc2	IFc3	IFc1	IFc2	IFc3	IFc1	IFc2	IFc3			
96	82	95	98	100	111	94	86	107	97	9	10

TABLA 3: RESULTADOS DE S' DE CONTROL COMPLEMENTO Y ASH.

Ensayo	S' control complemento	S' ASH
1	0,008	0,010
2	0,014	0,016
3	0,008	0,009
Promedio	0,010	0,012

TABLA 4: RESULTADOS DE S' DE CONTROL COMPLEMENTO Y BRPt.

Ensayo	S' control complemento	S' BRPt
1	0,022	0,017
2	0,011	0,008
3	0,011	0,008
Promedio	0,016	0,011

TABLA 5: VERACIDAD.

%R 1	%R 2	%R 3	%R 4	%R 5	%R 6	Promedio	DE
105	107	112	104	104	96	105	5

TABLA 6: RESULTADOS DE IFc EN CONCENTRADOS DE IgG.

	IFcIgGEV	IFcIgGSC
Lote 1	94 ± 2	100 ± 3
Lote 2	81 ± 5	91 ± 6
Lote 3	96 ± 5	93 ± 5
Promedio	90 ± 4	95 ± 5

DISCUSIÓN

Durante los últimos años se viene experimentado a nivel global escasez de productos derivados del plasma causado por diversos motivos, entre ellos, reducción en la colecta de plasma fuente (plasmaféresis) para el fraccionamiento industrial del plasma y mayor consumo de los mismos, ya sea por mejoras en los diagnósticos o por ampliación de usos *off-label*, como es el caso de los concentrados de IgG^[18-20]. Los procesos productivos para la elaboración de concentrados de IgG han experimentado una gran evolución, obteniéndose preparados que cumplen con los requisitos de seguridad, calidad y eficacia. La integridad estructural y funcional de la molécula de IgG no debe verse afectada ni por el proceso de purificación ni por los procesos de inactivación/remoción viral aplicados durante la elaboración de estos concentrados.

A fin de demostrar la integridad del fragmento Fc de las preparaciones de IgG para uso terapéutico, existe un test descrito en FE, el cual está basado en el reconocimiento por parte del anticuerpo (IgG) del antígeno de rubéola adherido a glóbulos rojos y la consiguiente lisis de dichos glóbulos mediada por activación del complemento.

En el presente trabajo se aplicó el test de FE a fin de evaluar su desempeño para el uso propuesto y, en función de los resultados obtenidos, se pudo demostrar que el método es preciso, cumpliendo con las recomendaciones de las guías internacionales que sugieren que el CV% no debe superar el 20 %, en los métodos biológicos^[21,22]. A su vez, los valores obtenidos tanto para repetibilidad como para precisión intermedia fueron comparables a los resultados obtenidos por otros grupos de investigación. Vrdoljak^[23] reportó CV% para repetibilidad y precisión intermedia de 2,2 % y 4,6 %, respectivamente. Georgakopoulos^[24] informó un CV% de entre 5 % y 12 % para precisión intermedia y de 6 % para repetibilidad.

Además, se confirmó la veracidad de la técnica, ya que la misma cumple con el criterio internacional de ± 20 % de recuperación de la concentración nominal (80-120 %).

Por otro lado, se comprobó la especificidad del método al demostrar que no existe reacción inespecífica al analizar muestras de ASH y BRPt.

También se realizaron ensayos aislados en los cuales se variaron condiciones tales como diferentes donantes de glóbulos rojos y distintos lotes de complemento; en estos casos no se observó impacto en la idoneidad del método (resultados no mostrados) lo cual sugiere que el método es robusto ante las variaciones analizadas.

Al analizar lotes de concentrados de IgGEV y de IgGSC elaborados en el LH se observó que, además de cumplir con el criterio de aceptación para IFc (más del 60 %), las diferencias en el proceso productivo no comprometen la funcionalidad biológica del fragmento Fc de la IgG.

Se puede concluir entonces que el método es adecuado para el uso propuesto, contribuyendo, de este modo, a garantizar la calidad y eficacia de los concentrados de IgG producidos en el Laboratorio de Hemoderivados, ya sea para administración endovenosa o subcutánea.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

BIBLIOGRAFÍA

1. Radosevich M, Burnouf, T. Intravenous immunoglobulin G: trends in production methods, quality control and quality assurance. *Vox Sanguinis*. 2010;98(1):12-28. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2009.01226.x

2. Turner MW, Bennich H. Subfragments from the Fc fragment of human immunoglobulin G. Isolation and physicochemical characterization. *Biochemical Journal*. 1968;107(2):171-178. DOI: 10.1042/bj1070171
3. Heimer R, Schnoll SS, Primack A. Products of the Peptic Digestion of Human γ G-Immunoglobulin. *Biochemistry*. 1967;6(1):127-134. DOI: 10.1021/bi00853a022
4. Mora N, Rosales C. Funciones de receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunológica. *Revista de Investigación Clínica*. 2009;61(4):313-326.
5. Mogica MMD. Uso terapéutico actual de la inmunoglobulina intravenosa. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2006;44(Suppl:2):81-86.
6. Looney R, Huggins J. Use of intravenous immunoglobulin G (IVIg). *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2006;19(1):3-25. DOI: 10.1016/j.beha.2005.01.032
7. Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, et al. Preparations and properties of serum and plasma proteins, A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc*. 1946;68(3):459-475. DOI: 10.1021/ja01207a034
8. World Health Organization. Guidance on increasing supplies of plasma-derived medicinal products in low- and middle-income countries through fractionation of domestic plasma. Geneva: World Health Organization; 2021.
9. World Health Organization. WHO Technical Report Series N° 840. Geneva: World Health Organization; 1994. 218 p. Report N°: 43.
10. European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. European Pharmacopoeia. 11th edition. France: Council of Europe. 2023. Vol 1, Monograph 2.7.9, Test for Fc function Immunoglobulin; p. 295-296.
11. Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatale Chabén". Guía de procedimientos, toma de muestra para el diagnóstico serológico [Internet]. Argentina: Ministerio de Salud [citado 9 nov 2023]. Disponible en: https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/manual_-_toma_de_muestra.pdf
12. Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina. Farmacopea Argentina. 7ª edición. Argentina: Ministerio de Salud. 2019. Vol 1, Capítulo <1130>, Validación de Métodos Analíticos; p. 440-443.
13. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. ICH Harmonised Guideline, Validation of Analytical Procedures Q2(R2) [Internet]. 2023 [citado 2 nov 2023]. Disponible en: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q2%28R2%29_Guideline_2023_1130.pdf
14. Morillas Bravo PP, et al. Guía Eurachem, La adecuación al uso de los métodos analíticos, Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados [Internet]. Madrid: Eurolab España; 2016 [citado 14 jun 2023]. Disponible en: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf
15. United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopeia. USP 41-NF36. 2018. Chapter <1225>, Validation of compendial procedures; p. 7665-7670.
16. United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopeia. USP 42-NF37 2S. 2019. Chapter <1226>, Verification of compendial procedures; p. 9615-9616.
17. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat [Internet]. Versión 2020. Córdoba: Centro de Transferencia InfoStat, FCA, UNC; 2020 [actualizado 29 sep 2020; citado 22 may 2023]. Disponible en: <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=15>
18. Marante Cabrera O, Caro Teller JM, García Muñoz C, et al. Protocolo local para el uso racional de inmunoglobulinas en el hospital [Internet]. Madrid: Hospital Universitario 12 de Octubre; 2020 [citado 4 abr 2023]. Disponible en: https://www.comunidad.madrid/hospital/12octubre/file/4929/download?token=HM9aqx6_
19. Criado A, Teva M, Bejarano Rojas D, Corral M. Evaluación del uso de inmunoglobulinas intravenosas en un hospital general. *Farm Hosp*. 1998;22(2):70-74.
20. Rivero R. Estudio de utilización de Inmunoglobulina G Endovenosa en el Hospital de Pediatría SAMIC "Prof. Dr. Juan Pedro Garrahan": indicaciones autorizadas y uso off label [tesis de maestría]. Argentina: Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Abierta Interamericana; 2022.
21. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine. Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry [Internet]. US: Biopharmaceutics; 2018 [citado 9 ago 2023]. Disponible en: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
22. Committee for Medicinal Products for Human Use. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. Amsterdam: European Medicines Agency, International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; 2022.

23. Vrdoljak A, Trescec A, Benko B, Simic M. A microassay for measurement of Fc function of human immunoglobulin preparations by using tetanus toxoid as antigen. *Biologicals*. 2004;32(2):78–83. DOI: 10.1016/j.biologicals.2004.03.001

24. Georgakopoulos T, Komaraju S, Henry S, Bertolini J. An improved Fc function assay utilizing CMV antigen-coated red blood cells generated with synthetic function-spacer-lipid constructs. *Vox Sang*. 2012;102(1):72-78. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2011.01512.x



Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0). Atribución – Se debe dar crédito de manera adecuada, brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante. Sin restricciones adicionales – No se pueden aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras personas a hacer cualquier uso permitido por la licencia.