

## Ensayo diagnóstico para IgE humana por ultramicroELISA empleando anticuerpos monoclonales.

M. LLANO,<sup>1</sup> E. CARPIO,<sup>1</sup> R. ROSQUETE,<sup>1</sup> R. SOLÍS,<sup>2</sup> M. GONZÁLEZ<sup>1</sup> Y J. GAVILONDO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> División de Hibridomas y Modelos Animales, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana-6

<sup>2</sup> Centro de Inmunoensayos, Apartado 6940, La Habana-6, Cuba

Recibido en diciembre de 1988

Aprobado en marzo de 1989

### RESUMEN

La cuantificación de las concentraciones séricas de la inmunoglobulina E (IgE), tiene gran importancia diagnóstica en las enfermedades alérgicas. En Cuba existe, desde 1987, un programa nacional de diagnóstico de esta entidad, que emplea como elemento tecnológico fundamental un sistema ultramicroELISA (UME), tipo *sandwich* con anticuerpos policlonales, anti IgE. La introducción de anticuerpos monoclonales (AcM) en estos procedimientos puede proporcionar ventajas, especialmente en lo que se refiere a especificidad, y producción de los reactivos. Nosotros hemos obtenido hibridomas secretores de AcM contra IgE, mediante la fusión del mieloma P3/x63.Ag8.653, con linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con una preparación purificada de IgE humana monoclonal. Los 10 AcM obtenidos, parecen reconocer determinantes antigénicos alotípicos de la cadena  $\epsilon$  humana. El CB-IgE.1 (IgG2a) se estudió a mayor profundidad como anticuerpo de captura y revelado, en UME. Se demostró que este AcM puede sustituir efectivamente al anticuerpo policlonal de recubrimiento y puede ser empleado también como segundo anticuerpo en esta técnica. Se evaluó el funcionamiento de un UME con el CB-IgE.1 en la fase sólida y un anticuerpo policlonal de revelado, en la cuantificación de IgE a partir de muestras de pacientes, obteniéndose 100 % de coincidencia diagnóstica con el UME policlonal, y repetibilidad y reproducibilidad adecuadas.

### SUMMARY

The quantitation of sera concentrations of IgE has a great diagnostic importance in allergic disease. Since 1987, a national program has been developed in Cuba for the early diagnosis of these entities; the program is technologically based on an ultramicroELISA system, that employs polyclonal anti IgE antibodies. The introduction of monoclonal antibodies (MAbs) in these procedures can be advantageous, specially regarding specificity, and production of the reagents. We have obtained MAbs against IgE, through the fusion of splenic lymphocytes of mice immunized with purified human monoclonal IgE, and the P3/x63.Ag8.653 myeloma. Ten MAbs seem to recognize allotypic antigenic determinants present in the human epsilon chain. The MAb CB-IgE.1 (IgG2a) was studied as capture and second antibody, in ultramicroELISA. It was shown that this MAb can effectively substitute the polyclonal antibody in the coating, and can also be employed as revealing reagent. An ultramicroELISA was produced with a combination of the MAb as coating antibody, and a conjugated polyclonal antibody. This system showed a 100 % diagnostic coincidence in samples from patients, when compared to the routinely use polyclonal ultramicroELISA, together with adequate reproducibility and repeatability.

## INTRODUCCION

La IgE es una glicoproteína de peso molecular 196 000, de gran importancia diagnóstica. Se encuentra en concentraciones séricas muy altas en enfermedades atópicas, parasitarias, en inmunodeficiencias por déficit de IgA, en síndromes como el de Di-George, el de Nezeloff, el de hiper-IgE, y en el rechazo agudo a injertos (Soo Hong *et al.*, 1986); sin embargo en sujetos normales sus niveles son muy bajos y dependen de la edad. La capacidad "predictiva" del nivel total de IgE total en sangre del cordón umbilical, para padecer enfermedades atópicas, ha sido estudiada por varios investigadores y se ha sugerido que el riesgo es de cinco a diez veces mayor cuando los niveles son altos (Soo Hong *et al.*, 1986).

La alergia atópica afecta aproximadamente al 30 % de las personas menores de 30 años en países industrializados, y esta alta incidencia también parece caracterizar a los no industrializados; aunque su extensión está en estos momentos documentada (Merret y Merrett, 1987). En Cuba, desde 1986 hasta 1988, se determinó que el 4,66 % de una muestra de 55 501 recién nacidos exhibía cifras patológicas de IgE séricas (> 20 UI/ml) en el 4,66 %, mientras el 11,02 % tuvo cifras entre 5 y 19,9 UI/ml los cuales se consideran como posibles enfermos (Urquiza *et al.*, 1988). Generalmente estas enfermedades no son fatales, pero provocan incapacidad, obligando al individuo a llevar una vida con restricciones.

La concentración sérica de IgE se cuantifica por métodos inmunológicos que requieren anticuerpos altamente específicos. El advenimiento de la tecnología para la generación de anticuerpos monoclonales (AcMs) (Kohler 1981), ha permitido la obtención de reactivos útiles para estos ensayos, evitando además las dificultades asociadas a la producción de anticuerpos policlonales específicos. En este artículo reportamos la obtención de AcMs murinos que reconocen específicamente la IgE, y su aplicación en la construcción de un ultramicroELISA (UME) diagnóstico.

## MATERIALES Y METODOS

### Antígenos y estándares

En la inmunización y en el ensayo primario de los hibridomas se empleó IgE humana monoclonal purificada. Esta preparación fue donada por el Dr. Neil Lynch (Venezuela). En otros experimentos usamos el estándar de IgE producido por el Centro de Inmunoensayos (CIE, La Habana), validado contra el estándar WHO (No. 68/341) con 2,42 ng/unidad. Los estudios de reactividad cruzada se realizaron con IgG, IgM e IgA humanas policlonales suministradas por el CIE.

### Animales e inmunización

Se inyectaron ratones BALB/c machos (4-6 semanas) suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio, a intervalos semanales y por vía intraperitoneal (i.p.), con 4 dosis de 5 µg de IgE adsorbida en 350 µg de Al(OH)<sub>3</sub>. Para la fusión se seleccionó un animal con título 1:10 000, que se inyectó i.p. con igual dosis de antígeno en solución salina tamponada con fosfatos pH 7,2 (SSTF), y se sacrificó tres días después para la obtención de los linfocitos esplénicos.

### Fusión, clonaje y cultivo

El protocolo de fusión con PEG, la formulación de los medios, y el cuidado básico de las células recién fundidas han sido detallados antes (Gavilondo *et al.*, 1988). Los hibridomas seleccionados (ver más adelante) se clonaron dos veces por dilución limitante, y los clones relevantes se expandieron para su criopreservación e inoculación a ratones.

## UltramicroELISA

El Sistema Ultramicroanalítico (SUMA, CIE), se ha descrito en otras publicaciones (Horn *et al.*, 1981; Otero *et al.*, 1984; Van Brunt, 1987). El sistema se basa en reacciones antígeno-anticuerpo que son puestas en evidencia mediante ensayos tipo ultramicroELISA (UME), que emplean sustratos fluorogénicos. Entre los componentes del SUMA están: placas de 96 posiciones (10  $\mu$ l/pozo), una pipeta multicanal, controlada por un microprocesador, que dispensa, lava y transfiere a las placas de lectura, y un lector computarizado que procesa las lecturas de fluorescencia, que se expresan relativas a los valores de dos controles extremos.

## Ensayo de los hibridomas

El ensayo se realizó por UME tipo *sandwich*. Las placas se recubrieron con 5  $\mu$ g de IgG de conejo anti cadena  $\epsilon$  de IgE humana (PcE, CIE)/ml, a 37°C, durante 4 horas; subsecuentemente se añadieron 50 UI/ml de IgE estándar diluida en suero de conejo al 5 % en SSTF, y se incubó una hora a 37°C. Después de lavar se dispensaron los sobrenadantes de los hibridomas, y se incubó como en el paso anterior; se lavó y se añadió IgG de carnero anti-IgG de ratón, conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) a una dilución de 1:1 000, incubándose como antes. Después de lavar, la reacción se reveló con 4-metilumbeliferil-fosfato, en tampón de dietanolamina, durante 30 minutos a 22°C. Las muestras se transfirieron a las placas de lectura y se evaluaron a 480 nm.

Los sobrenadantes fueron considerados positivos cuando los valores de fluorescencia fueron, al menos, tres veces superiores al de los controles negativos que contenían sobrenadante de hibridomas no relacionados.

También empleamos un microELISA indirecto recubriendo placas de poliestireno (Dynatech), con 1  $\mu$ g/ml de IgE monoclonal, y empleando como anticuerpo de revelado una IgG de carnero anti IgG de ratón, conjugada con peroxidasa, a una dilución de 1:1 000 (Sigma). La reacción se reveló con ortofenilendiamina y peróxido de hidrógeno al 30 %. La lectura se realizó en un Titertek Multiskan MSC-340 a 492 nm. Las incubaciones y lavados se realizaron como se explicó anteriormente. El criterio de positividad fue semejante al descrito para el UME.

## UME para reactividad cruzada

Las placas se recubrieron con 1  $\mu$ g/ml de IgE, IgG, IgM, IgA, o albúmina sérica humana (ASH) y se añadieron los sobrenadantes positivos. La presencia o la ausencia de los anticuerpos murinos se reveló con el conjugado empleado en el ensayo inicial; los pasos de lavado y las condiciones de incubación fueron ya descritos. Este experimento se repitió empleando el AcM purificado.

## Isotipaje de inmunoglobulinas

La clase y subclase de inmunoglobulina se determinó por inmunodifusión radial doble (Ouchterlony y Nielssohn 1978), usando sobrenadante de cultivo concentrado diez veces, y antisueros clasificadores (ICN *immunobiologicals*).

## Producción y purificación de los AcMs

Los hibridomas seleccionados se inyectaron i.p. en ratones BALB/c preinoculados con aceite mineral, y el fluido ascítico, después de clarificado y deslipidizado, se purificó por cromatografía con proteína A Sepharosa (Pharmacia), como recomienda el fabricante (Ostlund, 1986). La fracción activa se identificó por UME indirecto (ver UME para reactividad cruzada) recubriendo los pozos con IgE. Las determinaciones de proteína se realizaron por el método de Lowry *et al.* (1951); la pureza se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida, empleando dodecilsulfato de sodio y en condiciones de reducción (Laemli, 1970).

## UME para la cuantificación de IgE en suero

El UME usado actualmente en el Programa Nacional de Prevención de Enfermedades Alérgicas se basa en un mismo PcE (ver "Ensayo de los hibridomas"), para la captura y el revelado (en el segundo caso, conjugado con fosfatasa alcalina [PcE-FA]). El AcM purificado se ensayó para determinar su utilidad como anticuerpo de captura en este sistema: varias concentraciones del AcM se adsorbieron a placas de UME a 37°C durante 4 horas; después de lavar se añadieron diluciones seriadas del estándar de IgE por 18 horas a 4°C, luego de lo cual se lavó e incubó 4 horas a 22°C con el PcE conjugado a una dilución de 1:750. Los siguientes pasos se realizaron como se ha descrito.

La determinación de la sensibilidad y repetibilidad del sistema AcM/PcE-FA, y el ensayo de sueros de recién nacidos (dilución 1:2), se realizaron según estas mismas condiciones experimentales, pero empleando 15  $\mu\text{g/ml}$  del AcM purificado en la fase sólida. Como referencia se tuvo el UME del Programa Nacional, cuyas condiciones experimentales se diferencian solo en el empleo de 5  $\mu\text{g/ml}$  del PcE en la fase sólida.

### Procesamiento estadístico

La sensibilidad del UME descrito en este artículo se consideró como la concentración de antígeno más baja cuya media de fluorescencia relativa fue diferente de la de una muestra con cero concentración de antígeno, incrementada en tres veces el valor de su desviación estándar. El nivel de confiabilidad es del 99,9 % ( $p < 0,01$ ).

Para comparar los dos UMEs durante la evaluación de los sueros de recién nacidos se realizó un análisis de correlación lineal simple, teniendo en cuenta los valores de IgE sérica de cada muestra.

## RESULTADOS

La eficiencia de hibridación fue superior al 95 % (912 pozos con hibridomas, de 960 pozos sembrados con células fundidas). Después de dos ensayos consecutivos por UME y microELISA frente a IgE, IgG, IgM, IgA, y ASH, se seleccionaron diez hibridomas por su reconocimiento específico de IgE. Todos los cultivos se clonaron y reclonaron, encontrándose que secretaban anticuerpos de clase IgG. El clon 17/62/1, productor del AcM CB-IgE.1 (IgG2a), se seleccionó para continuar los estudios y se inyectó a ratones para la producción de ascitis y purificación de anticuerpos.

El CB-IgE.1 purificado (20  $\mu\text{g/ml}$ ) no mostró reactividad cruzada en el UME indirecto frente a los antígenos antes mencionados (figura 1). El CB-IgE.1 se probó como anticuerpo de captura en el UME *sandwich* que emplea como anticuerpo de revelado el PcE-FA; se encontró que a 15  $\mu\text{g/ml}$  el AcM reproducía el comportamiento exhibido por el sistema de referencia empleado en el Programa Nacional de Prevención de Enfermedades Alérgicas (figura 2).

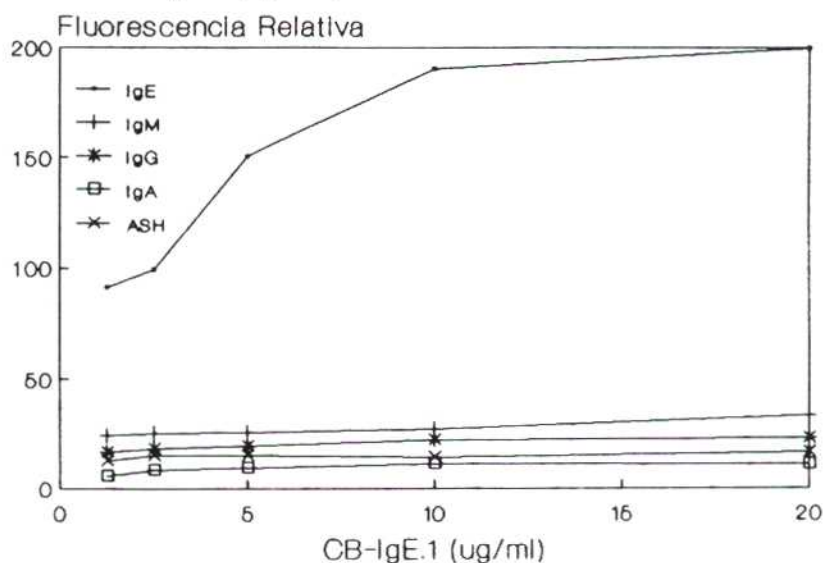


FIG.1. Reactividad del AcM CB-IgE.1 con IgE y otros antígenos (IgG, IgM, IgA, albúmina sérica humana). Los pozos se sensibilizaron con 1  $\mu\text{g}$  de antígeno/ml. Se añadieron concentraciones incrementadas de CB-IgE.1 y la reacción se reveló con un anticuerpo policlonal anti-ratón, conjugado con fosfatasa alcalina.

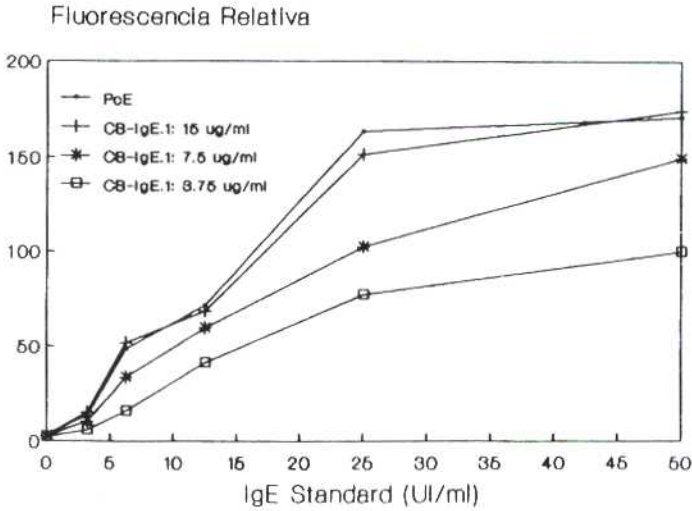


FIG. 2. Determinación de la concentración de recubrimiento óptima para el CB-IgE.1 en ultramicroELISA, con respecto al anticuerpo policlonal anti cadena  $\epsilon$  humana, de referencia.

La sensibilidad del ensayo se determinó en experimentos realizados por triplicado con varias concentraciones de IgE disuelta en SSTF-5 % de suero de carnero. Como blanco se utilizó este tampón de dilución. El valor de sensibilidad calculado fue 2,34 UI/ml ( $p < 0,01$ ) (figura 3).

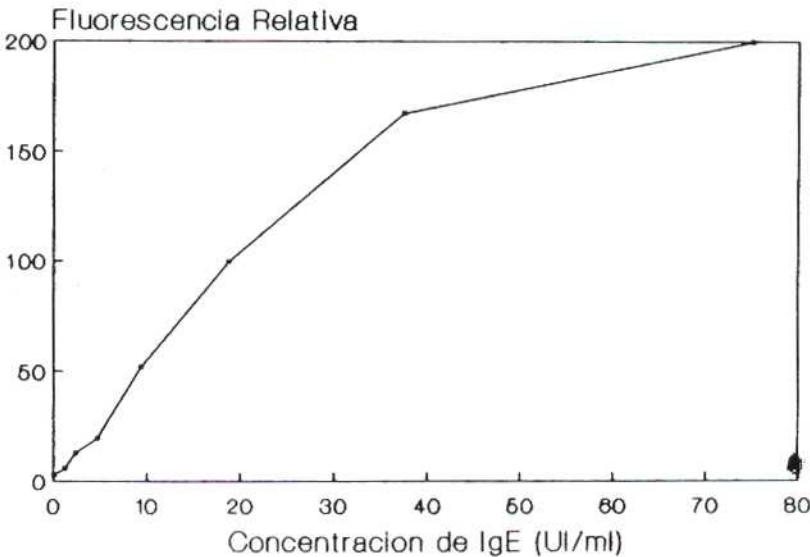


FIG. 3. Rango de sensibilidad del sistema ultramicroELISA AcM/PcE-FA para IgE.

La repetibilidad del ensayo fue buena teniendo en cuenta los coeficientes de variación (CV) intraensayos (<8,1 %; n = 8) y los interensayos (<15,1 %; n = 7) para varias concentraciones de IgE (tabla 1).

Tabla 1  
PRECISION DEL SISTEMA AcM/PcE-FA PARA IgE

Concentración IgE (UI/ml)	Coefficiente de variación intraensayos (%) (n = 8)	Coefficiente de variación interensayos (%) (n = 7)
50	6,5	15,0
25	8,0	11,3
12,5	7,3	13,3
6,25	5,4	10,1
3,2	5,1	12,1
1,6	6,7	12,5

NOTA: n = Número de réplicas, o número de ensayos independientes.

La comparación del UME AcM/PcE-FA y el sistema de referencia, en el ensayo por duplicado del suero de sangre del cordón umbilical de 30 recién nacidos, demostró que hay 100 % de coincidencia diagnóstica entre ellos (tabla 2). El análisis de correlación lineal de los datos anteriores muestra un coeficiente de Pearson de 0,98.

Tabla 2  
CLASIFICACION DE MUESTRAS DE SANGRE DE CORDON UMBILICAL TOMANDO COMO BASE LA CONCENTRACION DE IgE, DETERMINADA POR LOS DOS SISTEMAS UME

	UME AcP/AcP	UME AcM/AcP
Normales < 5 UI/ml	2,2; 2,3; 2,5; 1,3 3,4; 4,7; 4,6; 3,8 2,6; 1,7; 3,3; 2,4 1,9; 1,8	1,9; 2,1; 2,1; 1,7 3,1; 4,3; 4,5; 3,5 2,8; 1,5; 3,5; 2,1 2,2; 2,0
Elevados > 20 UI/ml	23,9; 22,5; 21,1; 23,2 22,4; 25,7; 24,8; 21,3 22,1; 23,9; 25,1; 24,2 20,9; 20,8; 21,2; 22,4	23,5; 22,3; 21,4; 23,0 22,1; 25,6; 25,1; 21,0 21,8; 23,7; 24,8; 24,6 21,2; 21,1; 21,4; 22,6

NOTA: AcM/AcP = AcM CB-IgE.1 en la fase sólida y el anticuerpo policlonal anti cadena  $\epsilon$  conjugado con fosfato alcalina (PcE-FA) como segundo anticuerpo;  
AcP/AcP = Anticuerpo policlonal anti cadena  $\epsilon$  como primer anticuerpo y el PcE-FA como revelador.  
El orden de los valores en una y otra columna indica que se trata de la misma muestra.

## DISCUSION

Por la importancia diagnóstica y pronóstica de la IgE y a causa de sus bajas concentraciones séricas, se han desarrollado varios métodos de cuantificación con base inmunológica (Guerdon y Avrameas, 1986; Soo Hong *et al.*, 1986; Alevy y Blynn, 1986):

1. La inmunodifusión radial basada en anticuerpos radiomarcados, fluorescentes o marcados con enzimas. Este procedimiento tiene baja sensibilidad y poca precisión para determinar pequeñas concentraciones de IgE (< 50 UI/ml).

2. El radioinmunoensayo, considerado como el primer método de alta sensibilidad, aunque desventajoso por los riesgos que implica el manejo de radioactividad y por su mayor costo.

3. Los ensayos inmunoenzimáticos sobre diversas fases sólidas: tubos y placas de poliestireno, o polipropileno, discos de celulosa, tiras de nitrocelulosa, y perlas magnéticas de agarosa poliácridamida.

4. La aglutinación de partículas de látex cubiertas con anticuerpos anti IgE.

Todos estos métodos de cuantificación requieren de anticuerpos altamente específicos para la IgE.

En nuestros experimentos, el esfuerzo principal se dirigió hacia el desarrollo de AcMs anti cadena pesada de IgE que pudieran sustituir eficientemente el anticuerpo policlonal de captura empleado en el UME del Programa Nacional de Prevención de Enfermedades Alérgicas.

El desarrollo eficiente de tales AcMs requiere una detección temprana de los hibridomas secretores de anticuerpos que no reaccionan, cruzados con otras clases de inmunoglobulinas, para evitar gastos de tiempo y reactivos con hibridomas poco específicos. Esto no es siempre posible porque los pequeños volúmenes de sobrenadante disponibles en las primeras etapas del cultivo (200  $\mu$ l para placas de 96 pozos), no son suficientes para realizar ensayos simultáneos, y la dilución de los sobrenadantes no es siempre posible, excepto cuando el sistema de ensayo es muy sensible (Khazaeli *et al.*, 1981).

Nosotros aprovechamos las ventajas del SUMA en cuanto a los pequeños volúmenes de reacción (10  $\mu$ l), y su alta automatización para el ensayo temprano de los hibridomas contra varios antígenos (IgE, IgM, IgG, IgA, y ASH), sin necesidad de diluir los sobrenadantes.

En el experimento de fusión obtuvimos alrededor del 1 % de clones específicos de clase IgG, de los cuales seleccionamos el clon 17/63/1, secretor del AcM CB-IgE.1. Por su patrón de reconocimiento (IgE monoclonal y policlonal y no otras inmunoglobulinas) el CB-IgE.1 parece identificar determinantes antigénicos alotípicos presentes en los dominios constantes de la cadena  $\epsilon$ .

Para definir la concentración óptima de recubrimiento, elegimos como referencia el UME del Programa Nacional de Prevención de Enfermedades Alérgicas y realizamos los experimentos en las mismas condiciones en que se realiza este ensayo. La concentración óptima resultó ser 15  $\mu$ g/ml.

Los experimentos de sensibilidad (hasta 2,34 UI/ml) indican que el nuevo sistema que combina el AcM con el policlonal conjugado es adecuado para el diagnóstico, según los rangos de valores definidos para los recién nacidos en el país (normal,  $\leq$  4,9 UI/ml; dudoso, entre 5 y 19,9 UI/ml; patológico,  $\geq$  20 UI/ml) y, por lo tanto, también para adultos.

La repetibilidad y reproducibilidad del ensayo son adecuadas, con bajos CVs para los valores más críticos desde el punto de vista diagnóstico (5, y 20 UI/ml). Por último, existe una alta correlación diagnóstica entre este nuevo sistema UME y el empleado en el Programa Nacional, sobre la base del estudio de la muestra de 30 recién nacidos. Todos estos datos, junto a sus características de homogeneidad, estabilidad y economía de producción, indican que el AcM CB-IgE.1 es un sustituto adecuado de los anticuerpos policlonales actualmente en uso.

## REFERENCIAS

- ALEVY, Y.C. y C.M. BLINN (1986). *An avidin - biotin ELISA assay for the measurement of the novo human IgE synthesis in culture supernatants*. J. Immunol. Method. **87**: 283-288.
- GAVILONDO, J.; A.M. VAZQUEZ; S. FONG; E. RENGIFO; A. FERNANDEZ; C.A. GARCIA; A. VELANDIA; A. PAVLENKO; S. HERNANDEZ; N. RUISANCHEZ; V. SUDIN y M.E. FAXAS (1987). *Anticuerpos monoclonales contra el antígeno carcinoembrionario en ensayos inmunohistoquímicos e inmunocitocinéticos*. Interferón y Biotecnología **4**: 143-156.
- GUERDON, J.L. y S. AVRAMEAS (1986). *Determination of IgE as antigen*. Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer. Third Edition. vol. X: 118-127.
- HORN, A.; J.L. FERNANDEZ YERO y M. SHULSE (1981). *UltramicroELISA for alpha-feto protein with the chamber analytical technique*. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **19**: 702-705.
- KHAZALI, M.B.; B.G. ENGLAND; R.C. DIETERLE; G.D. WORDBLOM; G.A. KABZA y W.H. BEIEWALTER (1981). *Development and characterization of a monoclonal antibody which distinguishes the  $\beta$ -subunit of human chorionic gonadotropin ( $\beta$ hCG) in the presence of the hCG*. Endocrinology **109**: 1290-1295.
- KOHLER, G (1981). *The technique of hybridoma production*. Immunological Methods. Vol. II: 285-298.
- LAEMMLI, N.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4*. Nature **227**: 680-685.
- LOWRY, O.H.; N.J. RESEMBROUGH; A.L. FARRY; R.K. RANDALL (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. **193**: 265-269.
- MERRETT, J. y T.G. MERRETT (1987). *Phadiato - a novel IgE antibody screening test*. Clinical Allergy **17**: 409-416.
- OTERO, A.J.; J. SARRACENT; J.L. FERNANDEZ YERO e I. RODRIGUEZ (1984). *A ten microliter indirect ultramicroELISA for detection of monoclonal antibodies against human alpha-feto protein*. Hybridoma **3**: 391-394.
- OUCHTERLONY, O. y L.A. NIELSSON (1978) "Immunodiffusion and immunoelectrophoresis", en: *Handbook of Experimental Immunology*, Ed. D.M. Weir. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburg, Melbourne, p.196.
- OUSTLUND, C. (1986). *Large-scale purification of monoclonal antibodies*. Trends in Biotech. Nov.: 288-293.
- SOO HONG, C.; B.M. STADLER; M. WALTI y A.L. DEWECK. (1986). *Dot immunobinding assay with monoclonal anti-IgE antibodies for the detection and quantitation of human IgE*. J. Immunol. Method. **95**: 195-202.
- URQUIZA, D.; J.L. FERNANDEZ YERO; R.L. SOLIS; D. FABRE y M. LARRAONDO (1988). *Programa Nacional de Prevención de Alergia: antecedentes, situación actual y perspectivas*. Libro de resúmenes de la I Jornada Nacional de Laboratorios Diagnósticos SUMA.
- VAN BRUNT, J. (1987). *Cuba focuses on monoclonals for health care*. Bio/Technology **5**: 1262.