Obtención de anti-inmunoglobulinas como reactivos biológicos para la producción de diagnosticadores inmunoenzimáticos

Fragas-Quintero A, Díaz-Herrera DF, Cruz-Sui O, Cruz-Santana Y, Martín-Alfonso D, Montano-TamayoL
Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil, Mayabeque, Cuba.
Email: feloany@infomed.sld.cu

RESUMEN

Laboratorios DAVIH, cuenta con la tecnología y la experiencia de más de 25 años en la obtención y purificación de inmunoglobulinas de tipo G (IgG) anti especie-específicas y contra antígenos de interés, empleados como componentes biológicos en técnicas de ELISAs y Western blot para el diagnóstico de retrovirus humanos y otras enfermedades infecciosas. Los modelos animales empleados para la obtención de antisueros son conejos y carneros; sin embargo no contamos con conjugados contra ninguna de estas dos especies que nos permitan un monitoreo adecuado del título de estos biológicos. Además debido a la mejora continua de los diagnosticadores y la necesidad de diversificar nuestros servicios se han hecho necesarias nuevas producciones de IgG anti especie-específicas y de anticuerpos policlonales contra proteínas antigénicas obtenidas de cultivo de *Brucella abortus.* El objetivo de nuestro trabajo fue obtener sueros policlonales anti IgG cunícula, ovina, bovina, porcina, murina y anti *Brucella abortus*. Para la obtención de los antisueros se inocularon tres conejos por cada modelo animal y un carnero para el suero hiperinmune anti IgG Cunícula, a través de un protocolo de inmunización establecido en nuestro centro. Para la obtención de los anticuerpos policlonales anti IgG especie-específicas, se emplearon métodos cromatográficos de afinidad e inmunoafinidad. Las inmunoglobulinas purificadas se concentraron hasta 10 mg/mL y se evaluaron en los sistemas de diagnóstico considerando la sensibilidad y especificidad del ensayo. Se lograron obtener múltiples inmunoglobulinas anti IgG especie-específicas y contra antígenos de *Brucella abortus* con las especificaciones de calidad requeridas. Se establecieron las metodologías para la obtención de las mejores variantes de anticuerpos policlonales, de acuerdo a los intereses de nuestros productores y un mejor monitoreo de las producciones de componentes biológicos intermedios de los diagnosticadores producidos en Laboratorios DAVIH.

Palabras clave: diagnosticadores, inmunoglobulinas, anticuerpos, purificación, inmunoafinidad, columnas cromatográficas.

INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos son inmunoglobulinas séricas que se unen a antígenos específicos. Aunque pueden observarse en el suero de los individuos que han estado expuestos a un patógeno en particular, el método usual para obtener anticuerpos con fines investigativos, es la inmunización de animales con preparaciones antigénicas purificadas o parcialmente purificadas de un patógeno o una proteína en particular.[1]

Los anticuerpos policlonales obtenidos a partir de animales inmunizados con proteínas purificadas o péptidos son muy importantes para su empleo en el laboratorio. La bioquímica y biología moderna se sustentan en la existencia de una gran cantidad de anticuerpos específicos, los cuales se utilizan en técnicas tales como la inmunocromatografía, ELISAs, inmunoprecipitación y el Western blot. De tal manera que la producción de grandes cantidades de anticuerpos contra moléculas de interés es esencial para el desarrollo de programas de investigación básicos y aplicados. [2,3]

Laboratorios DAVIH cuenta con la experiencia de más de 25 años en la obtención y purificación de inmunoglobulinas de tipo G contra otras IgG especie –específicas y contra antígenos de interés diagnóstico, que se emplean en el desarrollo, fabricación y comercialización de inmunoensayos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas de importancia en la salud humana y veterinaria. Para la normalización -específicas o contra determinadas proteínas de interés diagnóstico que se emplean directamente como conjugados o para el monitoreo de procesos de obtención de reactivos biológicos intermedios.[4, 5] Desde hace varios años, los modelos animales empleados para la obtención de estos antisueros son conejos y carneros, sin embargo, no contamos con conjugados contra ninguna de estas dos especies que nos permita un monitoreo más adecuado de los antisueros que se obtienen. En la actualidad, uno de los objetivos principales de los Laboratorios DAVIH es la diversificación de sus producciones y servicios por lo que se han hecho necesarias nuevas producciones de IgG anti especie-específicas y de anticuerpos policlonales contra proteínas antigénicas obtenidas de cultivo de *Brucellaabortus;* productos que además pueden tener clientes potenciales de la industria biotecnológica nacional.

OBJETIVOS

General: Obtener inmunoglobulinas anti IgG especie-específicas y contra otros ligandos de interés diagnóstico.

Específicos:

1. Obtener antisueros con altos títulos de anticuerpos anti IgG cunícola, ovina, bovina, porcina, murina y contra antígeno de *Brucella abortus*.
2. Obtener anticuerpos policlonales purificados, anti IgG cunícula, ovina, bovina, porcina, murina y anti *Brucella abortus* por cromatografía de afinidad e inmunoafinidad.
3. Evaluación de las inmunoglobulinas obtenidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inóculos: Las IgG porcina, murina y cunícula se obtuvieron por purificaciones con matriz proteína A -sefarosa y las IgG ovina y bovina por una matriz proteína G-sefarosa.

El antígeno natural de *Brucella abortus* cepa 99, se obtuvo a partir de un cultivo celular inactivado por sonicación y centrifugación.

Modelos animales para la inmunización:

- Conejos: Se emplearon3 conejos raza Nueva Zelanda hembras de 2 Kg de peso por cada inmunización con: IgG ovina, bovina, porcina, murina y antígeno crudo de *Brucella abortus.*
- Carneros: Se empleó un carnero raza Pely Buey, macho entre 25 y 30 kg de peso para la inmunización con IgG cunícola.

Para la obtención de los sueros hiperinmunes anti IgG especie-específicas (IgG ovina, bovina, porcina, murina y antígeno crudo de *Brucella abortus*) en conejos y anti IgG cunícola en carnero se llevó a cabo un protocolo de inmunización establecido en nuestro centro. Los sueros hiperinmunes obtenidos se evaluaron por inmunodifusión en agar noble en diluciones seriadas base 2 hasta 1/64, para determinar los títulos de anticuerpo, en los días 30, 45 y en el día del sangrado final. Se consideró reactiva una dilución cuando se observó una línea blanca precipitada entre el orificio del antígeno y el orificio de la dilución del suero en cuestión. La lectura de las placas se realizó de 12 a 24 horas.

Para la obtención de los anticuerpos policlonales anti IgG especie-específicas, se emplearon métodos cromatográficos de purificación por afinidad e inmunoafinidad. Los sueros hiperinmunes de conejo anti IgG especie -específica y contra el antígeno de *Brucellaabortus* se purificaron por cromatografía de afinidad (proteína A-sefarosa) y por cromatografía de inmunoafinidad (IgG específica- sefarosa) con excepción del suero obtenido en conejo contra el antígeno de *Brucella abortus*. El suero hiperinmune de carnero anti IgG cunícola se purificó por cromatografía de afinidad (proteína G-sefarosa) y por cromatografía de inmunoafinidad (IgG cunícola- sefarosa).

A las inmunoglobulinas purificadas, se les determinó su concentración por la fórmula:

Concentración $=DO_{280nm}$ x Factor de Dilución/ Coeficiente de Extinción

donde: Coeficientes de Extinción: IgG de conejo: 1,6; IgG de carnero: 1,36

Se ajustó la concentración de las inmunoglobulinas purificadas a 10 mg/mL para su evaluación.

Las IgG inoculadas (IgG cunícula, ovina, bovina, porcina, murina) así como el antígeno de *Brucella abortus* se imprimieron sobre membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm, en una concentración de 0,5 mg/mL, en forma de líneas de 2 mm de ancho, con una separación entre ellas de 5 mm; con el empleo del equipo de bioimpresión BioDotQuanti 2000 BioJet. Las membranas sensibilizadas se secaron 1 hora a37 ºC y se cortaron en tiras de 3 mm de ancho.

Se tomaron dos tiras y se incubaron de 16 a 20 horas, en paralelo, con 2 mL de las inmunoglobulinas generadas contra ellas, obtenidas de las purificaciones por cromatografía de afinidad e inmunoafinidad respectivamente, con excepción de la IgG de conejo anti *Brucella abortus* que solo se obtuvo por cromatografía de afinidad. Las IgG obtenidas en conejo se diluyeron 1/100 con Timerosal (MERCK, Alemania) al 0,25 %, NaCl (MERCK, Alemania) al 2,92 %, Tris (MERCK, Alemania) al 1,21 % y suero normal de carnero (Laboratorios DAVIH, Mayabeque, Cuba) al 50 % y para las IgG obtenidas en carnero se empleó la misma solución, pero con suero normal de conejo (Laboratorios DAVIH, Mayabeque, Cuba) a igual por ciento. Posteriormente cada tira se lavó 3 veces por 5 minutos con solución balanceada de sales 1 X constituida por NaH_2PO_4 x 2 H_2O (MERCK, Alemania) al 0,33 %, Na_2HPO_4(MERCK, Alemania) al 1,12 %, y NaCl (MERCK, Alemania) al 9 %y Tween 20 (MERCK, Alemania) al 3 %. Las tiras correspondientes a las IgG obtenidas en conejo se incubaron con 2 mL de conjugado anti IgG conejo- peroxidasa, y las correspondientes a las IgG de carnero anti IgG

Cunícula con un conjugado anti IgG carnero- peroxidasa. Ambos conjugados se diluyeron 1:1000enla misma solución empleada para diluir las IgG anti IgG especie-específicas.Después de 3 lavados de 5 min cada uno, se añadió 2 mL de solución sustrato conformada por la solución balanceada de sales anterior, peróxido de hidrógeno(SIGMA-ALDRICH, SL, USA) al 1 % y la Diaminobencidina (SIGMA-ALDRICH, SL, USA) al 0,05 % como sustrato cromogénico. Se incubó en la oscuridad hasta la aparición de un precipitado insoluble en forma de bandas de color carmelita que se depositó sobre las tiras de nitrocelulosa. Se enjuagó dos veces con agua destilada para detener el desarrollo del color.

Las tiras reveladas se dejaron secar y la interpretación de los resultados fue por inspección visual. Se tuvo en consideración la aparición o no de las bandas y la intensidad de las mismas.

RESULTADOS

Los antisueros obtenidos en cada modelo animal, alcanzaron títulos entre 1/32 y 1/64, lo que demuestra que el proceso de inmunización fue efectivo.

Se obtuvo buen rendimiento en los procesos de purificación tanto por afinidad que por inmunoafinidad, con un recobrado de IgG entre los 15 y los 25 mg/mL, en todas las variantes ensayadas

Los resultados mostraron (figuras),en todos los casos, mayor reactividad en las tiras donde fueron ensayadas las IgG obtenidas en el proceso de purificación por cromatografía de inmunoafinidad, donde se reveló una mayor intensidad en las bandas, indicativo de una mayor concentración de anticuerpos específicos contra las IgG inoculadas.

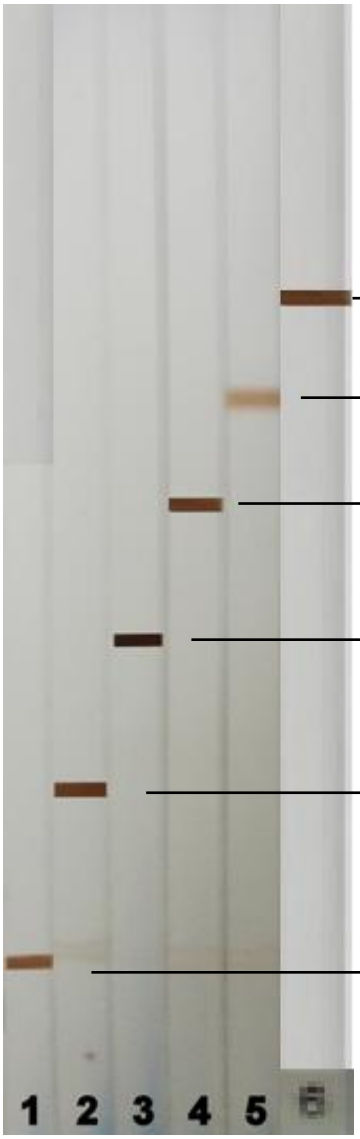
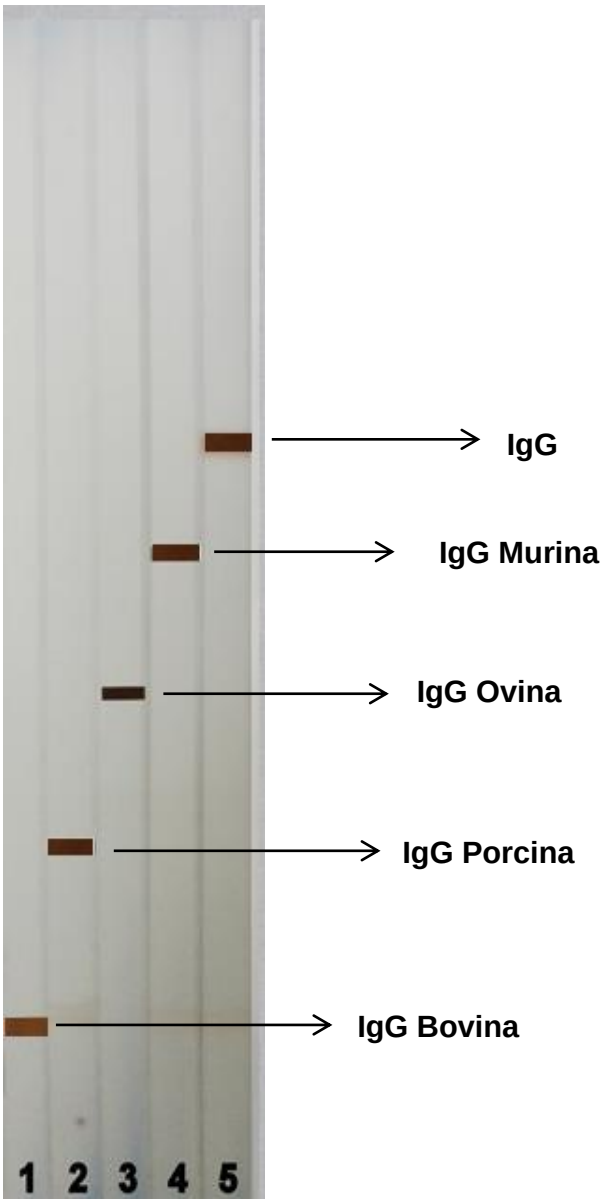


Figura 1. Evaluación de las inmunoglobulinas obtenidas en conejos y carnero, purificadas por cromatografía de afinidad.



Leyend

1. IgG conejo anti IgG Bovina
2. IgG conejo anti IgG Porcina
3. IgG conejo anti IgG Ovina
4. IgG conejo anti IgG Murina
5. IgG carnero anti IgG Cunícula

Figura 2: Evaluación de las inmunoglobulinas obtenidas en conejos y carnero, purificadas por cromatografía de inmunoafinidad.

CONCLUSIONES

Se lograron obtener inmunoglobulinas anti IgG especie-específicas y contra antígenos de *Brucella abortus* con las especificaciones de calidad requeridas. Se establecieron las metodologías para la obtención de las mejores variantes de anticuerpos policlonales, de acuerdo a los intereses de nuestros productores y un mejor monitoreo de las producciones de componentes biológicos intermedios de los diagnosticadores producidos en Laboratorios DAVIH.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cooper HM, Patterson Y. Production of Polyclonal Antisera. Curr Protoc Neurosci. 2009 Jul;Chapter 5:Unit 5.5. doi: 10.1002/0471142301.ns0505s48.
2. Salmona M, Delarue S, Delaugerre C, Simon F, Maylin S. Clinical Evaluation of BioPlex 2200 HIV Ag-Ab, an automated screening method providing discrete detection of HIV-1 p24 antigen, HIV-1 antibody, and HIV-2 antibody. J Clin Microbiol. 2014; 52 (1): 103-7.
3. Allmendinger R, Simaria S, Farid S. Multiobjetive evolutionary optimization in antibody purification process design. Biochem Eng J. 2014; 91: 250-64.
4. Yeang ST, Siti AM, Tasyrig O, Chew YW, Narazah MY, Syed AA. Production and purification of polymerization competent HIV-1 capsid protein p24 (CA) in NiCo21 (DE 3) Escherichia coli. *BMC Biotechnology. 2013; 13 (107): 1-14.*
5. Xenopoulos A. A new integrated, continuos purification process template for monoclonal antibodies. Process modeling and cost of goods studies. *Journal of Biotechnology. 2015; 1-12.*