

Producción de un anticuerpo monoclonal para la detección del antígeno A del sistema ABO de grupos sanguíneos*

A. L. HORENSTEIN¹; A. KOSS y H. M. GLAIT¹

* Centro Oncológico de Medicina Nuclear, Universidad de Buenos Aires y Comisión Nacional de Energía Atómica. Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Av. San Martín 5481, (1417) Buenos Aires, Argentina.

¹ Miembro de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico del CONICET.

Resumen

Se demuestra en el presente trabajo la utilidad de anticuerpos monoclonales anti-grupo sanguíneo A obtenidos a partir de un híbrido generado por fusión entre linfocitos de bazo de ratón inmunizado y células de mieloma. El clon productor del anticuerpo monoclonal, denominado B₂/C114, fue propagado como tumor ascítico en ratones, lo que permitió su conservación y producción en gran escala. El reactivo obtenido es útil para la evaluación rutinaria de grupos sanguíneos, presentando gran avidéz, estabilidad superior a 12 meses y alto título, condiciones que satisfacen ampliamente los requerimientos de seguridad diagnóstica y costo efectivo.

Palabras clave: anticuerpos monoclonales * grupos sanguíneos * antígeno A.

Summary

A monoclonal anti-A antibody secreted by a stable cloned hybridoma derived by fusion of spleen cells from immunized mice with a mouse myeloma cell line has been evaluated and found suitable for use as a potent routine ABO blood-grouping reagent. The IgG anti-A secreting cell line B₂/C114 has been successfully propagated as ascitic tumor for large-scale production of antibody. This reagent has the advantages inherent in monoclonal antibodies, among them unlimited availability of unvarying antibody of known properties, high avidity and stability of more than 12 months, which greatly satisfy the requirements of diagnostic accuracy and cost effectiveness.

Key words: monoclonal antibodies * blood groups * A antigen.

Introducción

Un suero testigo para el agrupamiento sanguíneo debe satisfacer condiciones indispensables, a saber: 1) ser altamente específico para el antígeno del grupo; 2) suficientemente ávido para dar una precoz e inequívoca reacción macroscópica de aglutinación; 3) estable en las condiciones de uso y 4) fácilmente obtenible en grandes cantidades y a costos reducidos.

La mayor parte de los sueros testigos utilizados son de origen humano, provenientes de personas que accidental o deliberadamente poseen anticuerpos adecuados para el agrupamiento. Sin embargo, su preparación re-

quiere la utilización de miles de litros de suero humano, con un serie de *test* necesarios para monitorear su avidez y especificidad, así como la presencia de sustancias potencialmente patógenas (1).

Los intentos para producir estos reactivos a partir de fuentes no humanas han sido parcialmente exitosos. Sustancias obtenidas de caracol (2), plantas (3) o peces (4) carecen de especificidad, estabilidad o actividad suficiente para los ensayos de rutina.

La técnica desarrollada por Kohler y Milstein (5) de inmortalización de células productoras de anticuerpos por fusión de linfocitos de bazo de ratón inmunizado y células de mieloma, seguida por la destrucción selectiva de estas últimas (6), ha permitido obtener anticuerpos monoclonales de alta especificidad, fácilmente purificables, reproducibles, homogéneos, en cantidades ilimitadas y a bajo costo de producción. Estos anticuerpos son de enorme utilidad en la preparación de reactivos para laboratorios de análisis clínicos, donde el rendimiento de los productos, en cuanto a su seguridad diagnóstica y costo efectivo, son críticos.

Este trabajo demuestra la utilidad de un anticuerpo monoclonal anti-grupo sanguíneo A, obtenido, accidentalmente, a partir de híbridos generados por fusión entre linfocitos de bazo de ratón inmunizado con el antígeno carcinoembrionario y células de mieloma (7).

Materiales y métodos

Obtención de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales fueron producidos por hibridomas generados por fusión de linfocitos de bazo de ratones Balb/c, inmunizados con el antígeno carcinoembrionario (CEA) con células del mieloma X63-Ag8.653, en presencia de polietilenglicol 1500 al 30 %. La selección de los hibridomas se realizó en medio de cultivo RPMI 1640 conteniendo hipoxantina, methotrexate y timidina (6). La detección de células híbridas secretoras de anticuerpos específicos se realizó por radioinmunoanálisis en fase sólida, utilizando CEA como antígeno (7).

Se obtuvieron 11 cultivos positivos, los cuales fueron clonados dos veces por el método de las diluciones limitantes y expandidos como tumores ascíticos en ratones Balb/c. Uno de los subclones, denominado B₂/C114, que presentó reactividad inmunológica con el antígeno A de eritrocitos humanos, fue seleccionado para los estudios posteriores.

Test de hemaglutinación

Las pruebas de laboratorio para la determinación de los antígenos del sistema ABO se realizaron con suspensiones de eritrocitos provenientes de sangre obtenida por punción venosa y estabilizada en soluciones de oxalatos o heparina.

1) Reacciones en placa de vidrio: se realizaron por confrontación, a temperatura ambiente, entre una gota de sangre total con una gota de: a) reactivo comercial anti-A; b) reactivo comercial anti-B y c) anticuerpo monoclonal diluido 1:100 en solución salina normal (ClNa, 0,15 M). Luego de mezclar con palillos de madera, se realizó la lectura de los resultados dentro del primer minuto. Un *test* positivo, resultante en aglutinación, indicó la presencia del antígeno específico correspondiente.

2) Aglutinación en placa de microtitulación: 50 μ l de glóbulos rojos del grupo A lavados 2 veces con solución salina normal y diluidos 1:20 fueron confrontados en policubeta de 96 pozos con fondo en U con 50 μ l de líquido ascítico que contenía el anticuerpo monoclonal en diluciones crecientes en razón 2 hasta 1:8.192. El perfil de aglutinación fue evaluado a temperatura ambiente al cabo de 2-3 h, considerándose un *test* positivo cuando se formó una capa celular de bordes definidos o irregulares, cubriendo en forma uniforme todo el fondo del pozo, y negativo cuando se observó un precipitado puntual depositado sobre el fondo del pozo. El título fue dado por la máxima dilución capaz de dar una aglutinación visible.

3) Reacciones en tubo: se utilizaron glóbulos rojos de los subgrupos A1, A2 y de un panel de grupo 0 clasificados para diversos fenotipos antigénicos que incluyen: Rh-hr, Kell (K/k), Duffy (Fy), Lutheran (Lu), Kidd (Jk), MNS_s, Lewis (Le), P, Xg, Colton y Dombrock (Biotest Diagnostics).

De acuerdo a las instrucciones incluidas con el producto la suspensión de eritrocitos al 5 %, que contenía el antígeno correspondiente, mezclada con igual volumen de anticuerpo monoclonal, fue incubada en ausencia y presencia de seroalbúmina bovina al 30 % durante 15 min a 37 °C y luego centrifugada durante 1 min a 1.000 rpm. Los resultados se evaluaron según la movilidad y aspecto macroscópico del sedimento al agitar ligeramente el tubo.

Resultados

El anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma B₂/C114 es del tipo IgG, demostrado con el *test* de Ouchterlony por inmunodifusión contra antiseros específicos de conejo anti-IgG e -IgM de ratón. La línea celular B₂/C114 conservada en cultivo durante más de 12 meses, mantuvo una producción constante de anticuerpos específicos. La expansión del híbrido, bajo la forma de tumor ascítico en ratones Balb/c, permitió obtener por cada punción abdominal entre 3-5 ml de líquido ascítico por animal, con una concentración de IgG de 5 a 20 mg/ml determinada por espectrofotometría UV ($E_{mg/ml}$: 0,71 a OD 280 nm), luego de precipitación con sulfato de amonio. El líquido ascítico conservado a 4 °C y -20 °C, con azida sódica como preservativo, no presentó variación cuantitativa en su actividad biológica.

La determinación del grupo sanguíneo del sistema ABO se realizó sobre 185 muestras. Los resultados del agrupamiento en placa se muestran en la tabla I. Todas las muestras de dadores de los grupos A y AB, detectados con

TABLA I. DETECCIÓN DE GRUPO SANGUÍNEO.^a

Muestras (n)	Reactivo comercial		Reactivo monoclonal	Fenotipo de los hematíes
	anti-A	anti-B		
78	78	0	78	A
23	0	23	0	B
76	0	0	0	0
8	8	8	8	AB

^a La reacción de los reactivos con los distintos fenotipos antigénicos se realizó en placa de vidrio, según la técnica descrita en Materiales y métodos.

el reactivo comercial, aglutinaron con el anticuerpo monoclonal ($n = 86$), mientras que, por el contrario, no se observó reacción alguna con glóbulos rojos de los grupos B ($n = 23$) y O ($n = 76$). En ningún caso se observó hemólisis. El tiempo que transcurrió hasta observar la hemaglutinación, a la concentración de líquido ascítico testada (1:100) fue, en todos los casos, inferior a los 20 segundos, mientras que concentraciones mayores aceleraron la reacción. La avidez del anticuerpo monoclonal diluido 1:100 es alta, produciendo reacciones de aglutinación similares a las obtenidas con el reactivo comercial utilizado. En los *test* negativos, no se observó ningún tipo de respuesta, ni aun prolongando el tiempo de reacción o modificando la concentración del reactivo.

En el análisis cuantitativo en placa de microtitulación B₂/C114 dio un título de 1:4.096, comparado con un valor de 1:32, dado por el reactivo comercial, confirmando la potencia del anticuerpo monoclonal.

En las reacciones en tubo, se obtuvo aglutinación sólo con glóbulos rojos de los subgrupos A1 y A2, mientras que con el panel comercial de eritrocitos portadores de fenotipos antigénicos de los sistemas Rh-hr, MNS_s, P, Le, K/k, Fy, Jk, Lu y otros, las reacciones de aglutinación fueron negativas.

Los reactivos controles, suero de ratón normal y líquido ascítico de otras líneas híbridas productoras de anticuerpos monoclonales (7) (8), no reaccionaron con ninguno de los fenotipos antigénicos evaluados.

Los ensayos de estabilidad realizados con un mismo líquido ascítico, conservado a 4-8 °C con azida sódica, mostraron que el anticuerpo monoclonal mantiene su título durante por lo menos un año.

Discusión

Como resultado de una fusión, entre linfocitos esplénicos de ratones inmunizados y una línea de mieloma murino para producir anticuerpos monoclonales anti-CEA (7) se obtuvo, entre otros, el hibridoma B₂/C114 productor de anticuerpos que aglutinan específicamente glóbulos rojos humanos portadores del antígeno A. El líquido ascítico obtenido por punción abdominal de ratones portadores de dicho hibridoma es de manipulación sencilla, ya que no requiere *tests* para monitorear la presencia de sustancias potencialmente patógenas, como en el caso de antisueros de origen humano. Por su avidez y especificidad, el líquido ascítico diluido 1:100, en solución salina normal, permite obtener una reacción de aglutinación macroscópicamente visible e inconfundible con sangre de los grupos A y AB. El tiempo necesario para la observación de esta reacción es equivalente a los mejores reactivos comerciales utilizados en la actualidad. Por otra parte, los eritrocitos de los grupos B y O no presentan ningún tipo de reacción.

Reactivos monoclonales para la detección del grupo sanguíneo A, ya sea por inmunización de ratones con eritrocitos A, o por obtención accidental a partir de inmunizaciones con células de amígdala o de una línea celular de carcinoma de colon humano, han sido descriptos (9) (10) (11). Sin embargo, no todos producen anticuerpos aglutinantes, útiles para la rutina bioquímica. El anticuerpo monoclonal B₂/C114 reúne las propiedades necesarias para su utilización en bioquímica clínica, ya que a su especificidad, avidez y estabilidad se agrega su bajo costo de producción, dado que un ratón

puede llegar a producir hasta 15 ml de ascitis, que contiene la inmunoglobulina específica, lo que equivale a unas 30.000 determinaciones.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Sr. E. D'Orio por su excelente asistencia técnica y a la Srta. C. Simon por la preparación del manuscrito. Los ensayos de tipificación de grupos sanguíneos fueron realizados en los Servicios de Hemoterapia del Hospital Israelita, a cargo del Dr. M. Feierstein y del Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", a cargo de la Dra. L. Adan, y en el laboratorio de los Dres. M. B. y B. Horenstein (Mendoza) a quienes agradecemos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NEURATH, A. R.; STRICK, N.; LEE, Y. S.; NILSEN, T.; BAKER, P. and col., "Radioimmunoassay of antibodies direct against LAV proteins larger than the core protein (p24)", *J. Virol. Meth.*, 12, 85-92, 1985.
2. CANN, R. J., "A brief evaluation of snail anti-A in manual blood-group procedures", *Med. Lab. Sci.*, 32, 69-71, 1975.
3. BOYD, W.; ALMODOVAR, L. and BOYD, L., "Agglutinins in marine algae for human erythrocytes", *Transfusion*, 6, 82-83, 1966.
4. DOWNIE, D.; MADIN, D. and VOAK, D., "An evaluation of salmon anti-B reagent in manual and automated blood grouping", *Med. Lab. Sci.*, 34, 319-324, 1977.
5. KOHLER, G. and MILSTEIN, C., "Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity", *Nature*, Lond. 256, 495-497, 1975.
6. HORENSTEIN, A. L.; GLAIT, H. M. and KOSS, A., "An improved selection procedure for rescue of hybridomas. A comparative study of methotrexate versus aminopterin", *J. Immunol. Meth.* (en prensa).
7. HORENSTEIN, A. L.; GLAIT, H. M.; KOSS, A.; CAPALBO, E.; D'ORIO, E. G. y OLIVARI, A. J., "Monoclonal Antibodies Specific for Carcinoembryonic Antigen produced by hybridoma technology", *Medicina* (Buenos Aires), 46, 423-428, 1986.
8. HORENSTEIN, A. L.; GLAIT, H. M. and KOSS, A., "Hybridoma cell lines secreting monoclonal antibodies against equine infectious anemia virus", *J. Virol. Meth.*, 15, 177-185, 1987.
9. MAJDIC, O.; KNAPP, W.; VETTERLEIN, M.; MAYR, W. R. and SPEISER, P., "Hybridomas secreting monoclonal antibodies to human group A erythrocytes", *Immunobiology*, 156, 226-227, 1979.
10. BARNSTABLE, C. J.; BODMER, W. F.; BROWN, G.; GALTRE, G.; MILSTEIN, C.; WILLIAMS, A. F. and ZIEGLER, A., "Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens - new tools for genetic analysis", *Cell*, 14, 9-20, 1978.
11. VOAK, D.; SACKS, S.; ALDERSON, T.; TAKEI, F.; LENNOX, E.; JARVIS, J.; MILSTEIN, C. and DARNBOROUGH, J., "Monoclonal Anti-A from Hybrid-Myeloma: Evaluation as a Blood Grouping Reagent", *Vox Sang.*, 39, 134-140, 1980.