PRODUCCION DE PLACAS DE INMUNODIFUSION RADIAL PARA LA CUANTIFICACION DE IgG HUMANA

Bruno Lomonte, Eugenia Mata**

Key Word Index: Radial Inmunodiffusion, Human IgG

RESUMEN

Se describe un método para la preparación de placas de inmunodifusión radial para la cuantificación de la IgG humana. El método se basó en las siguientes etapas: (1) aislamiento de IgG de suero normal mediante cromatografía de afinidad; (2) inmunización en cobayo con IgG completa en un esquema breve para evitar la inducción de anticuerpos anti-cadenas livianas; (3) evaluación de la especificidad del antisuero; (4) preparación de las placas y estandarización de las variables; y (5) evaluación del método en estudio frente a un método comercial usado corno referencia.

La correlación obtenida fue de 0,93 (p<0,01) lo que nos permite concluir que el método es adecuado, y podría implementarse a escala *mayor con fines de producción.227 - 231].*

INTRODUCCION

El alto costo de la importanción de reactivos biológicos para diagnóstico, junto con la crisis económica existente en *Costa* Rica, han motivado a varios grupos de investigadores a buscar formas de producir dichos reactivos localmente (1, 6, 8, 9, 11, 13, 16, 17, 18). En los últimos años el Instituto Clodomiro Picado se ha sumado a esta iniciativa tendiente a investigar métodos de producción de algunos reactivos biológicos. En el presente informe se describe un método sim ple y de bajo costo para la preparación de placas de inmunodifusión radial para la determinación de IgG humana en suero.

MATERIAL Y METODOS

Aislamiento de IgG humana:

Se purificó IgG a partir de una mezcla de sueros humanos normales mediante cromatografía de afinidad en proteína A (2, 5, 19). Para esto se diluyó 6 ml de la mezcla de sueros con un volumen igual de amortiguador Tris 0,05 M NaCI 0,15 M (pH 7,5) y se aplicó a una columna (4 X 1,5 cm) de proteína ASepharose 4 B (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) equilibrada con el mismo amortiguador. Se registró la absorbancia del eluente a 280 nm, y una vez que ésta regresó a la línea base se eluyó la IgG con un amortiguador de glicina HCl 0,1 M (pH 3,0) (Fig. 1). El goteo fue recogido directamente en tubos con 0,5 ml de amortiguador Tris 0,5 M (pH 8,8) a razón de 80 gotas/tubo en un colector de fracciones (Isco, Nebraska, E.U.A.). La fracción de IgG se dializó contra agua destilada durante 48 horas a 4º C y se liofilizó.

El análisis de la pureza de esta preparación se realizó mediante electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida al 10 por ciento con duodecil sulfato de sodio bajo condiciones desnaturalizantes, según el método de Laemmli (4). La muestra (20 ug) se redujo por tratamiento con 2-mercaptoetanol (5%) a 100º C durante 5 minutos y se corrió junto a una mezcla de marcadores de peso molecular (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) tratados de igual forma.

Obtención de suero anti-IgG:

Se emulsificó una solución con 2 mg de IgG en coadyuvante de Freund completo (Difco, Michigan, E.U.A.) y se inoculó un cobayo adulto por vía subcutánea. A los 15 y 30 días el animal recibió refuerzos de 2 mg de IgG en alginato de sodio por vía intramuscular. Una semana después del último refuerzo se exsanguinó el animal por punción cardíaca y se separó el suero.

El título precipitante de este suero se determinó probando diluciones dobles del mismo frente a suero humano normal, mediante doble inmunodifusión de Ouchterlony (12) en agarosa al 0,75 por ciento en solución salina amortiguada con fosfatos (SSF) a pH 7,2. El análisis de la especificidad del antisuero se realizó por inmunoelectroforesis (12) contra suero humano normal, en agarosa al 0,75 por ciento en amortiguador de barbital (pH 8,2). Como control en la inmunoelectroforesis se incluyó suero anti-humano total producido en carneros.

Preparación de placas para inmunodifusión radial:

El gel empleado consistió de agarosa al 1,5 por ciento con tres distintas concentraciones finales

* Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

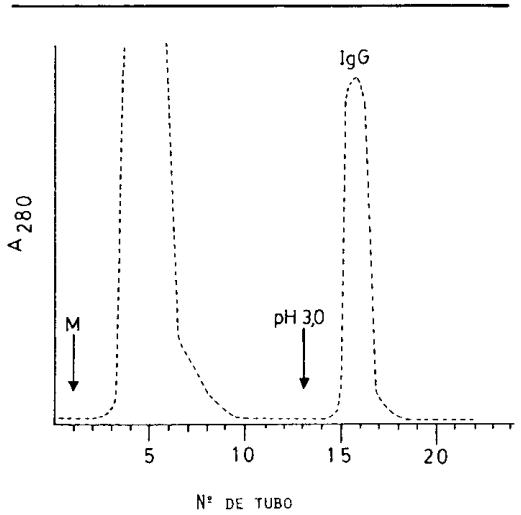

FIG. 1: Aislamiento de IgG humana por cromatografía de afinidad. La muestra (M) se aplicó a una columna de proteína A-Sepharose 4B como se describe en material y métodos, y se registró la absorbancia del eluente a 280 nm (línea punteada). Al cambiar el pH a 3,0 eluye la IgG.

del antisuero: 5, 10 y 12 por ciento. Para su preparación se mezcló volúmenes iguales de agarosa al 3 por ciento en SSF y las cantidades respectivas del suero en SSF pH 7,2, realizando esto con ambos componentes en baño a 55º C. La mezcla se vertió sobre placas de plástico usadas de la misma casa comercial utilizada como referencia en este estudio, sobre una superficie nivelada (Gelman, Michigan, E.U.A.) en cantidad de 2,0 ml por placa. Una vez gelificadas a temperatura ambiente, las placas se colocaron a 4º C durante 20 minutos y luego se procedió a abrir los pozos en el gel (6/placa) con una pipeta Pasteur con bulbo de hule. Se probo tres tamaños de pozos, para 1, 2 y 4 ul de muestra, respectivamente.

Para seleccionar las condiciones más adecuadas de concentración de antisuero y volumen de muestra de probo tres patrones de lgG comerciales (Hyland Diagnostics, Illinosis, E.U.A.) en cada uno de los sistemas.

Estudio de correlación:

Una vez escogidas las condiciones del sistema a usar, se probo su funcionamiento con 34 muestras de suero, las cuales se analizaron concomitantemente empleando placas comerciales para cuantificación de lgG de la casa Hyland Diagnostics, que fungió en este caso como método de referencia. En todas las determinaciones se utilizó el método de difusión completa de Mancini *et al.* (7) incubando en cámara húmeda y a temperatura ambiente durante 48 horas. Las muestras se aplicaron con micropipeta Hamilton mecánica (Hamilton Co., Nevada, E.U.A.) colocando 3 ul en las placas comerciales según la recomendación del fabricante, y 2 ul en las placas preparadas. La lectura de los diámetros de precipitación se hizo mediante un visor con escala de 0,1 mm (Precision Viewer, Hyland Diagnostics, Illinois, E.U.A.) y en todos los casos se realizó por los dos autores en forma "ciega", no debiendo ser la diferencia mayor de 0,2 mm.

Para evaluar la reproducibilidad de la determinación en las placas en estudio se probó una muestra de suero seis veces, efectuándose el mismo procedimiento en placas comerciales.

RESULTADOS

El análisis electroforético de la preparación de IgG mostró dos bandas de proteína de 53.000 y 27.000 daltons, correspondiendo al peso molecular de la cadena pesada gamma y de las cadenas livianas kappa y lambda de la lgG, respectivamente (Fig. 2). El análisis inmunoelectroforético del suero de cobayo anti-lgG total mostró un intenso arco de precipitación correspondiente a la lgG y un arco apenas perceptible en la región de lgA (Fig. 3). El título de dicho suero en la prueba de doble inmunodifusión fue de 1:4. Los resultados de las pruebas para seleccionar las variables del sistema de inmunodifusión radial a emplear, se muestran en la (Fig. 4). Con una concentración de 5 por ciento de antisuero en el gel los anillos son demasiado difusos y no se logra linealidad en la curva de referencia. Con 10 por ciento de antisuero se obtiene linealidad con un volumen de muestra de 2 ul y con 12 por ciento de antisuero hay linealidad para 1 y 2 ul de muestra. Debido a que el aumento de concentración de anticuerpos en el gel causa una disminución en el tamaño de los círculos de precipitación, se escogió la concentración de 10 por ciento de antisuero. Como volumen de muestra se escogió 2 ul pues se puede medir con menos error que 1 Ul y además produce anillos mayores.

Con las condiciones establecidas (2 ul y 10 por ciento de antisuero), se analizó 34 sueros y se calculó su correlación respecto a los valores obtenidos con placas comerciales. El coeficiente de correlación fue 0,93. Estos resultados se resumen en la Figura 5.

La prueba de reproducibilidad dio resultados similares empleando ambos tipos de placas. El coeficiente de variación fue de 3,8 para las pla-

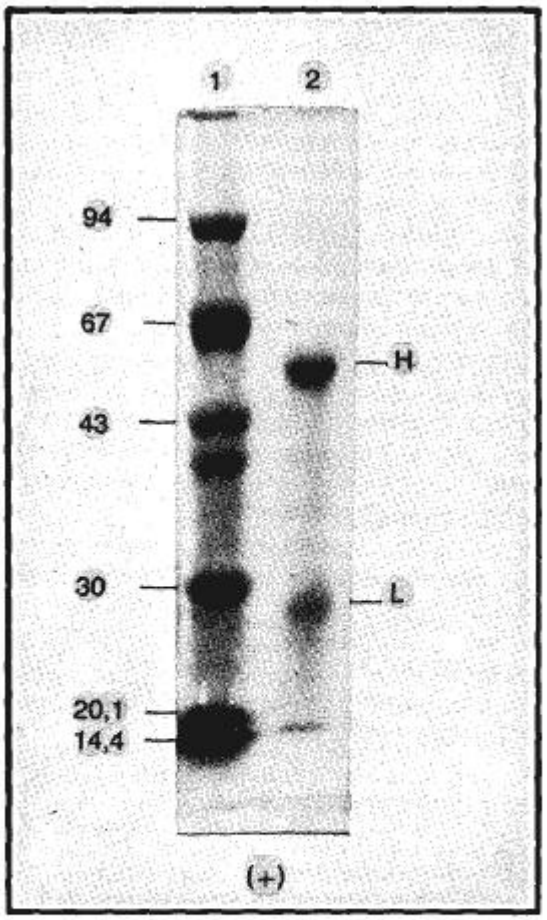

FIG. 2: Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% con duodecil sulfato de sodio. Las muestras fueron reducidas con 2-mercaptoetanol a 100°C.
Línea 1: estándares de peso molecular ($X10^{-3}$). Línea 2: preparación de IgG humana (H = cadena pesada; L = cadenas livianas).

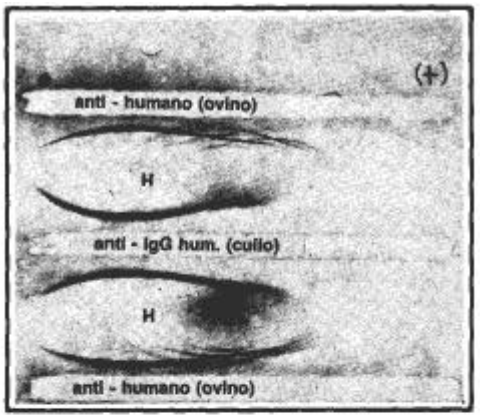

FIG. 3: Análisis inmunoelectroforético del suero de cobayo anti-IgG humana. H = suero humano normal.

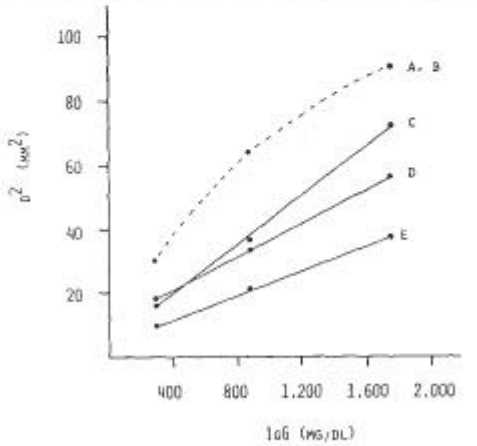

FIG. 4: Curvas de referencia de IgG por inmunodifusión radial a diversas condiciones de concentración de antisuero y volumen de muestra. A = 10% antisuero y 4 ul muestra; B = 5% y 2 ul; C = 10% y 2 ul; D = 12% y 2 ul; E = 12% y 1 ul.

cas comerciales y de 3,5 para las placas en estudio, al analizar una misma muestra seis veces.

DISCUSION

La inmunización con IgG humana en animales hace que se produzcan anticuerpos tanto contra las cadenas pesadas como contra las cadenas livianas. Sin embargo, algunas especies como el cobayo tienden a responder más contra las cadenas pesadas (Dr. Edgardo Moreno, comunicación personal). En el presente caso, a pesar de que el antisuero producido no fue estrictamente monoespecífico contra IgG, su contenido de anticuerpos contra cadenas livianas fue tan bajo (Fig. 3) que al diluirlo en el gel solamente produjo un sistema de precipitación. Una limitación de este método de inmunización es que no se puede prolongar el esquema de refuerzos (para obtener mayores títulos y avidez) para que no aumenten los títulos de anti-kappa y antilambda en el suero. Aún así, el título y la avidez obtenidos con nuestro esquema permiten realizar la determinación de IgG adecuadamente. Respecto a la especificidad del antisuero incorporado en el gel, es importante señalar los estudios de Reimer y Maddison (14), quienes investigaron casi 200 reactivos comerciales y encontraron que solamente uno de cada tres o cuatro antisueros contra IgA o IgM era monoespecífico y que más del 95 por ciento de los antisueros contra IgG precipitaban inapropiadamente con-

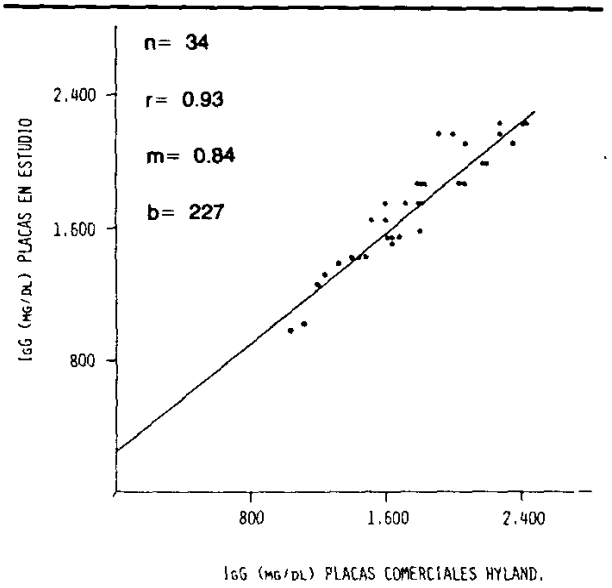

FIG. 5: Análisis de correlación de resultados entre placas Hyland y las placas preparadas.
n = número de muestras analizadas; r = coeficiente de correlación; m = pendiente; b = intersección.

tra otras inmunoglobulinas. Los mismos autores señalan que al reevaluar unos años después la especificidad de las placas de inmunodifusión radial producidas por seis fabricantes comerciales, se encontró que tres de ellos eran monespecíficas (14). Otro aspecto importante sobre el suero anti-IgG producido es que probablemente carece de anticuerpos contra determinantes antigénicos únicos de la IgG_3, debido a que esta subclase no se une a la proteína A usada en el aislamiento (19). Al respecto debemos mencionar que la IgG_3 de las muestras a determinar constituye apenas del 5 al 8 por ciento de la IgG total (14, 15) y además puede ser reconocida antigénicamente gracias a los epitopos compartidos con las otras subclases de cadenas gamma (20). La mayoría de los antisueros comerciales tienden a tener más anticuerpos contra IgG_1 e IgG_2 que contra IgG_3 e IgG_4 (14) debido a su abundancia relativa. Por otro lado, la producción de suero anti-IgG con inmunoglobulina aislada de casos de mieloma múltiple tiene la desventaja de reaccionar contra una subclase particular más que contra las otras (10), y el uso de DEAE Sephadex para el aislamiento de IgG normal disminuye la presencia de IgG_4 en el inmunógeno (10).

La correlación obtenida entre las placas preparadas y las comerciales es estadísticamente significativa ($p<0,01$) y nos permite concluir que el método en estudio es aceptable para la cuantificación de IgG. Aunque es notorio que las placas preparadas mostraron una tendencia a dar valores ligeramente más elevados que las comerciales (Fig. 5) esto no es un obstáculo para su implementación siempre y cuando se establezca valores de referencia con dichas placas. Los resultados también mostraron que la reproducibilidad de la determinación es adecuada y similar a la que se obtiene por el método comercial. En un interesante estudio comparativo de cinco marcas de placas para inmunodifusión radial comerciales, Hosty *et al.* (3) demostraron que hay una amplia variabilidad de resultados entre las distintas casas productoras. Al determinar el contenido de IgG de una muestra del suero de Referencia Internacional 95/69 con placas de la casa Hyland, ICL Scientific, Kallestad, Meloy y Behring, los resultados variaron desde 63 hasta 102 UI/ml para un valor de dicho patrón de 95,3 UI/ml (3). En conclusión, consideramos que el método aquí descrito para la producción de placas de inmunodifusión radial para la cuantificación de IgG sérica es adecuado, simple y económico y puede servir de base para una futura producción de dichas placas en mayor escala, para uso en los laboratorios del país.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los doctores Luis Cerdas y José María Gutiérrez por sus sugerencias en la elaboración del manuscrito; a la Dra. Olga Arroyo por la preparación del material fotográfico; a todo el personal del Instituto Clodomiro Picado por su valiosa colaboración; a la Srta. Rocío Monge por su excelente trabajo secretarial; y a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por su apoyo económico. En especial, agradecemos al Dr. Edgardo Moreno por su valiosa y desinteresada colaboración.

ABSTRACT

A method for the preparation of radial immunodiffusion plates for the quantitation of human IgG is described. It is based upon the following steps: (1) isolation of IgG from normal serum by affinity chromatography; (2) immunization of guinea pigs using a short schedule to avoid response against light chains; (3) assessment of antiserum specificity; (4) preparation of plates and standardization of variables; and, (5) evaluation of the proposed method by a correlation analysis with a commercially-available method utilized as reference.

The correlation obtained was 0.93 (p<0.O1), indicating that the method is adequate, providing a basis for a future large-scale production.

BIBLIOGRAFIA

1. Fernández, E., Mora, J. y Agüero, O. Preparación de suero conejo poliespecífico anti-globulina humana. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Microbiología, Parasitología y Patología Clínica, Costa Rica, 1982; 163.

2. Hjelm, H. y Sjoquist. The use of matrix-bound protein A from *Staphylococcus aureus* for the isolation and determination of immunoglobulins. IN: *Immunoadsorbents in Protein Purification.* Suecia, Erkki Rvoslatti University Park Press, 1976; 3.

3. Hosty, T. A., Hollenbeck, M. y Shane, S. Intercomparison of results obtained with five commercial diffusion plates supplied for quantitation of immunoglobulins. *Clin. Chem.* 1973; 19:524-526.

4. Laemmli, U.K Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.

5. Langone, J.J. Aplications of immobilized protein A in immunochemical techniques. *J. Immunol. Method.* 1982; 55:277-296.

6. León, D., Peña, I., Alvarado, J.J. y Avendaño, J. Producción de agar a partir de *Gracilaria fortissima.* Resúmenes del IV Congreso Nacional de Microbiología, Parasitología y Patología Clínica, Costa Rica, 1982; 90.

7. Mancini, G., Carbonara, A.O. y Heremans, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion *Immunochemistry* 1965; 2:235-254.

8. Mora, J. Preparación de los reactivos para la determinación cuantitativa de gonadotrofina coriónica en orina. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Microbiología, Parasitología, y Patología Clínica, Costa Rica, 1982; 158.

9. Mora, J.C., Mora, H., Cordero, O. y Vargas, R. Preparación de los reactivos para la determinación de amonio plasmático usando una Tesina de intercambio iónico. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1983; 4 (supl. 1): 9-16.

10. Morell, A., Skvaril, F. y Barandun, S. Qualitative and quantitative investigations on the reactions of normal and myeloma IgG with antisera to lgG. *Clin. exp. Immunol.* 1973; 13:293-302.

11. Muñoz, G. Determinación del factor reumático por el método de Waaler-Rose modificado, con reactivos preparados en el laboratorio clínico del Hospital San Juan de Dios. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Microbiología, Parasitología y Patología Clínica, Costa Rica, 1982; 157.

12. Ouchterlony, O. y Nilsson, L.A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. IN: Weir, D.M. (Edit.) *Handbook of* immunological methods, Vol. 1: *Immunochemistry.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1978; 1 9:1.

13. Porras, A.A., Castro, F. y Jiménez, J. Comparación de dos agentes reductores a diferentes temperaturas para la conservación de catalina de cerebro humano. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Microbiología, Parasitología y Patología Clínica, Costa Rica, 1982; 160.

14. Reimer, C.B. y Maddison, S.E. Standardization of human immunoglobulin quantitation: a review of current status and problems. *Clin. Chem.* 1976; 22:577-582.

15. Roitt, I.M. *Essential Immunology.* Blackwell Scientific Publications, Oxfort, 1980; 45.

16. San Román, M. Preparación de eritrocitros equinos por el método de Hoff y Bauer para el diagnóstico de monocucleosis infecciosa. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Microbiología, Parasitología y Patología Clínica, Costa Rica, 1982; 158.

17. Trejos, A. Agüero, O., Fernández, E., Vargas, R. y Esquivel, J.M. Preparación de los sueros para la clasificación de los grupos sanguíneos ABO a partir de mezclas de sueros. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Microbiología, Parasitología y Patología Clínica, Costa Rica, 1982; 162.

18. Trejos, A., San Román, M. y Piedra, M. Preparación de antígenos de *Leishmania* braziliensis y Toxoplasma gondii para intradermoreacciones. Resúmenes del IV Congreso Nacional de Microbiología, Parasitología, y Patología Clínica, Costa Rica, 1982; 163.

19. Van Loghem, E., Frangione, B., Recht, B. y Franklin, E. C. Staphylococcal protein A and human lgG subclasses and allotypes. *Scand. J. Immunol.* 1982; 15:275-278.

20. Volk, W.A. Structure of antigens and antibodies. IN: *Essentials of Medical Microbiology,* J.B. Lippincot Company, Philadelphia, 1982; 180.