

CU9600403

OIEN-R

OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-GLOBULINA DE CONEJO
EN CARNERO PARA SU UTILIZACION EN LOS
RADIOIMMUNOALISIS DE LH, FSH Y PROLACTINA

PRODUCTION OF ANTI-IgG ANTIBODIES IN SHEEP FOR
USING IN THE RADIOIMMUNOASSAYS OF LH, FSH AND
PROLACTIN

Caso, R.; Mosquera, M.
Perez, E.
Arranz, C.

*
**

- * Centro de Isotopos. La Habana, Cuba.
- ** Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal. La Habana, Cuba.
- *** Instituto Nacional de Endocrinologia. La Habana, Cuba

La Habana, Cuba

1996

**POOR QUALITY
ORIGINAL**

VOL 27 # 21

**OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-GLOBULINAS DE CONEJO EN
CARNERO PARA SU UTILIZACION EN LOS RADIOINMUNOANALISIS DE
LH, FSH Y PROLACTINA.**

**PRODUCTION OF ANTI-IgG ANTIBODIES IN SHEEP FOR USING IN THE
RADIOIMMUNOASSAYS OF LH, FSH AND PROLACTIN.**

R. Caso¹, E. Pérez², M. Mosquera¹, C. Arranz³

1-Centro de Isótopos. 2-Centro de Investigación para el Mejoramiento Animal. 3-Instituto Nacional de Endocrinología.

La Habana, Cuba.

Subject Categories: B 13.30

Key words: radioimmunoassay; antigen-antibody reactions: Q1; diagnostic techniques; sheep;
Lth: M1; LH: M1; FSH: M1.

OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-GLOBULINAS DE CONEJO EN CARNERO PARA SU UTILIZACION EN LOS RADIOINMUNOANALISIS DE LH, FSH Y PROLACTINA.

RESUMEN

Se realizó la obtención del segundo anticuerpo (anti-globulinas de conejo en carnero), para ser utilizado como reactivo precipitante en los Kits de Radioinmunoanálisis (RIA) de las hormonas proteicas humanas: Luteinizante (hLH), del Folículo Estimulante (hFSH) y Prolactina (hPrL). Se efectuó la validación del antisuero obtenido, empleando kits de producción nacional validados contra Kits-OMS comerciales.

Los resultados obtenidos permitieron asegurar la utilización de este antisuero en la producción de Kits-RIA de hLH, hFSH y hPrL que se realiza en el Centro de Isótopos.

ABSTRACT

In this work is described the production of second antibodies in sheep against rabbit IgG for being used in radioimmunoassays for determination LH, FSH and Prolactin. There was made the comparison between the results obtained using the Kits-RIA produced by us and the commercial WHO Kits-RIA, using these antibodies.

The results allowed us to use these antibodies for production Kits-RIA of LH, FSH and Prolactin.

INTRODUCCION

Entre los métodos inmunológicos que utiliza la Endocrinología para la cuantificación de la concentración de sustancias en los fluidos corporales, se encuentra el Radioinmunoanálisis. Esta técnica se basa en la competencia que se establece entre un antígeno marcado con un isótopo radiactivo y un antígeno no marcado por los sitios de unión del anticuerpo específico que se encuentra en una concentración limitada en el sistema. En el caso del RIA (fase líquida) para la separación eficiente de las fracciones enlazada y libre se debe utilizar la precipitación del inmunocomplejo mediante el uso de anti-IgG de conejo (segundo anticuerpo) [1].

Los servicios inmunológicos en los países subdesarrollados se ven a menudo limitados, por el alto costo de los kits-RIA importados. Por estas razones nuestro país se dio a la tarea de producir estos juegos de reactivos utilizando materia prima nacional. Uno de los componentes importantes dentro del kit lo constituye el reactivo precipitante o segundo anticuerpo, el cual es ofertado por diferentes firmas comerciales a un precio elevado [2,3].

El objetivo del presente trabajo consistió en la obtención de antiglobulinas de conejo en camero y su validación para ser utilizado en la producción de los kits RIA de las hormonas hipofisarias: hLH, hFSH, y hPrL. Estos últimos son de gran importancia para la determinación de anomalías en la reproducción [1].

MATERIALES Y METODOS

Todos los reactivos y accesorios utilizados son de calidad p.a. de firmas internacionales reconocidas.

La radiactividad se determinó con un contador LKB tipo Minigamma-1275.

Para la validación de los anticuerpos obtenidos se utilizaron Kits producidos por el Centro de Isótopos y el Instituto Nacional de Endocrinología, los cuales a su vez están validados contra Kits comerciales de la OMS [7].

1. Obtención del anti-IgG de conejo en camero.

Con este fin se utilizó un camero de la raza Peribuey de edad 6 meses, con peso corporal aproximado de 15 Kg que fue alimentado "at libitum".

Como inmunógeno se utilizaron inmunoglobulinas de conejo obtenidas por el Instituto Nacional de Endocrinología (INEN). La pureza del inmunógeno se determinó por inmunoelectroforesis y la concentración por el método Lowry [2].

La inmunización se comenzó con 1.5mg de IgG de conejo, complementado con solución salina y adyuvante completo de Freund, utilizando la vía intradérmica en la zona dorsal del lomo del animal en múltiples puntos. Posterior a 21 días se restimuló con 0.75mg de IgG de conejo con solución salina y adyuvante incompleto de Freund, utilizando la vía subcutánea. Esta dosis fue utilizada para posteriores inmunizaciones cada 15 días. Las extracciones de sangre se realizaron después de los 7 días de las reinmunizaciones y fueron procesadas para la determinación del título del antisuero [4].

Una vez obtenido un título constante se le extrajo la sangre al animal, se centrifugó para obtener el suero y se guardó puro ó en diluciones previas liofilizadas.

2. Validación del antisuero.

La validación del anti-IgG de conejo en camero incluyó:

I. Titulación.

II. Prueba de avidéz.

1. Titulación.

Se define como título del antisuero anti-IgG la dilución capaz de precipitar eficientemente la hormona marcada añadida y unida al anticuerpo específico.

Una vez hecha la extracción de sangre al animal inmunizado, se pasa a titular dichos antisueros, para ello se hacen diluciones del suero en el rango de 1/4 hasta 1/64 utilizando como diluyente solución tampón fosfato pH 7.4 con 8% de polietilenglicol.

Para cada dilución se realiza una prueba de afinidad (uniones específicas-Bo y no específicas-NSB) y se comparan los resultados con un antisuero control . Los reactivos utilizados para este análisis y el protocolo seguido fueron los siguientes:[1]

Reactivos:

1. Solución tampón fosfato: 0.04M que contiene EDTA 0.025M, cloruro de sodio 0.15M, Albúmina sérica bovina 0.5% y azida sódica 0.02%, pH 7.4.

2. Anticuerpo específico:

-dilución 1/64000 en el tampón anterior del suero de conejo anti-LH humana.

-dilución 1/8000 en el tampón anterior del suero de conejo anti-FSH humana.

-dilución 1/4000 en el tampón anterior del suero de conejo anti-prolactina humana.

3. Hormona marcada:

-Solución de LH que contiene 10 000cpm en 100µl de solución tampón y dilución 1/400 de suero normal de conejo.

-Solución de FSH que contiene 20 000cpm en 100µl de solución tampón y dilución 1/400 del suero normal de conejo.

-Solución de Prolactina que contiene 20 000cpm en 100µl de solución tampón y dilución 1/400 del suero normal de conejo.

4. Reactivo precipitante: Suero de camero anti globulinas de conejo, dilución (1/4-1/64) en solución tampón que contiene polietilenglicol 6000 al 8%.

La radioidodación de las hormonas hLH, hFSH y hProlactina se desarrolló en el CENTIS [1,8].

Mezcla de reacción:

100µl de la dilución del anticuerpo específico

100µl del trazador

100µl de solución tampón.

Se incuban en un tubo plástico o de vidrio 12 X 75mm durante 2 horas a temperatura ambiente sin agitación. Se añaden 100µl del reactivo precipitante y se incuban una hora en las mismas condiciones anteriores. Se centrifuga a 3000 rpm durante 30min y se desecha el sobrenadante. Se cuenta la radioactividad que permanece en el precipitado en un contador de

radiaciones Gamma (LKB-1275), durante un minuto y se le resta el conteo de un tubo procesado de forma similar, donde la dilución del anticuerpo se sustituye por un voltmen igual de solución tampón (unión no específica- NSB).

La cantidad de radiactividad asociada a la hormona que es capaz de ser unida por el anticuerpo en esas condiciones (Bo) de incubación se calcula como la relación de lo anterior con la cantidad de radioactividad añadida en la mezcla de incubación (conteos totales) y se expresa como porcentaje. Como resultado de este análisis se grafica la relación Bo/T contra dilución del antígeno y la dilución óptima del anticuerpo para el ensayo será aquella que se corresponda con un porcentaje aceptable de unión específica.

II. Prueba de avidéz.

La avidéz del anti IgG se evalúa de forma indirecta, por medio del estudio de la curva de calibración, para lo cual en la mezcla de reacción explicada con anterioridad se incuban 100µl de concentraciones diferentes de los estándares de hLH, hFSH y hPrL. Esto es debido a que no es posible determinar adecuadamente los parámetros termodinámicos de la relación de este anticuerpo con su antígeno (afinidad), por efectuarse la reacción en condiciones distintas del equilibrio y por ser un anticuerpo policlonal [5,6].

Para llevar a cabo estos análisis se montan curvas de calibración utilizando el reactivo precipitante en la dilución (título) escogida anteriormente. De esta forma se compararon los parámetros de control de calidad de cada Kit con los obtenidos usando el nuevo antisuero.

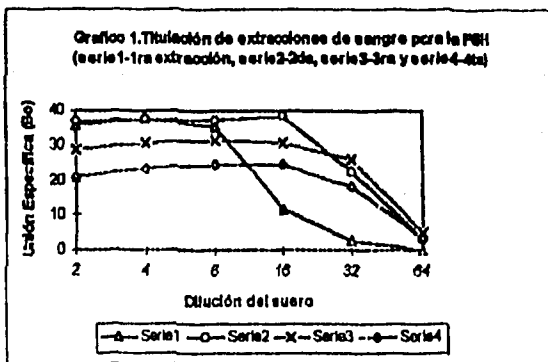
3. Análisis Estadístico.

Se realizó un test de Student para la comparación de medias a los parámetros de control de calidad obtenidos para cada Kit.

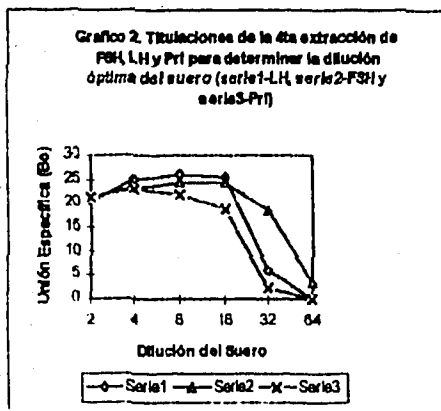
RESULTADOS Y DISCUSION

Las titulaciones de las extracciones de sangre (en total se analizaron 4) mostraron resultados similares para las tres hormonas (LH, FSH y PrL). El gráfico 1 representa las titulaciones realizadas para la FSH.

Como se puede observar en el gráfico a medida que avanzó el ciclo de inmunización de los animales, aumentó la concentración del anti-IgG de conejo lo que conllevó al incremento de la zona útil de trabajo del antisuero (plateau).



Con el objetivo de preparar un reactivo precipitante para ser utilizado en los tres Kits de las hormonas hipofisarias hLH, hFSH y hProlactina, se graficó el porcentaje de unión específica contra dilución del suero y se escogió la dilución óptima dentro de la zona de trabajo del antisuero (plateau) para las tres hormonas. El gráfico 2 muestra este análisis para la cuarta extracción de sangre de las tres hormonas.



Debido a que desde la 2da extracción hasta la cuarta analizada, el platou de las curvas obtenidas de las hormonas en estudio se encontraron aproximadamente en el rango de 1/8 hasta 1/16, se decidió hacer un "pool" de estos antisueros y utilizarlos como reactivo precipitante en los Kits de LH, PSH y PrL en la dilución de trabajo 1/12.

En las tablas 1, 2 y 3 se muestran los resultados de los parámetros de control de calidad de cada Kit, para la dilución escogida 1/12.

TABLA 1: Parámetros de control de calidad para la dilución 1/12 del 2do antisuero en el Kit de PSH.

PARAMETRO	KIT COMERCIAL	UTILIZANDO DIL. 1/12 DEL POOL
Pendiente	-1.046	-0.973
Intercepto	1.035	0.893
ED-50	9.70	8.34
Suero Control alto	57.7± 2.5	58.7± 6.7
Suero Control medio	13.1± 0.49	13.6± 0.81
Suero Control bajo	6.25± 0.01	6.15± 0.81

TABLA 2. Parametros de control de calidad para la dilución 1/12 del 2do antisuero en el Kit de LH.

PARAMETRO	KIT COMERCIAL	UTILIZANDO DIL. 1/12 DEL POOL
Pendiente	-1.205	-0.985
Intercepto	1.831	1.967
ED-50	33	30
Suero Control alto	42.6± 8.2	44.2± 1.1
Suero Control medio	7.9± 3.4	8.5± 0.02
Suero Control bajo	1.7± 0.86	1.8± 0.01

TABLA 3: Parámetros de control de calidad para la dilución 1/12 del 2do antisuero en el Kit de PrL.

PARAMETRO	KIT COMERCIAL	UTILIZANDO DIL. 1/12 DEL POOL
Pendiente	-0.982	-1.029
Intercepto	2.370	2.758
ED-50	425	480
Suero Control alto	1084± 289	1324± 72
Suero Control medio	190± 50	212± 25
Suero Control bajo	92± 19	91± 13

Los resultados de los sueros controles están expresados en $\mu\text{U/ml}$ para la PrL y en mU/ml para la LH y FSH.

Los resultados de los parámetros de control de calidad utilizando el anti-IgG de conejo obtenido en la dilución escogida, caen en el rango de trabajo del Kit comercial, por estas razones se puede concluir que los anticuerpos obtenidos cumplen los requisitos necesarios para ser utilizados en los Kits de producción nacional de LH, FSH y Prolactina.

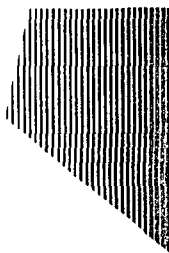
Los resultados del Test de Student para un 95% de confianza arrojaron en todos los casos, que no hubo diferencias significativas entre las medias de los parámetros de calidad del Kit comercial y del Kit en el cual se utilizó el anticuerpo obtenido.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron anticuerpos anti-globulinas de conejo en carnero con los parámetros de calidad requeridos para ser utilizados en los Kits de producción nacional de Radioinmunoanálisis de FSH, LH y Prolactina.

BIBLIOGRAFIA

1. R. González y C. Arranz, Protocolo Tecnológico para la preparación del Kit-RIA de LH, FSH y Prolactina de producción nacional. Instituto Nacional de Endocrinología.
2. C. Arranz, R. González y R. Robaina, Producción de anticuerpos anticueriel en conejo para su uso en Radioinmunoanálisis, Rev cubana Biomedicina, 6(1), 89-94, Ene 1987.
3. Catálogo Bioproducts 94-95.
4. Vaitukaitis J.L, Robbins J.B, A method for producing specific antisera with small dosis of immunogen, J.Clin. End. Metab, 33, 988, 1971.
5. Curso Nacional sobre Metodologías de Radioisótopos y Radioinmunoanálisis (ARCAL-VIII), México, 1993.
6. Edited by Work T.S, Work E. An Introduction to Radioimmunoassay and related techniques, 1978.
7. Sufi S. Donaldson A., et al. W.H.O Special Programme of Research. Development and Reasearch Training in Human Reproduction. Programme for the Provision of Matched Assay Reagents for the Radioimmunoassay of Hormones in Reproductive Physiology. Method Manual. Eleven Edition, 1987.
8. Caso R. y Arranz C. Evaluación de Prolactina humana de producción nacional para su empleo en Radioinmunoanálisis (RIA), CIEN-R, 24-96, 1996.



CIEn

**CENTRO DE INFORMACION
DE LA ENERGIA NUCLEAR**

Calle 20 No. 4113 e/ 18A y 47, Playa

Tel.: 22-7527. Fax: 331188.

E mail: cien @ceniai cu