

R. 6.523

579.61.08

Goy

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Patología Animal I

**APLICACION DE LOS ANTICUERPOS
MONOCLONALES PARA LA DETECCION
DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOVICAS**



Joaquín Goyache Gofil

Madrid, 1992

Colección Tesis Doctorales. N.º 5/92

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
ESCUELA DE ESTOMATOLOGÍA
CIUDAD UNIVERSITARIA

© Joaquín Goyache Gofí

Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.
Madrid, 1992.

Ricoh 3700

Depósito Legal: M-6509-1992



La Tesis Doctoral de D. JOAQUIN GOYACHE GOÑI

.....
Titulada .. Aplicación de los anticuerpos monoclonales...
para la detección de enterotoxinas estafilocócicas
.....

Director Dr. D.G. Suárez Fernández y E. Gómez-Lucía y Duato
fue leída en la Facultad de Veterinaria

de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, el día .20...
de Marzo de 19 ..⁹¹..., ante el tribunal
constituido por los siguientes Profesores:

PRESIDENTE .. Lucas DOMINGUEZ RODRIGUEZ

VOCAL .. Elías F. RODRIGUEZ FERRI

VOCAL .. Santiago VADILLO MACHOTA

VOCAL .. Javier DUCHA SARDAÑA

SECRETARIO .. José Luis BLANCO CANCELO

.....
habiendo recibido la calificación de APTO. CUM...
LAUDE POR UNANIMIDAD

Madrid, a 20 de Marzo de 19 91.

EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL.

APLICACION DE LOS ANTICUERPOS
MONOCLONALES PARA LA DETECCION
DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS

Joaquín Goyache Goñi

DPTO. PATOLOGIA ANIMAL I
FACULTAD DE VETERINARIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Dirigida por los Drs. G. Suárez y E. Gómez-Lucía

MADRID

1991

Memoria presentada para
optar al grado de Doctor
en Veterinaria



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA

Dña. ESPERANZA GOMEZ-LUCIA Y DUATO y D. GUILLERMO SUAREZ FERNANDEZ, PROFESORA TITULAR Y CATEDRATICO DE MICROBIOLOGIA RESPECTIVAMENTE DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICAN: que la Tesis Doctoral que lleva por titulo "APLICACION DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA LA DETECCION DE ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS", de la que es autor el Licenciado en Veterinaria D. JOAQUIN GOYACHE GOÑI, se ha realizado en los laboratorios de Microbiología de Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de esta facultad bajo nuestra dirección, destacando su elevada densidad experimental y la contribución positiva del planteamiento propuesto, tal y como se refleja en las conclusiones alcanzadas.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a cuatro de Marzo de mil novecientos noventa y uno.

E. Gómez-Lucía

G. Suárez

Fdo.: E. Gómez-Lucía

Fdo.: G. Suárez

di una casa y hermosa
A Mariana

Es difícil afirmar con seguridad
algo si no has sido examinado antes
varias veces. Fuese el dudar de cada
cosa no es algo inútil, ya que al
dudar empezamos a investigar y al
investigar encontramos la verdad.

Aristóteles



Desde que comencé este trabajo, todo el mundo se refería a él como "tu tesis". Nada más lejano de la realidad. La contribución de todos aquellos que me rodearon en esos momentos hicieron este proceso posible, a la vez que agradable, demostrando cuanto hay de bueno en trabajar juntos, sin comprometer esfuerzos particulares, ni diluir ideas. Las páginas que siguen son el resultado de cinco largos años de trabajo, con alegrías y sufrimientos, momentos de euforia y desmayos. El apoyo de todos me ha resultado esencial para culminar esta Memoria. De entre todos ellos quiero destacar a las siguientes personas:

A los Dres. Guillermo Suárez y Esperanza Gómez-Lucía, directores de esta Tesis Doctoral, por haberme introducido en el maravilloso mundo de la investigación, permitiéndome trabajar a su lado, y enseñándome parte del gran conocimiento que poseen.

Al Dr. José Luis Blanco, con quien he compartido despacho durante todo el tiempo que ha durado este trabajo, por haberme brindado su amistad, su ayuda inestimable y su apoyo incondicional, tanto en los buenos, como, sobre todo, en los malos momentos. Gracias por ser mi amigo.

Al Dr. José Antonio Orden, quien robó tiempo a su trabajo para contribuir en la difícil puesta a punto de todas las técnicas que se han utilizado en este estudio. Jamás protestó por tener que ayudar, incluso si ello suponía sacrificar sus horas de descanso. Aun así, fue capaz de desarrollar su propia tarea de investigación.

Al Dr. Víctor Briones, por enervarme con sus silbidos y permitirme que le molestara habitualmente con mis poco interesantes conversaciones. Siempre me brindó su amistad de forma generosa, sentimiento que procuré fuera recíproco.

Al Dr. Lucas Domínguez, quien se ha preocupado constantemente por mí, y me ha concedido el privilegio de trabajar a su lado, lo que me ha permitido aprovecharme de sus excelentes ideas, muchas de las cuales he plasmado como propias en esta memoria.

A Nuria Liria ("Nurik"), Susana Díaz ("SD") y Beatriz A. Carrón ("Bee"), por quererme tanto como yo las quiero.

A D. Javier Hernández y Dña. Ana Doménech, por tener la desgracia de compartir sus investigaciones con quien les agradece esa deferencia.

A todos los miembros del Departamento de Patología Animal I, y en especial a los que trabajan o han trabajado junto a mí en el laboratorio de Microbiología e Inmunología: Dres. María Jesús Payé, María Teresa Cutuli, Ana Mateos y Miguel Angel Moreno, y a Dña. Marta Eulalia García, por los esfuerzos en evitar contaminaciones fúngicas en los cultivos tisulares, con el trastorno que ello supuso en el normal funcionamiento de su trabajo. A D. José Antonio Ruiz-Santa Quiteria, por ofrecermme siempre que lo necesité su útil ayuda. A los "Listeriólogos" Dr. José F. Fernández-Garayzábal (además de por su calculadora), D. José Antonio García, Dña. María del Mar Blanco y Dña. Carmen Delgado, por ocupar gran parte de los congeladores del laboratorio, y así darme un motivo para pensar dónde está el material congelado; por encima, por debajo o entre sus múltiples cepas. No obstante, la actividad frenética de este grupo es motivo de ejemplo para todos los componentes del laboratorio. A Alicia Gibello por, y citando al Dr. Briones, "su elevada talla investigadora", y por ser una de las personas más adorables que conozco; su valía personal es tan grande como la admiración que le profeso. Al Dr. Ricardo de la Fuente, por darme una de las prácticas más bonitas de toda la carrera, las de Microbiología, sin saber que aquel pesado estaría junto a él unos años más tarde. A Dña. Pilar Capón y D. Félix Fernández, por ayudarme en lo mucho que pudieron.

A los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV (Laboratorio de Química)

de la Facultad de Veterinaria, por dejarme molestarles y robarles su tiempo y material, permitiendo que un intruso estuviera con ellos como en su propia casa. Gracias por todo.

A todos aquellos que me ayudaron y que no están nombrados, por favor que perdonen su omisión.

A los ratones BALB/c, por sufrir mi torpe manipulación sin emitir un quejido. Espero que su muerte haya servido de algo. Su imprescindible utilización y sufrimiento jamás será tan valorada como por el investigador que los cría, quien llega a encariñarse con estos útiles animales, siendo consciente de que debe huir de los sensacionalismos que rodean a estas maravillosas criaturas de laboratorio.

ABREVIATURAS

AM: Anticuerpo Monoclonal
BSA: Albúmina Sérica Bovina
DAB: Di-Amino-Bencidina
DAS: "Double Antibody Sandwich"
DMEM: Medio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
EE: Enterotoxina Estafilocócica
et al.: "et alteri"
EBV: Virus de Epstein-Barr
ELISA: "Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay"
FACS: "Fluorescence Activated Cell Sorter"
FCA: Adyuvante Incompleto de Freund
FCS: "Fetal Calf Serum"
FIA: Adyuvante Incompleto de Freund
GAM: "Goat Anti Mouse"
HAT: Hipoxantina Aminopterina Timidina
HT: Hipoxantina Timidina
ip.: intraperitoneal
iv.: intravenoso
PEG: Poli-Etilén-Glicol
RAM: "Rabbit Anti Mouse"
RIA: Radio-Inmuno-Análisis
TSST-1: "Toxic Shock Syndrome Toxin-1"
vs.: "versus"

A. INTRODUCCION	1
A. I. CONOCIMIENTOS PREVIOS Y CONSIDERACIONES GENERALES	3
A. I. a: <u>Introducción</u>	3
A. I. b: <u>Anticuerpos monoclonales vs. policlonales</u>	4
A. I. c: <u>Desventajas de los anticuerpos policlonales</u>	4
A. I. d: <u>Ventajas de los anticuerpos monoclonales</u>	5
A. I. e: <u>Desventajas de los anticuerpos monoclonales</u>	6
A. II. PROCESO A SEGUIR PARA LA OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	7
A. III. LINEA DE MIELOMA	8
A. III. a: <u>Problemas iniciales y características deseables</u>	8
A. III. b: <u>Técnicas de selección de hibridomas</u>	9
A. III. b. 1: <u>Selección por suero</u>	9
A. III. b. 2: <u>Selección por aminopterina/emetopterina</u>	9
A. III. b. 3: <u>Selección mixta</u>	10
A. III. b. 4: <u>Selección por azaserina</u>	10
A. III. c: <u>líneas de ratón</u>	11
A. III. c. 1: <u>Condiciones de cultivo</u>	12
A. III. c. 1.1: <u>Contaminantes</u>	12
A. III. c. 1.2: <u>Suero, problemas y alternativas</u>	13
A. III. d: <u>líneas de ratón</u>	14
A. III. e: <u>líneas humanas</u>	15
A. III. f: <u>Otras consideraciones</u>	15
A. IV. <u>INMUNIZACION</u>	15
A. IV. a: <u>inmunización "in vivo"</u>	16
A. IV. b: <u>inmunización "in vitro"</u>	16
A. IV. c: <u>Aumento de la frecuencia de células B específicas mediante la técnica denominada "Adoptive-transfer"</u>	19
A. IV. d: <u>Fusión con células esplénicas y células de ratón purificadas sin inmunización</u>	20
A. V. <u>FUSION</u>	20
A. V. a: <u>Agentes fusionantes</u>	21
A. V. a. 1: <u>Primeros agentes</u>	21
A. V. a. 2: <u>PEG</u>	22
A. V. a. 3: <u>PEG + DMSO</u>	23
A. V. b: <u>Electrofusión</u>	24
A. V. c: <u>Fusión selectiva</u>	24
A. VI. <u>SELECCION DE LOS HIBRIDOS MIELOMA-LINFOCITO</u>	25
A. VII. <u>ANALISIS DE LOS HIBRIDOS OBTENIDOS</u>	27
A. VIII. <u>CLONACION</u>	30
A. VIII. a: <u>Clonación por dilución límite</u>	30
A. VIII. a. 1: <u>Células "Feeder-Layer"</u>	31
A. VIII. a. 2: <u>Factores solubles</u>	32
A. VIII. b: <u>Clonación en medio semisólido</u>	32
A. VIII. c: <u>FAC</u>	33
A. IX. <u>EXPANSION DE LOS CLONES Y PRODUCCION DE GRANDES CANTIDADES DE ANTICUERPOS</u>	33
A. IX. a: <u>Expansión</u>	33
A. IX. a. 1: <u>Inestabilidad de los híbridos</u>	34
A. IX. a. 2: <u>Crioconservación</u>	34
A. IX. a. 2.1: <u>Condiciones de congelación</u>	34

A.IX.a.2.2: Criopreservación en microplaca	35
A.IX.b: <u>Producción en gran escala</u>	35
A.IX.b.1: Medio de cultivo <u>vs.</u> ascitis	36
A.IX.b.2: Producción en cultivo continuo	36
A.IX.c: <u>Producción de ascitis</u>	37
A.IX.c.1: Preparación de la cavidad peritoneal	37
A.IX.c.2: Inoculación intrasplénica	38
A.IX.c.3: Recolección de líquido ascítico	38
A.IX.c.4: Factores que afectan a la producción de ascitis	39
A.X. PURIFICACION, CARACTERIZACION Y ALMACENAMIENTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	40
A.X.a: <u>Determinación de clase y subclase</u>	40
A.X.b: <u>Purificación</u>	41
A.X.c: <u>Determinación de las características del anticuerpo</u>	43
A.X.d: <u>Almacenamiento</u>	45
A.XI. MARCADO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES	46
A.XII. CONCLUSION	46
A.XIII. ENTEROTOXINAS ESTAFILOCOCCICAS	48
A.XIII.a: <u>Propiedades físico-químicas</u>	49
A.XIII.b: <u>Propiedades inmunológicas</u>	51
A.XIII.c: <u>Patogenia</u>	52
A.XIII.d: <u>Análisis de enterotoxinas</u>	53
A.XIII.e: <u>Anticuerpos monoclonales frente a enterotoxinas</u>	55
B. OBJETIVOS	57
C. MATERIAL Y METODOS	61
C.I. MATERIAL	63
C.I.a: <u>Línea de mieloma</u>	63
C.I.b: <u>Medio de cultivo para mieloma</u>	63
C.I.b.1: Medio de Eagle Modificado según Dulbecco (DMEM)	63
C.I.b.2: Suero Fetal Bovino (FCS)	64
C.I.b.3: Soluciones antimicrobianas	64
C.I.b.4: Hipoxantina (6-Hidroxiipurina)	64
C.I.b.5: Timidina-Glicina	64
C.I.b.6: θ -Azaguanina	65
C.I.c: <u>Medio de cultivo selectivo</u> (Aminopterina)	65
C.I.d: <u>Material de cultivo</u>	65
C.I.d.1: Frascos de cultivo tisular	65
C.I.d.2: Microplacas	66
C.I.d.3: Pipetas y micropipetas	66
C.I.e: <u>Material para la congelación</u>	66
C.I.e.1: Mezcla de congelación	66
C.I.e.2: Eriotubos	66
C.I.f: <u>Copa de ratones</u>	66
C.I.g: <u>Material para la inmunización</u>	67
C.I.g.1: Adyuvantes	67
C.I.g.2: Enterotoxinas	67
C.I.h: <u>Material para la fusión</u>	67
C.I.h.1: Rejillas de ruptura	67
C.I.h.2: Polietilenglicol	67

C.1.h.3:	Tubos de centrifuga	67
C.1.h.4:	Solución de lisado de eritrocitos (ACE)	67
C.1.h.5:	Solución para el recuento celular	68
C.1.i:	<u>Material para realizar el método ELISA indirecto</u>	68
C.1.i.1:	Micropiñetas	68
C.1.i.2:	Micropipetas	68
C.1.i.3:	Tampones	68
C.1.i.3.1:	Tampón de tapizado	69
C.1.i.3.2:	Tampón de lavado	69
C.1.i.3.3:	Tampón citrato	69
C.1.i.4:	Antígeno de tapizado	69
C.1.i.5:	Seroalbúmina bovina (BSA)	69
C.1.i.6:	Anticuerpos monoclonales	69
C.1.i.7:	Conjugado para el análisis de hibridomas	69
C.1.i.8:	Conjugado para la determinación de subclases de IgG	70
C.1.i.9:	Sustrato	70
C.1.j:	<u>Material para la inmunotransferencia</u>	70
C.1.j.1:	Gel de electroforesis	70
C.1.j.1.1:	Tampones	70
C.1.j.1.3:	Aplicadores de muestra	70
C.1.j.4:	Marcadores de peso molecular	70
C.1.j.5:	Reactivos y Tampones	70
C.1.j.5.1:	Tampón de transferencia	70
C.1.j.5.2:	Tampón de bloqueo	70
C.1.j.5.3:	Tampón de lavado	71
C.1.j.5.4:	Sustrato	71
C.1.j.5.5:	Tampón de muestra	71
C.1.j.5.6:	Solución de tinción	71
C.1.j.5.7:	Solución de desfeída	71
C.1.j.5.8:	Solución de conservación	72
C.1.j.6:	Toxinas y RAM	72
C.1.j.7:	Membranas inmovilizantes	72
C.1.j.8:	Material para la separación del gel de electroforesis	72
C.1.k:	<u>Material para ELISA doble "sandwich" (DAS)</u>	72
C.1.l:	<u>Material para la extracción de EE de alimentos</u>	72
C.1.l.1:	Alimentos	72
C.1.l.2:	Bolsas para Stomacher	73
C.1.l.3:	Otros	73
C.1.m:	<u>Aparatos</u>	73
C.II. METODOS		74
C.II.a:	<u>Cultivo</u>	74
C.II.b:	<u>Inmunización</u>	75
C.II.c:	<u>Fusión</u>	77
C.II.d:	<u>Detección de los híbridos secretores</u>	83
C.II.e:	<u>Clonación por dilución límite</u>	85
C.II.f:	<u>Separación de los clones</u>	86
C.II.g:	<u>Competición celular</u>	87
C.II.h:	<u>Descontaminación</u>	87
C.II.i:	<u>Producción de anticóps</u>	88
C.II.j:	<u>Purificación y almacenamiento</u>	89
C.II.k:	<u>Determinación del título</u>	90

C.II.l:	<u>Determinación de clase y subclase de IgG</u>	90
C.II.m:	<u>Determinación de reacciones cruzadas</u>	91
C.II.m.1:	ELISA	91
C.II.m.2:	Imunotransferencia	91
C.II.m.2.1:	Electroforesis	91
C.II.m.2.2:	Transferencia	93
C.II.m.2.2.a:	Electroelución	93
C.II.m.2.2.b:	Inmudetección	94
C.II.n:	<u>Determinación de la capacidad de detección de EE homóloga</u>	95
C.II.ñ:	<u>Prueba de inhibición de la unión a la EE homóloga</u>	95
C.II.o:	<u>Determinación de la validez del anticuerpo para tapizar</u>	96
C.II.p:	<u>Conjugación de los anticuerpos monoclonales con peroxidasa</u>	97
C.II.q:	<u>Análisis de los conjugados</u>	98
C.II.r:	<u>Extracción de EE a partir de alimentos</u>	98
C.II.s:	<u>ELISA DAS</u>	101
D.	RESULTADOS	102
D.I.	FUSIONES	105
D.I.a:	<u>Elección PEG</u>	105
D.I.b:	<u>Concentración de PEG</u>	105
D.I.c:	<u>Esterilización de la mezcla fusionante</u>	106
D.I.d:	<u>Relación y estado celular</u>	106
D.I.e:	<u>Eliminación del medio selectivo</u>	107
D.I.f:	<u>Empleo de macrófagos</u>	107
D.I.g:	<u>Pruebas de clonación</u>	107
D.I.h:	<u>Fusiones con bazo de ratona inmunizada</u>	107
D.II.	PRODUCCION DE ASCITIS	108
D.III.	PURIFICACION	108
D.IV.	CARACTERISTICAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES	111
D.IV.a:	<u>Subclases de IgG</u>	111
D.IV.b:	<u>Título</u>	115
D.IV.c:	<u>Curvas de dilución</u>	116
D.IV.d:	<u>Capacidad de detección en ELISA indirecto</u>	116
D.IV.e:	<u>Estudios de inhibición</u>	123
D.IV.e.1:	Análisis de la inhibición de unión a EE homóloga	123
D.IV.e.2:	Constante de disociación	123
D.IV.f:	<u>Reacciones cruzadas</u>	123
D.V.	DETERMINACION DE ANTICUERPOS VALIDOS PARA TAPIZADO	128
D.VI.	DETERMINACION DE PAREJAS EFECTIVAS	128
D.VII.	ELISA DAS	132
D.VII.a:	<u>ELISA con parejas efectivas</u>	132
D.VII.b:	<u>Otras combinaciones</u>	132
D.VIII.	DETECCION DE EEs EN ALIMENTOS	132
E.	DISCUSION	139
E.I.	ELECCION DE LA LINEA DE MIELOMA	141
E.II.	CONDICIONES DE CULTIVO Y CONSERVACION CELULAR	141
E.III.	CONDICIONES DE TRABAJO Y CULTIVO	143
E.III.a:	<u>Contaminación microbiana</u>	143

E.III.a.1: <u>Contaminación fúngica</u>	143
E.III.a.2: <u>Contaminación bacteriana</u>	144
E.III.a.3: <u>Contaminación por micoplasmas</u>	144
E.III.b: <u>Porcentaje de CO₂</u>	144
E.III.c: <u>Porcentaje de FCS</u>	144
E.IV. <u>PROTOCOLO DE INMUNIZACION</u>	145
E.IV.a: <u>Concentración de toxina</u>	145
E.IV.b: <u>Vía de inoculación</u>	146
E.IV.c: <u>Medio para la vehiculación de la toxina</u>	149
E.IV.d: <u>Intervalos entre inoculaciones</u>	150
E.V. <u>FUSION</u>	150
E.V.a: <u>Preparación de las células para la fusión</u>	151
E.V.a.1: <u>Lavado celular</u>	152
E.V.a.2: <u>Temperatura</u>	152
E.V.a.3: <u>Lista de eritrocitos</u>	153
E.V.b: <u>Agente fusinante</u>	153
E.V.b.1: <u>Porcentaje de PEG</u>	155
E.V.b.2: <u>Esterilización de la mezcla fusinante</u>	155
E.V.b.3: <u>Tiempo de exposición a la mezcla fusinante</u>	155
E.V.c: <u>Manejo de las células tras la fusión</u>	156
E.V.d: <u>Selección celular</u>	157
E.VI. <u>SELECCION CELULAR Y CULTIVO POST-FUSION</u>	158
E.VI.a: <u>Cultivo</u>	158
E.VI.b: <u>Medio selectivo</u>	159
E.VI.c: <u>Empleo de células "Feeder-Layer"</u>	161
E.VII. <u>ENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS</u>	163
E.VII.a: <u>Incubado del antígeno</u>	164
E.VII.b: <u>Blanco</u>	165
E.VII.c: <u>Sobrenadante de cultivo</u>	166
E.VII.d: <u>Sensado</u>	167
E.VII.e: <u>Substrato</u>	168
E.VII.f: <u>Comentarios generales</u>	169
E.VIII. <u>CLONACION</u>	170
E.IX. <u>EXPANSION Y CONSERVACION DE LOS CLONES</u>	171
E.X. <u>PRODUCCION DE ADCETIS</u>	172
E.XI. <u>PURIFICACION</u>	175
E.XII. <u>TITULO Y CURVAS DE DILUCION</u>	178
E.XII.a: <u>Titulo</u>	178
E.XII.b: <u>Curvas de dilución</u>	181
E.XIII. <u>DETERMINACION DE LA SUBCLASE DE IgG</u>	182
E.XIV. <u>CAPACIDAD DE DETECCION DE SE HOMOLOGA POR ELISA INDIRECTO</u>	183
E.XV. <u>ESTUDIOS DE INHIBICION</u>	184
E.XV.a: <u>Análisis de inhibición de unión a EE homologa</u>	184
E.XV.b: <u>Constante de disociación</u>	185
E.XVI. <u>REACCIONES CON OTRAS ENTEROTOXINAS</u>	186
E.XVII. <u>ELECCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA TAPIZADO T/P CONJUGADO</u>	190
E.XVII.a: <u>Determinación de anticuerpos válidos para tapizado</u>	190
E.XVII.b: <u>Determinación de parejas efectivas</u>	191
E.XVII.c: <u>Otras consideraciones</u>	192
E.XVIII. <u>ELISA DAS</u>	193
E.XVIII.a: <u>ELISA con parejas efectivas</u>	193

E.XVIII.b: <u>Otras combinaciones</u>	196
E.XIX. DETECCIÓN DE EE _s EN ALIMENTOS	196
E.XX. CAPACIDAD DE DETECCIÓN	198
F. CONCLUSIONES	199
G. RESUMEN	203
G. I. RESUMEN	205
G. II. SUMMARY	206
H. BIBLIOGRAFIA	209

A. INTRODUCCION



A.I. CONOCIMIENTOS PREVIOS Y CONSIDERACIONES GENERALES

A.I.a: Introducción:

En 1975, Georges Kohler y César Milstein (Premios Nobel de Medicina y Fisiología en 1984), entonces en el Laboratorio de Biología Molecular de Cambridge, publicaban en la revista Nature [143] una técnica que permitía producir cantidades ilimitadas de anticuerpos altamente específicos.

Para llegar a la descripción de esta técnica Köhler y Milstein se basaron en los siguientes hechos científicos:

- * la Teoría de la Selección Clonal [48]
- * los estudios de hibridación celular [108]
- * el desarrollo de las técnicas de fusión celular [118, 204, 228] y selección celular [164, 165]
- * la inducción artificial de plasmocitomas [4, 213] y su posterior adaptación al cultivo [124]
- * la demostración de que era posible fusionar dos líneas celulares tumorales plasmáticas diferentes y que estas continuaban produciendo anticuerpos [68] o con linfocitos humanos periféricos y mieloma de ratón secretora de Ig A [237, 238]. Aparte de otros estudios previos de fusión de células de mieloma con otros tipos celulares [180, 209].

Una célula productora sólo expresa un anticuerpo debido al fenómeno de la exclusión alélica. Cuando se fusionan dos líneas de mieloma productoras, el híbrido obtenido es capaz de expresar codominantemente los genes de la producción de anticuerpos de ambas partes [177]. Aunque los respectivos genes de las regiones variable y constante permanecen expresados en la misma configuración cis, las cadenas ligeras y pesadas de ambas líneas se mezclan formándose moléculas híbridas [68, 170].

Por lo tanto los híbridos reciben en herencia, por un lado, la capacidad de multiplicarse indefinidamente en cultivo (propiedad cedida por la célula de mieloma), y por otro de producir anticuerpos (gracias al linfocito B). De

esta manera conseguimos "inmortalizar" linfocitos B secretores de los anticuerpos que en principio nos interesan.

A.I.b: Anticuerpos monoclonales vs. policlonales:

Pero con estas premisas no podemos llegar a comprender las enormes ventajas de los anticuerpos monoclonales frente a las limitaciones y problemas de la serología convencional, si no realizamos cuando menos una leve comparación.

Los inmunólogos, y todos aquellos científicos que se han servido de reactivos serológicos, se han encontrado con una serie de dificultades que parecían insalvables, como son la heterogeneidad e impredecibilidad de la respuesta inmune, que han frenado el desarrollo de muchas áreas de la ciencia y la medicina necesitadas del uso de técnicas inmunológicas [232].

Así, un antígeno está formado por una amalgama de entidades que estimulan al Sistema Inmune, respondiendo éste con la producción de una serie de anticuerpos específicos para ciertos componentes del antígeno que son llamados determinantes antigénicos o epitopos. Las moléculas con epitopos únicos son raras, mientras que lo común son moléculas con cientos o miles de epitopos.

Por otra parte, cada linfocito produce solamente un tipo de anticuerpo tras una estimulación adecuada (Teoría de la Selección Clonal de Burnet) [48], lo que supone que la respuesta del Sistema Inmune frente a la mayor parte de los antígenos implica cientos o miles de clones de linfocitos. Los productos de estos clones pueden reconocer muchos lugares diferentes de la molécula antigénica.

A.I.c: Desventajas de los anticuerpos policlonales:

La cantidad y calidad de los anticuerpos obtenidos varían de animal a animal inmunizado e incluso de una sangre a otra en el mismo animal. Cuando se ha obtenido un

suero con alta especificidad y titulo, la naturaleza de la inmunorrespuesta hace que el suero contenga un gran número de anticuerpos distintos, diferentes unos de otros en cuanto a su afinidad, reacciones cruzadas frente a los antígenos, y capacidad para agregar, precipitar o fijar el complemento [232]. Además, posee la desventaja de su impredecibilidad y no reproductibilidad [50]. Otros factores en contra son el que se requiere grandes cantidades de antígeno puro, y que incluso con un antígeno altamente purificado se obtienen un elevado número de anticuerpos frente a epitopos distintos a los deseados y frente a pequeños contaminantes [42, 50]; hasta en los antígenos aparentemente más puros, existen pequeñas contaminaciones que pueden poseer una altísima capacidad antigénica, induciendo anticuerpos frente a estos antígenos no deseados [111]. Por otro lado, el proceso de inmunización debe ser extremadamente cuidadoso y realizado en un elevado número de animales [50].

A.I.d: Ventajas de los anticuerpos monoclonales:

La propiedad que define a los anticuerpos monoclonales es que todas las moléculas de inmunoglobulinas son idénticas entre sí y reaccionan exactamente igual en todo momento [50, 66]. Por lo tanto son homogéneos y de comportamiento predecible, poseen un grado de especificidad muy alto, y se pueden obtener en cantidades virtualmente ilimitadas y de forma indefinida [50, 66, 102, 111, 171]. Es factible obtener líneas celulares que produzcan anticuerpos monoclonales usando inmunógenos no purificados [50, 111], ya que los múltiples componentes de una población heterogénea se resuelven al clonar. Con esta técnica se pueden producir anticuerpos bi-específicos sintetizados por líneas celulares obtenidas por fusión entre hibridomas secretadores de anticuerpos y células B normales (tridomas) [177] o entre dos hibridomas productores de anticuerpos (tetradomas o híbrido-hibridomas) [132, 253].

Según esto, Milstain definió a los anticuerpos monoclonales como anticuerpos químicamente puros que pueden pro-

ducirse a voluntad, en contraste con un antisuero convencional formado por una mezcla variable de especies químicas, que nunca puede ser reproducida una vez se agota el material original [176].

Así, por definición, los anticuerpos son monoclonales sólo si son secretados por un clon, denominándose clon a aquella población celular que se deriva de una sola célula [219]. Sin embargo, en la práctica es razonable decir que un anticuerpo es monoclonal si [296]:

- * es producido por un hibridoma que ha sido clonado con una técnica satisfactoria
- * sólo debe haber una subclase de anticuerpo. No obstante en teoría es posible para una célula cambiar de clase o subclase, por lo que al menos durante un tiempo pueden existir dos subclases del mismo idiotipo
- * sólo debe estar presente un tipo de célula. De existir dos será necesario reclonar, ya que aunque el anticuerpo sería monoclonal de resultar uno de los tipos celulares no productor, su concentración estaría limitada por la cantidad de células no secretoras presentes

Desafortunadamente, la monoclonalidad sólo es demostrable bajo una duda razonable [296].

A.1.e: Desventajas de los anticuerpos monoclonales:

Pero no todo son ventajas; en muchos casos los anticuerpos policlonales son claramente superiores a los monoclonales [245]. La producción de anticuerpos monoclonales es cara [14, 208] y requiere gran cantidad de tiempo [14], los anticuerpos obtenidos pueden ser demasiado específicos (por ejemplo, pueden fallar en la detección de algunos miembros de un determinado grupo de moléculas, como ocurre con cepas variantes de un microorganismo) [14, 111], pueden ligarse al epítopo con baja afinidad [14], puede pertenecer al epítopo erróneo [14, 246], aunque esto se puede solucionar detectando hibridomas con mutaciones somáticas, que producen anti-

cuerpos monoclonales mutantes con cambios estructurales en el sitio de unión o en su región constante [para revisión ver 249]. Por otro lado, los de ratón tienen ciertos problemas para su utilización terapéutica en el hombre [14] y además los anticuerpos monoclonales en general poseen las desventajas propias de su homogeneidad, entre las cuales destacan sus funciones biológicas limitadas (por ejemplo la IgG no fija el complemento, y por lo tanto no es citotóxi-¹ca) y su sensibilidad a la inactivación [208].

Parte de estos problemas pueden evitarse por medio de mezclas artificiales de anticuerpos monoclonales, realizándose de esta manera las funciones de los sueros convencionales, con la ventaja de contar con anticuerpos monoclonales, aunque en ciertos casos es muy difícil que tales mezclas funcionen [153]. El llegar a obtener los anticuerpos monoclonales deseados requiere suerte, experiencia y trabajo duro [14].

A.II. PROCESO A SEGUIR PARA LA OBTENCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los pasos a realizar son sencillos, aunque laboriosos. Si bien ningún laboratorio emplea exactamente la misma técnica y ésta se deriva en muchos puntos de observaciones empíricas [14], la pauta a seguir es aproximadamente la siguiente:

- * Obtención de una línea de mieloma estable
- * Obtención de linfocitos productores de anticuerpos específicos frente al antígeno deseado
- * Fusión mieloma/linfocito
- * Selección de los híbridos mieloma/linfocito
- * Análisis de los híbridos
- * Clonaje de los híbridos
- * Expansión de los clones deseados con determinación de su monoclonalidad
- * Producción del anticuerpo en grandes cantidades
- * Caracterización del espectro de reactividad del anticuerpo monoclonal

A.III. LINEA DE MIELOMA

A.III.a: Problemas iniciales y características deseables:

Inicialmente se realizaron fusiones con líneas de mieloma que producían cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas. Bajo estas condiciones el hibridoma podía producir 10 distintas moléculas de inmunoglobulina, y el anticuerpo específico comprender solamente 1/16 del total de inmunoglobulinas [284, 296]. Por lo tanto, el término monoclonal es inapropiado para describir tal mezcla de anticuerpos, incluso aunque la célula sea monoclonal [296].

Por técnicas de selección se obtuvieron líneas celulares no productoras de inmunoglobulinas propias. No obstante, se pueden desear combinaciones artificiales, con lo cual se necesitan mielomas productores [101]. Esto puede ser útil para la producción de moléculas híbridas que contengan dos sitios de unión diferentes. El empleo de estos anticuerpos bi-específicos puede ser muy útil y ventajoso en diferentes ramas de la biología y la medicina, como la inmunohistoquímica [177]. Estos anticuerpos biespecíficos pueden conseguirse al fusionar dos líneas híbridas secretoras (híbrido-hibridomas) [253, 263] o una línea híbrida con linfocitos [263].

Una buena línea es aquella que cumple los siguientes requisitos [50]:

- * soportar la producción de anticuerpos y no secretar inmunoglobulinas propias
- * tener una elevada frecuencia de formación de hibridomas
- * poder ser clonada efectivamente y crecer con rapidez
- * poseer marcadores bioquímicos dominantes y recesivos fácilmente seleccionables
- * producir hibridomas con cariotipos y fenotipos estables

A.III.b: Técnicas de selección de hibridomas:

Existen diversas técnicas de selección que servirán tras la fusión para eliminar los componentes celulares no deseados. Estos métodos son [284]:

A.III.b.1: Selección por ouabaina: el crecimiento celular en cultivo puede ser inhibido por la ouabaina que es un inhibidor específico de la ATP-asa, responsable del transporte activo de los iones potasio hacia el interior de la célula y de la extracción de los iones sodio. La sensibilidad de las diferentes especies celulares no es la misma (las células de ratón lo son menos que las humanas). Este fenómeno se usó tras fusionar células de mieloma de ratón con linfocitos humanos transformados por EBV. Las células humanas, más sensibles, mueren en un medio selectivo que contenga ouabaina. También se han seleccionado células mutantes resistentes a la ouabaina de líneas estables usadas para las hibridaciones.

A.III.b.2: Selección por aminopterina/ametopterina: se han seleccionado otros mutantes haciendo crecer células en 8-azaguanina y 6-tioguanina. Mediante la acción de estas drogas obtenemos células deficientes en la enzima Hipoxantina-Guanina-Fosforribosil-Transferasa (HGPRT), pues aquellas que no lo son incorporan en su DNA la droga y mueren. Esta enzima está codificada a nivel del cromosoma X y participa en la ruta de salvamento de los nucleótidos [11]. Estas células HGPRT (-) morirán en presencia de aminopterina [164, 165], ya que es un poderoso inhibidor de la dihidrofolato reductasa, enzima implicada en la síntesis del DNA celular. La vía de salvamento depende de las enzimas Timidina Quinasa y HGPRT. Por lo tanto si a la célula se le provee con timidina e hipoxantina, se podrá sintetizar DNA siempre que ambas enzimas estén presentes, ya que si una de ellas desapareciese la síntesis de DNA sería imposible que se produjera. Tras la fusión ambas enzimas son aportadas por el linfocito.

Algunos autores son partidarios del uso de metotrexato,

compuesto perteneciente a la familia de la aminopterina, a la cual sustituye con ventaja ya que no es fotosensible como aquella y su toxicidad es menor. Además, los híbridos se desarrollan de manera más rápida con lo cual se pueden procesar más tempranamente, detectándose antes los clones positivos [123].

La obtención de células HGPRT (-) es muy sencilla al estar codificada por un gen en el cromosoma X. Las células de mamíferos poseen solo un cromosoma X activo y por lo tanto sólo es necesaria una mutación para obtener como resultado la pérdida total de la enzima [111]. Los Timidina Quinasa (-) son mucho más difíciles de conseguir porque se necesitan dos acontecimientos muy raros de forma simultánea, y además no todas las células tioguanina resistentes son sensibles al HAT [111].

A.III.b.1: Selección mixta: cuando se usan dos líneas celulares para una fusión, es necesario un nuevo sistema de selección. Una de las células madres debe ser HGPRT (-) y resistente a una concentración de ouabaina. Cuando este mutante se fusiona con otra célula sensible a la misma o mayor concentración de ouabaina, los híbridos resultantes son capaces de crecer en el medio HAT (Hipoxantina-Aminopterina-Timidina) con ouabaina. Las células no fusionadas morirán por alguna de sus carencias. [148].

A.III.b.4: Selección por azaserina: un cuarto mecanismo de selección se basa en aprovechar la deficiencia en la enzima Adenina-Fosforribosil-Transferasa (APRT) codificada por el cromosoma 8. Cuando estas células se cultivan en un medio selectivo con azaserina se inhibe la síntesis "de novo" de los nucleótidos puricos. La línea celular FOX-NY (aislada de un mutante espontáneo de la línea NS-1), es un doble mutante carente de las enzimas HGPRT y APRT. Tras fusionar las células de mieloma con células de bazo de la cepa de ratones 588r que posee una translocación cromosomal entre los cromosomas 8 y 12, las células de mieloma no fusionadas morirán en un medio selectivo que contenga aminopterina o azaserina. Cuando el medio selectivo contiene

hipoxantina, aminopterina y adenina, los hibridomas sobreviven. Se obtiene un mayor número de hibridomas cuando la selección se realiza por la vía APRT que cuando se efectúa por la vía HGPRT siendo también más estables. Además, la selección por HAT pueden eliminar los hibridomas que hayan perdido el cromosoma X esplénico que codifica el locus activo HGPRT [264].

Aquí las mezclas celulares de fusión se cultivan en un medio que puede ser utilizado sólo por las células APRT (+). Esto conlleva la eliminación del mieloma APRT (-) no fusionado y de los híbridos APRT (-) (no productores de anticuerpos) producidos por segregación del cromosoma 8.12. Esta translocación contiene los genes APRT y el gen de la cadena pesada activa [264], ya que los hibridomas que sobreviven a la selección necesariamente deben retener el cromosoma esplénico que contiene el locus activo de la cadena pesada, puesto que en este sistema los loci APRT e Ig están genéticamente unidos.

La estabilidad genética de los hibridomas depende en parte de la línea de mieloma usada en la fusión. La estabilidad genética de hibridomas producidos con hibridomas o híbrido-hibridomas, puede ser inferior a los obtenidos a partir de líneas de mieloma [216].

A.III.c: Líneas de ratón:

Las líneas de mieloma de ratón proceden de la estirpe BALB/c [284], siendo las más usadas:

- * Sp2/O-Ag 14 [241]
- * X63-Ag 8.653 [136]
- * F(0) [88]
- * P3/NS1/1-Ag4 [142, 144]

Todas provienen del mieloma MOPC-21 y las cuatro son HGPRT (-). Ninguna produce inmunoglobulinas propias y todas fusionan bien.

Todas estas líneas crecen bien en medio de cultivo

RFMI-1640 o en DHEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) con el 5-15 % de suero fetal bovino. La línea F(0) también puede crecer en suero de ternera recién nacida o suero de caballo, aunque, parece ser, que estos sueros alternativos pueden originar cambios en algunas de las propiedades celulares [3].

Las células de mieloma HGPRT deficientes se pueden mantener en medio con 8-azaguanina o 6-tioguanina [296], para así realizar una selección continua contra las formas que han revertido a positivas. Los dos subcultivos previos a la realización de la hibridación han de realizarse en medio sin agente selectivo [216], aunque esto se puede realizar dando un pase en medio con estas sustancias a intervalos de tiempo prudenciales.

A.III.c.1: Condiciones de cultivo: en cuanto al cultivo de estas líneas celulares, así como de los híbridos obtenidos, el principal problema radica en la necesidad de mantener unas estrictas condiciones de esterilidad (desde el utillaje empleado para el cultivo, hasta los aparatos necesarios para el mismo, como es el caso de la estufa de CO₂) [14], como es norma general con los cultivos celulares.

A.III.c.1.1: Contaminantes: entre los contaminantes habituales de los cultivos celulares destacan sin lugar a dudas los mohos, levaduras y micoplasmas [101]. Estos últimos son los más peligrosos ya que su crecimiento no crea turbidez aparente [103] y son responsables de un amplio rango de efectos biológicos, bioquímicos e inmunológicos [244]. Aunque la mayoría de los métodos de detección de micoplasmas no son fácilmente adaptables al análisis rutinario en los laboratorios de inmunología celular, por su complejidad [244], con unas buenas condiciones de trabajo, las contaminaciones no deben ocurrir.

El que un cultivo (tanto de células de mieloma como de híbridos) se haya contaminado, no quiere decir que este se haya perdido, ya que al inocularlo intraperitonealmente en un ratón previamente tratado con prista-

no [76] o Adyuvante Incompleto de Freund [190], se pueden recoger de la ascitis producida células libres de contaminación, y, por supuesto, viables. Según Garrity et al. [103] este sistema es preferible a la utilización de antibióticos en el medio de cultivo, ya que estos tienen efectos nocivos sobre ciertos cultivos celulares.

A.III.c.1.2: Suero, problemas y alternativas: como hemos citado anteriormente, el medio de crecimiento base (por ejemplo DMEM) se suplementa con un 5-15 % de suero fetal bovino, bien con el complemento inactivado o sin inactivar, ya que esto no siempre es necesario [101].

El suero es una mezcla compleja de varias proteínas y nutrientes, algunos de los cuales pueden ser esenciales para el crecimiento celular, siendo muy difícil distinguir entre los efectos de los factores nutricionales no específicos y aquellos factores reguladores específicos [115]. La composición exacta del suero depende de la fuente y del lote, siendo ésta raramente constante [266]. Por ello se debe testar cada lote de suero [101], ya que el efecto sobre el crecimiento de los híbridos a altas diluciones varía mucho de uno a otro.

Una alternativa posible es la de emplear suero barato en cultivos a gran escala y emplear Suero Fetal Bovino (Fetal Calf Serum) (FCS) en situaciones límite (tras fusionar y al clonar), aunque el cambio de un suero de buena calidad a otro peor debe realizarse de forma gradual [111].

Muchos autores han descrito medios sin suero, capaces de soportar tanto el crecimiento de células de mieloma como de hibridomas. Naturalmente ninguno de estos medios es exactamente igual a otro; así, Murakami et al. [191] describen un medio suplementado con insulina, transferrina, fosfoetanolamina y selenio (siendo la fosfoetanolamina el estimulante del crecimiento a una concentración de 200 μ molar), aunque la fosfoetanolami-

na se sustituye eficazmente por etanolamina a una concentración 10 veces menor (por lo que concluyeron que este último era el factor esencial). También se ha definido un medio totalmente libre de proteínas [60].

Estos medios sin suero presentan una serie de ventajas con respecto a aquellos que sí lo llevan. Se eliminan los complejos efectos del suero en los estados tempranos de crecimiento de los híbridos [135], así como se facilita el aislamiento de los híbridos productores de anticuerpos de interés. El suero puede inhibir la secreción de anticuerpos monoclonales, aunque si bien la secreción es mayor en medios sin suero, el grado de crecimiento es menor [266]. Por otra parte los medios sin suero permiten el estudio de hibridomas productores de anticuerpos frente a los componentes del suero, cuya presencia en los medios convencionales interfiere los procedimientos de análisis. Por último, la purificación de anticuerpos monoclonales se simplifica con la utilización de medios carentes de suero [134, 147]. Incluso la terapéutica humana y las aplicaciones clínicas de los anticuerpos monoclonales se ven limitadas por las inmunoglobulinas de origen animal presentes en los medios con suero [266]. En todo caso posee una ventaja adicional, cual es la economía de estos medios, sobre todo en los casos de cultivo en gran escala [147].

A. III. d: Líneas de rata:

La primera línea de rata utilizada fue la 210-R CY3-Ag1 [102], derivada de la cepa de ratas LOU. Esta línea secreta cadenas kappa pero no cadenas pesadas. Más tarde se obtuvo una línea totalmente no productora tras fusionar la anteriormente citada línea con células esplénicas de rata AO [101].

Los principales estudios en el campo de la producción de anticuerpos monoclonales de rata han sido realizados por el grupo de Bazin [15, 16, 17, 18, 33, 59, 67, 121, 223], aunque existen otros grupos que trabajan en este campo [75].

A.III.e: Líneas humanas:

En cuanto a las líneas de mieloma humanas existen mayores dificultades, como es obtener líneas no secretoras de inmunoglobulina y que sean a la vez HGPRT negativas. Otros inconvenientes son el bajo grado de crecimiento y baja frecuencia de hibridación que presentan [50, 242], y posible presencia de genes del virus Epstein Barr (EBV) capaces de transformar las células B no transformadas [50]. Las líneas humanas más usadas son la FU-266 y la RPMI-8226. No obstante el encontrar una buena línea de mieloma humana tal vez sea cuestión de tiempo [111].

Si se recurre a fusionar linfocitos humanos con líneas de mieloma de ratón, los hibridomas formados segregan principalmente cromosomas humanos [50, 141, 226] lo que implica frecuentemente un cese en la producción de anticuerpos. Schwaber y Cohen [237] fueron los primeros en producir inmunoglobulinas humanas de forma continuada al inmortalizar un linfocito humano fusionándolo con mieloma de ratón secretor de IgA.

A.III.f: Otras consideraciones:

Como ya hemos señalado en el apartado anterior, no sólo se realizan fusiones entre células de la misma especie. Con células de mieloma de ratón se han fusionado linfocitos de otros orígenes: bovino [114, 252], criceto [230], conejo [291], rata [179], rana [119], etc. Todas ellas tienen los inconvenientes propios de los hibridomas interespecies, principalmente la pérdida preferencial de ciertos cromosomas, como ocurre en los híbridos hombre-ratón y conejo-ratón, en los cuales se eliminan los cromosomas humanos y de conejo [230], fenómeno que no es frecuente en los hibridomas rata-ratón.

A.IV. INMUNIZACION

Normalmente se utilizan ratones de la estirpe BALB/c

singénicos con las líneas habituales de mieloma. A parte de esta razón no existe ninguna otra para que no se empleen otras estirpes de ratones [14].

Existen tres tipos fundamentales de inmunización [284]:

A.IV.a: Inmunización "in vivo":

Es la más frecuentemente utilizada, aunque presenta el inconveniente de su habitual larga duración [79]. Se trata de la recogida del bazo de ratones inmunizados a los 3-4 días de la última inyección de antígeno [14]. Su finalidad es la de inducir la división de células B, ya que las células activadas recientemente (probablemente en división), se fusionan preferencialmente con respecto a las células B no activadas [5, 111].

La elección del protocolo de inmunización depende del antígeno a utilizar y del laboratorio. Algunos sólo aplican una inyección de antígeno, pudiendo ser recogido el bazo 5-6 días después de la misma.

Se pueden utilizar antígenos purificados, antígenos químicamente modificados o antígenos sintéticos. La pureza del antígeno es en sí misma irrelevante, pero comienza a ser importante si el material impuro da respuestas específicas débiles o el método de ensayo no distingue entre anticuerpos frente al componente específico y frente a las impurezas. Además, hay que tener en cuenta que algunos antígenos son inmunodominantes y dan respuestas inmunes incluso cuando sólo están presentes en cantidades traza [101].

Para muchas experiencias hay que elegir entre la utilización de antígenos purificados o sin purificar. Debe decidirse entre gastar tiempo purificando el antígeno y obtener hibridomas específicos fácilmente o perder el tiempo buscando un hibridoma que produzca el anticuerpo deseado de los cientos posibles [14].

Eager y Kennett [78] proponen la realización de la

inmunización con los complejos antígeno-anticuerpo obtenidos al precipitar el antígeno deseado por medio de un suero específico; de esta manera el antisuero convencional "purifica" el antígeno. Naturalmente, los hibridomas deben ser analizados frente al inmunocomplejo y frente al suero.

La respuesta inmune puede mejorarse emulsionando los antígenos en adyuvante tales como el Completo o el Incompleto de Freund. Cuando se realiza una inmunización muy larga es conveniente dejar periodos de reposo prolongados, obteniéndose así anticuerpos de mayor afinidad [277]. La hiperinmunización es contraproducente para la obtención de una alta especificidad [13, 203]. No obstante la respuesta a la inmunización es un proceso que la mayoría de las veces es muy difícil de controlar [79]. La mayoría de los protocolos de inmunización que requieren varias inoculaciones tienen en común una inyección final que se realiza 3-4 días antes de proceder a la fusión mediante la administración intravenosa del antígeno [284].

Sigue siendo difícil obtener hibridomas productores de IgA específicos mediante inmunización [61]. Sin embargo, algunos protocolos los generan con cierta frecuencia [223].

Realizando la inmunización por vía intraesplénica se puede llevar a cabo la fusión tan sólo 3 días después de la inoculación de una única dosis del antígeno [106, 250, 251] con lo que se abrevia en gran manera el periodo de producción de anticuerpos monoclonales. La inmunización intraesplénica tiene una serie de ventajas, a parte de su corta duración: requiere una baja cantidad de antígeno (20 μg ó 2.5×10^5 células), se maximiza el número de células B específicas en el bazo por estimulación antigénica local, mientras que se minimiza la eliminación de antígeno en otras partes del cuerpo (como ocurre en otras vías de inmunización) [251]. Por este método se obtienen IgM e IgG, con mejores resultados que por otras vías convencionales [251].

Los linfocitos humanos se obtienen de sangre periférica (10^6 linfocitos/ml, de los cuales el 20% son de tipo B) lo que no es la elección ideal [127]. La mayoría de los anti-

cuerpos monoclonales obtenidos siguiendo una inmunización activa en voluntarios, lo son contra bacterias y virus, aunque muchos han sido obtenidos siguiendo una infección natural o por exposición inadvertida frente a los inmunógenos [127]. Por supuesto es inviable la inmunización con células cancerígenas o siempre que los fragmentos subcelulares puedan transmitir la infección o producir una enfermedad neoplásica [242]. Por otro lado casi todos los híbridos generados utilizando linfocitos de personas con una enfermedad activa, son productores de anticuerpos contra células tumorales y varios autoantígenos [127].

A.IV.b: Inmunización "in vitro":

Esta técnica fue aplicada por primera vez para la producción de anticuerpos monoclonales por Hengartner et al. [119]. La metodología y avances en este campo fueron recopilados por Reading [216].

Este tipo de inmunización se realiza cultivando "in vitro" el bazo macerado de un ratón no inmunizado durante 3-10 días en presencia del antígeno. Brams et al., [40] proponen la inmunización con bajas cantidades de antígeno ($<1\mu\text{g}/10^8$ cel), durante un periodo de inmunización no mayor a 9-10 días, ya que después se produce una gran caída en la viabilidad de los linfocitos B. Con estimulación de 5 días se obtienen híbridos productores de IgM y con 8 días se aumenta la secreción de IgG [265]. Cuando se alarga el periodo de cultivo, la densidad celular y el contenido del medio parecen ser críticos. Si alguno de estos puntos no es óptimo se observa una muerte celular significativa en vez de propagación clonal y/o diferenciación de los linfocitos estimulados [265]. También es importante la concentración de antígeno para realizar una buena inmunización "in vitro" [265].

El medio que contiene suero de mamífero (salvo el de conejo) posee un factor inmunosupresor que inhibe la inmunoestimulación "in vitro" [278].

La estimulación *in vitro* tiene la ventaja de economía en términos de tiempo [216, 265] y cantidades de antígeno requerido [265]. Además, se pueden mantener concentraciones definidas de antígeno durante todo el periodo de inmunización y analizar los efectos de diversas monoquinas y linfoquinas a concentraciones definidas y, también, es posible tomar muestras periódicas del mismo cultivo durante el curso de todo el experimento [216]. Por otro lado evitamos las desventajas de la inmunización "in vivo", que pueden producir un fallo en la misma, fallo que puede ser debido al fenómeno de la tolerancia, a una respuesta selectiva para uno o unos pocos de los componentes de la suspensión inmunizante, a la baja concentración de las células deseadas si se emplean bajas dosis de inmunógeno o a que si se emplean moléculas poco inmunógenas se debe recurrir al empleo de adyuvantes, los cuales pueden provocar una activación policlonal de células B [217].

Como desventajas presenta unos bajos niveles de formación de hibridomas y la producción de anticuerpos monoclonales casi exclusivamente de la clase IgM [265].

La inmunización "in vitro" de linfocitos humanos entraña más dificultades que en ratón [127]. Quizás esto sea debido a que los estudios han sido realizados usualmente con sangre periférica, donde existe una relación desfavorable entre las células T supresoras y células B, o que las células B circulantes se encuentran en una fase en la cual se necesita un estímulo adicional para inducir una activación clonal antígeno-específica [Borrebaeck, 1986, citado en 127].

A.IV.c: Aumento de la frecuencia de células B específicas mediante la técnica denominada "Adoptive-Transfer":

Consiste en la inoculación de células de bazo de un ratón inmunizado, inmediatamente después de la dosis final de antígeno realizado 4 días antes de la fusión en un ratón irradiado subletalmente. Las células de bazo son inoculadas por vía intravenosa y ese mismo día, o algunos días más

tarde, se inocula el antígeno intraperitonealmente [138, 145], actuando este segundo ratón como un incubador viviente, siendo su bazo una buena fuente de células para la fusión [271]. Con este sistema de inmunización "in vitro" se obtienen un incremento entre un 10 y un 80% en el número de hibridomas secretores de inmunoglobulinas específicas [95, 138].

A.IV.d: Fusión con células esplénicas o células de sangre periférica sin preinmunización:

Este método es válido cuando estas células se recogen de pacientes con algún proceso patológico. Dichas células pueden ser fusionadas para obtener híbridos humano-humano o humano-ratón. No obstante se han obtenido anticuerpos monoclonales con un rango de especificidades interesantes empleando linfocitos de individuos sin una previa exposición al inmunógeno en cuestión o historial de enfermedad [127].

A.V. FUSION

La fusión de las membranas plasmáticas resulta en la formación de heterocariones (cuando se fusionan células de distinto origen) u homocariones (por fusión de células idénticas). Por lo tanto uno o más núcleos de cada tipo quedarán incluidos en un citoplasma común. Una célula híbrida se forma cuando el proceso de crecimiento y división se lleva a cabo en el heterocarión, y los materiales genéticos de los dos tipos están incluidos en un único núcleo de la célula proliferante [137]. Esta célula híbrida es denominada sincarión [13]. No obstante, un heterocarión puede permanecer viable sin dividirse durante muchas semanas, siempre que las condiciones sean favorables [285].

Ahkong et al. [2] sugieren que la fusión celular provocada por agentes químicos exógenos incluye dos acontecimientos sucesivos:

- * perturbación de la estructura bicapa lipídica de la membrana, lo que incrementa la fluidez de la zona

lipídica

+ la interacción y mezcla de las moléculas lipídicas alteradas de células adyacentes, en regiones sin las proteínas intramembranasas y glicoproteínas, permiten la fusión.

La fusión es un acontecimiento raro incluso si se facilita con un agente externo [111]. Si tras realizar una suspensión de aproximadamente 10^8 células de bazo con 10^8 células de mieloma no se añade ningún agente fusionante, tan sólo 1 de cada 10^7 células de bazo hibridará espontáneamente.

Las células de bazo incluyen eritrocitos, células de tejido conectivo, macrófagos y linfocitos B y T [88]. Mourik *et al.*, [187] y Mourik y Zeijlemaker [188] son partidarios de separar los linfocitos del resto de las células del bazo por centrifugación en gradiente de Percoll. Esto supone tan sólo 1 hora más de trabajo extra antes de la fusión y la eficiencia de la misma y la frecuencia de hibridomas secretores se ve incrementada en comparación con las fusiones realizadas con células esplénicas sin fraccionar, evitándose también el sobrecrecimiento de los híbridos por macrófagos, fibroblastos y células P [187]. A esto se opone Fazekas [88], quien no está a favor de separar los linfocitos ya que se trata de un manejo más, que incrementa el riesgo de contaminación se ve incrementado y no aumenta mucho la eficacia de la fusión. Otros autores optan por eliminar eritrocitos, aunque normalmente no se considera necesario [111], no obstante, al eliminarlos se aumenta la frecuencia de contacto entre linfocitos y mieloma [296].

A.V.a: Agentes fusionantes:

A.V.a.1: Primeros agentes: inicialmente [143] realizaron experiencias utilizando como potenciador de fusión el virus Sendai inactivado (Virus perteneciente al grupo de los Mixovirus).

Además del virus anteriormente citado, se utilizaron

otros agentes como la tripsina y la lisolecitina, comprobándose en los tres casos que no se formaban bajo su acción más híbridos que los que aparecían espontáneamente [170].

A.V.a.1: PEG: la mayoría de las fusiones son realizadas hoy día bajo la acción del Polietilenglicol (PEG), ya que se ha comprobado que mediante el empleo de este producto, se incrementa en 100 veces el número de híbridos formados [107]. El PEG es un poderoso deshidratante cuya acción probablemente es debida a que en ausencia de agua libre la bicapa lipídica de la membrana celular se desorganiza, siendo el resultado final del proceso el intercambio de material entre dos células. A medida que se rehidrata las células adoptan la forma esférica por ser esta la más estable. El problema estriba en que si la penetración de líquido al interior de la célula es demasiado rápida, la célula se rompe. Por lo tanto, se considera que la verdadera fusión no corresponde al PEG sino a la rehidratación consiguiente [171]. Elegir el protocolo de rehidratación adecuado es importantísimo para obtener un porcentaje de fusión alto.

El PEG es tóxico para las células, por lo que es fundamental el elegir la concentración óptima de PEG y su Peso Molecular, así como el tiempo de exposición de las células frente a este agente. Además las condiciones de la técnica varían mucho de unos lotes de células y PEG a otros [11, 152, 111]. En lo que concierne al tiempo de exposición, se ha observado que si éste es corto (45 segundos a 37°C) frente a la mezcla fusionante (5 ml de PEG 1450, 0.5 de Dimetil Sulfoxido y 4.5 de PBS pH7.0), se incrementa en 5 veces el número de híbridos producidos usando Sp2/O, y en 30 en el caso de la línea FOX-NY [150]. Un tiempo de exposición largo, no sólo no incrementa la eficiencia de la fusión, sino que la disminuye, tal vez debido a que bajo la presencia del fusógeno las células fusionan rápidamente, con lo que exposiciones más largas sólo sirven para incrementar los efectos citotóxicos del mismo sobre los híbridos recién formados [151].

La concentración óptima de PEG es del 30 a 50% (a mayor

concentración mayor toxicidad y si es muy baja la frecuencia de la fusión se ve muy disminuida), mientras que el peso molecular depende de la técnica empleada [284]. Otro factor importante en la obtención del máximo número de híbridos es el pH de la solución de PEG [240]. El máximo número de clones se obtiene cuando el pH oscila entre 8.0 y 8.2 [240, 284].

El PEG se puede contaminar con aldehídos tóxicos debido casi siempre a un mal almacenamiento. El sistema clásico de esterilización de la solución de PEG por autoclave puede incrementar los niveles de aldehídos, mientras que la esterilización por filtración aumenta marcadamente los resultados de la fusión [130].

Además de todos los factores anteriormente citados se han estudiado otros que influyen negativamente en la acción del PEG. Mateo et al. [171] hacen una relación de ellos.

A.V.a.3: PEG + DMSO: algunas veces, como ya se ha citado anteriormente, se añade Dimetilsulfóxido (DMSO) a la solución de PEG, comportándose éste como agente fusionante cuando el periodo de incubación es largo, pero no cuando este es corto. Fazekas y Scheidegger [91] no observan un aumento en el número de híbridos al añadir este producto a la mezcla fusionante, aunque es adecuada su presencia si la rehidratación posterior a la fusión se realiza de forma excesivamente rápida, ya que el DMSO protege a las células de los daños osmóticos producidos por el PEG.

No obstante, estos métodos clásicos de fusión, poseen una serie de desventajas, como son:

- * las condiciones fisiológicas en que se produce pueden influir negativamente en la viabilidad de las células fusionadas [294]
- * las sustancias o virus empleados como promotores de la fusión pueden crear cambios irreversibles en la membrana [294]
- * el rendimiento de híbridos de alta especificidad es normalmente muy bajo [11, 167]

* los métodos de fusión no están estandarizados y son optimizados por el método de la prueba y el error [294].

A.V.b: Electrofusión:

Zimmerman et al. [294] han descrito un método de fusión totalmente diferente al hasta ahora explicado. Se trata de inducir la fusión bajo un campo eléctrico, hecho que proporciona la ventaja de que la fusión se realiza exclusivamente bajo condiciones fisiológicas.

Si las membranas celulares o membranas artificiales lipídicas son expuestas a un campo pulsátil de suficiente fuerza (0.5-7 kilovatios/cm) y corta duración (de nano a microsegundos), se produce en las mismas una rotura local [293, 294, 295], asociada a una alteración en la membrana de la célula [294], y surge una fusión en la zona de contacto entre dos células [294]. Esta técnica consta de dos pasos fundamentales:

- * las membranas de las células a fusionar se aproximan por electroforesis
- * los agregados resultantes se fusionan por rotura eléctrica

Otras ventajas de este método son el poder seguir el proceso de la fusión bajo el microscopio, con lo que los híbridos resultantes pueden ser fácilmente identificados. Además, empleando esta técnica, el uso de líneas de mieloma deficientes deja de ser necesario [284].

Este método puede hacerse más eficaz, como veremos en el apartado siguiente.

A.V.c: Fusión selectiva:

Además del método eléctrico, se ha descrito otro sistema que evita la fusión no selectiva, como ocurre convencionalmente. Así, cuando se emplean técnicas tradicionales, incluso bajo condiciones óptimas, el porcentaje final de

híbridos secretores de anticuerpos deseados es normalmente bajo [11]. Teóricamente, esto se puede evitar uniendo las células de mieloma con los linfocitos secretores de anticuerpos específicos interponiendo antígeno entre ambas células. Este método ha sido descrito por Bankert et al. [11], y consiste en incorporar a la membrana de las células de mieloma el antígeno, empleando un lipopolisacárido sintético. El porcentaje de híbridomas antígeno específicos es más alto que el observado con las técnicas habituales de fusión (12-26 % más) [11]. Este método puede ser combinado o no con el empleo de PEG [11].

Lo et al. [167] han demostrado que la electrofusión mieloma-linfocito puede restringirse selectivamente para incluir sólo esplenocitos activados portadores de inmunoglobulinas de superficie. Así el antígeno ligado covalentemente a la avidina se une a las inmunoglobulinas de superficie que poseen las células B. Este complejo célula B-Ag-Avidina se unirá a la biotina que ha sido previamente ligada de forma covalente a la superficie de las células de mieloma. Por este método, todos los híbridomas secretan anticuerpos con alta afinidad por el inmunógeno. Sin embargo, dos aspectos impiden su uso pleno: las cantidades de antígeno unidos covalentemente a la avidina deben ser limitadas, y la modificación covalente de la avidina altera sus propiedades de unión a la biotina, debiendo aislarse los complejos inmunógeno-avidina activos mediante cromatografía imino-biotina [290].

Wojchowski y Sytkowski [290] describen un método que obvia la necesidad de una modificación covalente de la avidina, uniendo la biotina al inmunógeno y al mieloma.

A.VI. SELECCION DE LOS HIBRIDOS MIELOMA-LINFOCITO

Tras la realización de la fusión tenemos una población celular muy variada, dentro de la cual encontraremos:

- * células de mieloma no fusionadas
- * células de bazo no fusionadas

- * fusiones mieloma-mieloma
- * fusiones linfocito-linfocito
- * híbridos mieloma-linfocito, con dos subpoblaciones (una de ella secretora de anticuerpos de interés para nosotros y otra no secretora de dichos anticuerpos)
- * híbridos mieloma-macrofago: se trata de una población muy peligrosa ya que secretan una serie de sustancias que provocan supresión en la producción de anticuerpos [292].

Nada más realizar la fusión, las células se cultivan en un medio selectivo enriquecido con un promotor de crecimiento [284] o sin él. Las poblaciones de células de mieloma no fusionadas serán eliminadas por la acción del medio selectivo debido a su carencia enzimática. La población de linfocitos no fusionados y la de linfocito-linfocito morirán tras 7-10 días de cultivo "in vitro". Por último, los híbridos mieloma-linfocito sobrevivirán ya que el linfocito aporta el enzima necesario para la ruta de salvamento de los nucleótidos.

Durante la incubación de los híbridos deben evitarse fluctuaciones de pH y temperatura, situándose las placas en el incubador lo antes posible. Una vez allí, la puerta de la estufa no debe ser abierta al menos en dos días, ya que cualquier apertura ocasional de la misma durante este periodo retrasa el crecimiento [284]. Así, no es satisfactorio utilizar un incubador con múltiples funciones y que se abra frecuentemente, ya que la temperatura, y sobre todo la cantidad de CO₂, varían de forma brusca.

El posponer la adición de NAT a las 24 horas siguientes a la fusión no hace sino producir un daño importante a las células. Esta apreciación ha sido realizada por Westerwoudt [284] y Fazekas y Scheidegger [91] y Fazekas [88]. Fazekas [88] opina que tampoco es efectivo el aumentar la concentración de aminopterina poco a poco, sino que se debe aportar la concentración definitiva de una sola vez.

Westerwoudt et al., [287] describen las condiciones

óptimas para la formación de hibridomas en cuanto al número de células de bazo utilizadas en la fusión, haciendo notar que el número de hibridomas formado parece depender principalmente del número de células de bazo viables. Barald y Wessells [12] y Fazekas [88] proponen una relación bazo/mieloma (10:1), aunque si la cantidad de mieloma disponible es menor a 10^7 , Barald y Wessells [12] proponen una "minifusión" (variando los volúmenes y el tiempo de exposición frente al PEG). No obstante para Goding [111] no es importante una relación precisa entre bazo y mieloma.

A.VII. ANALISIS DE LOS HIBRIDOS OBTENIDOS

Si se comparan las frecuencias entre el número de hibridomas y el número de híbridos productores de anticuerpos, se ha calculado que hay aproximadamente un productor por cada diez no productores, y uno de cada siete hibridomas productores produce anticuerpos específicos [287]. Se encuentra un mayor número de clones secretores si se emplean bajas densidades de células, siendo lo ideal que no aparezca más de un clon por pocillo [116].

El análisis de los hibridomas indica que al menos el 40 % de los clones productores de anticuerpos desaparecen durante las primeras 3 semanas, además, los hibridomas productores pueden verse enmascarados por el sobrecrecimiento de los híbridos no productores [111], aunque algunos autores muestran su desacuerdo en este punto [116, 287]. Sin embargo, los productos de la fusión son inestables en sí mismos, ya que si una célula diploide de ratón posee 40 cromosomas, el núcleo formado por la unión de dos células tendrá 80 cromosomas, perdiendo algunos de ellos en los primeros días, no siendo dicha pérdida preferencial [296]. Esta eliminación de cromosomas no es un acontecimiento debido exclusivamente a la utilización de células de distinta especie, sino que también depende en gran manera de las líneas empleadas, independientemente de su origen [285].

La inestabilidad de los híbridos se cree que es debida a un acúmulo de células portadoras del genoma de la célula

tumoral con solo parte de los cromosomas del linfocito [327]. No obstante, parece ser que tras un periodo inicial de inestabilidad, los hibridos raton x raton (no los inter-especie) se hacen tan estables como el mieloma del cual proceden [100]. Sin embargo es realista esperar que el 50-70% de todos los pocillos que inicialmente eran positivos pierdan la producción [111]. Los clones individuales muestran estabilidades muy diferentes. Los HLGK (los que secretan las cuatro clases de cadenas de Ig) parecen ser menos estables [100].

Teniendo en cuenta todo esto, deducimos la necesidad de un metodo sencillo y fiable que nos facilite el laborioso proceso del analisis periodico de los hibridos, ya que es la llave del exito de la producción de hibridomas y la parte que ocupa más tiempo [111]. El ensayo debe ser sensible, reproducible, especifico, rápido y adaptable a su utilización en gran escala [193].

No todos los ensayos son directamente aplicables a los anticuerpos monoclonales por dos razones [101]:

- * la concentración de anticuerpo monoclonal en el cultivo tisular es mucho más baja que en un suero hiperimmune
- * los inmunoensayos tradicionales requieren frecuentemente el reconocimiento polivalente de antígeno.

Teniendo esto en consideración es posible adaptar cualquier inmunoensayo para detectar anticuerpos monoclonales bien en el medio de cultivo o en el microambiente que rodea a la célula.

En un principio la técnica utilizada se basaba en la formación de placas hemolíticas, tratando de detectar anticuerpos en el microambiente de células aisladas o clones que crecen en medio semisólido donde los anticuerpos se difunden muy despacio [142, 143]. Esta técnica tiene varias limitaciones como son la variación en la susceptibilidad de los eritrocitos objeto de la lisis y las dificultades asociadas a la conjugación de los antígenos a dichos

eritrocitos [239, 296]. Gronowicz *et al.* [113] proponen una modificación de la placa hemolítica empleando proteína A unida a eritrocitos. Bankert *et al.* [10] realizan una prueba hemolítica trasladando 2 μ l de sobrenadante de cultivo de los hibridomas que se hayan creciendo en medio líquido a una placa de agarosa con eritrocitos, detectando de esta forma pequeñísimas cantidades de anticuerpos.

Hoy en día, las técnicas más frecuentemente empleadas se basan en la observación de Catt y Tregear [55] de que las proteínas se unen estrechamente a las superficies plásticas. La facilidad con que la mayoría de los antígenos solubles pueden ser insolubilizados por la simple absorción al plástico de placas de 96 pocillos ha hecho muy populares estos métodos [200], aunque el análisis en fase sólida puede ocasionar falsos negativos si el determinante antigénico se altera en el proceso de adherencia al plástico [178].

Los sistemas de detección más comúnmente empleados son ELISA, RIA e inmunofluorescencia. Los dos primeros son sensibles pero requieren sucesivos tapizados de cada pocillo con antígeno, sobrenadante del cultivo y segundo anticuerpo marcado, con enzima en el caso del ELISA [233], siendo más sensible y específico el ELISA doble "sandwich" que el "sandwich" para la detección de anticuerpos monoclonales [186, 193].

La detección de anticuerpos monoclonales frente a proteínas asociadas a membrana presenta un problema especial debido a los efectos surfactantes de los detergentes no-iónicos usados para solubilizar los antígenos de membrana, que pueden retardar o impedir la unión proteica a los pocillos de poliestireno [85, 200]. Además, los procesos de extracción o fijación no sólo exponen los antígenos intracelulares sino que también pueden alterar la configuración estructural de los antígenos de membrana. De esta forma, es posible que los anticuerpos monoclonales construidos con la configuración "in vivo" con células completas vivas, puedan no reconocer la alterada en el análisis "in vitro" [261]. Se han descrito diversos tipos de

ELISA destinados a estos antígenos poco solubles [85, 200, 261].

Ya hemos señalado anteriormente que el RIA es una técnica muy empleada en la detección de híbromas productores, aunque posee la gran desventaja de la corta vida media de los productos marcados, aparte de la complejidad inherente al manejo de sustancias radiactivas. Sechman *et al.* [44], comparan esta técnica con una variante de ELISA que utiliza proteína A, la cual, a parte de no poseer las desventajas del RIA y poseer las del ELISA, permite el tapizado con una baja cantidad de antígeno sin una reducción aparente de la sensibilidad, incrementándose además la versatilidad del sistema, ya que puede ser utilizado con híbromas preparados con células de diversas especies. No obstante, el empleo de proteína A en cualquier inmunoensayo tiene el gran inconveniente de unirse muy pobremente a ciertas Ig de ratón [86].

A.VIII. CLONACION

No se puede garantizar que aunque tras la fusión aparezca una única colonia en un determinado pocillo, ésta sea monoclonal. Cuando hay dos colonias y se intenta retirar cuidadosamente una de ellas, puede producirse una mezcla de células. Además, es necesario evitar el sobrecrecimiento de colonias irrelevantes que impidan el desarrollo de las colonias procedentes de híbridos secretores, cuyo desarrollo siempre es más lento. Es por lo tanto esencial clonar todos los cultivos [14].

A.VIII.a: Clonación por dilución límite:

El sistema de clonación más empleado es el de la Dilución Límite. Se lleva a cabo realizando diluciones seriadas de las colonias en placas de 96 pocillos. Algunos autores realizan estas diluciones en HAT [14] para, de esta manera, eliminar la parte de la población que haya revertido. Otros, sin embargo, realizan esta operación en medio HT

[202, 291].-

Gagnon y Raymond [99] describen una clonación por transferencia de una sola célula, método que posee la ventaja de permitir clonar eficazmente una gran cantidad de células, confirmándose la transferencia de una única célula microscópicamente, evitando el solapamiento de colonias. Esta técnica requiere un equipo sencillo, pero por contra exige un elevado manejo.

Este proceso de clonaje debe ser repetido al menos 2 veces más, dispensando una única célula por pocillo y calculando la probabilidad de que la colonia se derive de una sola célula por la fórmula de Poisson [14, 62, 63, 162]. No obstante, en la práctica, estas presunciones estadísticas no permiten asegurar la generación de anticuerpos monoclonales [99, 101]. Es más, sin una detallada inspección visual, es muy difícil asegurar la monoclonalidad (lo que implica mucho trabajo) por más que se aumente el número de pasos de dilución límite y se realicen cálculos estadísticos [162]. Se ha descrito, además, que subclones de híbridos aparentemente estables son heterogéneos con respecto a la cantidad de Ig producida [292].

A.VIII.a.1: Células "Feeder Layer": para evitar la toxicidad del plástico, que puede inhibir el crecimiento de los híbridos trasplantados, se utilizan las denominadas células "Feeder Layer", que se añaden a los pocillos (también se añaden al emplacar la fusión). Estas células también cumplen la función de eliminar los detritus de los híbridos y las células muertas que inevitablemente aparecen al añadir HAT [88, 91, 169]. En cualquier caso el empleo de estas células nada más realizarse la fusión o en la clonación, es un factor importante para favorecer el crecimiento de los hibridomas [43].

Estas células pueden tener diversos orígenes: células de bazo [14, 296], timocitos [5, 74, 202] o células peritoneales [119]. Yarmush *et al.* [291] consideran que la adición de estas células no es necesaria, opinión que comparten Zola y Brooks [296] siempre que las condiciones del experi-

mento sean ideales. El mecanismo de su actuación no es del todo conocido [161, 169], aunque debe ser a causa del aporte de ciertos factores solubles [9]. Lernhardt et al. [161] demostraron que el efecto beneficioso de estas células no depende de la mera acción del número.

A.VIII.a.2: Factores solubles: la iniciación y el mantenimiento de los cultivos se simplifica si las células "Feeder Layer" son sustituidas por factores solubles. Así se evitan problemas como el solapamiento de los híbridos en desarrollo por macrófagos activados, hecho que puede producirse bajo ciertas circunstancias [280, 296]. Mediante el empleo de estos factores se logra que los hibridomas estén libres de células contaminantes [9] y se evita una posible fuente de contaminación microbiana [214].

Se han descrito un gran número de factores solubles que sustituyen eficazmente a las células "feeder": Sobrenadante de Cultivo Endotelial Humano [9, 286], Suero de Cordón Umbilical Humano [286], Acido Carboxietil Gamma-Aminobutírico [56], Medio Condicionado de Timocitos [162, 265, 280], Lipoproteínas de Baja Densidad de Plasma Humano [169], Lipopolisacáridos derivados de la pared celular de varias cepas de Escherichia coli [285] y sobrenadante de cultivo de macrófagos [285].

A.VIII.b: Clonación en medio semisólido:

Otro método empleado es la clonación en agar blando. Los híbridos se cultivan en un medio semisólido, normalmente bicapa, a base de agar, agarosa, etc., y otros componentes que permiten el desarrollo de las células. Una vez preparado el agar estéril, se debe examinar su capacidad para permitir el crecimiento de los clones, generalmente con células mielomatosas [76]. En cuanto los clones son visibles, se recogen individualmente y se traspan a una placa de 96 pocillos, con medio líquido donde se podrá poner en evidencia la producción de anticuerpos [76, 171].

Davis [73] y Davis et al. [74] describen un método de

clonaje en metil celulosa inmediatamente posterior a la fusión, que evita la rutina de los reclonajes, aunque Gagnon y Raymond [99] opinan que clonar en soportes semi-sólidos presenta como inconveniente el difícilmente evitable solapamiento de colonias. Además, puede producir un daño térmico a los hibridomas [57] y no asegura la monoclonalidad al no haber ningún modo para confirmar si la colonia ha sido originada por una o más células [34].

El clonar por dilución límite tiene la ventaja de que el análisis se puede realizar directamente, mientras que en agar es necesario pasar previamente a medio líquido [111], hecho difícil en ciertos casos [57], aunque en muchas ocasiones las colonias productoras pueden ser identificadas por técnicas hemolíticas [144].

A.VIII.c: FACS:

El método de clonación más reciente es el que emplea el FACS ("Fluorescence Activated Cell Sorter"), que está basado en la separación de células por la fluorescencia específica que presentan al producir un determinado anticuerpo tras añadir un conjugado de antígeno e isotiocianato de fluoresceína a la suspensión celular. Las células secretoras son depositadas a continuación sobre el pocillo adecuado de la placa de cultivo de forma automática; con lo que se clona y se selecciona a la vez [296]. Esta técnica se emplea, por ejemplo, en la selección de híbridos secretores de anticuerpos biespecíficos [132].

A.IX. EXPANSION DE LOS CLONES Y PRODUCCION DE GRANDES CANTIDADES DE ANTICUERPOS

A.IX.a: Expansión:

Una vez realizado el proceso anterior, los clones son trasladados a cantidades crecientes de medio [76]. De las placas de 96 pocillos se pasa a las de 24 y de estas a botellas de cultivo tisular cada vez de mayor tamaño.

A.IX.a.1: Inestabilidad de los híbridos: el grado de mortalidad de los híbridos es máximo durante los dos primeros pases, cuando todavía son genéticamente inestables (30-50 % de mortalidad), dejando muchos de ellos de secretar o muriendo. Tras clonar, no obstante, más del 95 % de las células permanecen estables y viables durante varios pases (tres a seis) [76]. En cuanto a la estabilidad de los híbridos en cultivo continuo hay discrepancia de opiniones; así, unos dan una estabilidad de tres meses (30 pases) [215], mientras que otros han hallado que la estabilidad se alarga en la mayoría de los casos hasta los cuatro o seis meses [217]. En cualquier caso, la estabilidad de los híbridos depende en parte de la línea de mieloma empleada en la fusión [216].

A.IX.a.2: Crioconservación: por todo esto, es necesario congelar los híbridos de interés lo más rápidamente posible. El medio de congelación se prepara a base de DMSO y Suero Fetal Bovino [14, 202] o bien con DMSO y una mezcla de Suero y SGMN [76]. En todo caso, la concentración final de DMSO debe ser del 10% [14, 76, 171, 202].

A.IX.a.2.1: Condiciones de congelación: la cantidad de células a congelar por vial oscila entre 1×10^5 y 1×10^6 células/ml. [76, 202], aunque el número no es un factor crítico [11]. Tras añadir la suspensión células-medio de congelación al vial estéril, este debe ser inmediatamente congelado. La máxima viabilidad celular se obtiene bajando la temperatura 1°C por minuto hasta los -70°C ó -80 °C [160] y luego introduciendo el vial en Nitrógeno Líquido. En vez de bajar la temperatura controladamente 1°C por minuto se pueden dejar los viales 24 h en un arcón congelador de -70°C [14, 202] o someterlos durante este tiempo a los vapores de Nitrógeno Líquido [202] para más tarde en ambos casos, introducirlos en la fase líquida, o bien realizar ambos procesos seguidos antes de pasar a la fase líquida [14].

La descongelación se realiza en un baño de agua a 37°

C, siendo luego rápidamente centrifugado y resuspendido el sedimento en medio normal de cultivo (DMEM más suero). De esta forma más del 90% de las células son viables [14]. Incluso congelando exclusivamente en un arcón congelador a -70°C durante 28 días se pueden recoger hibridomas viables, aunque en este caso pueda haber lotes con una viabilidad muy baja [14], aunque Bartal y Hirshaut [13] describen congelaciones de meses o años con lotes viables.

Todo este proceso es idéntico a la hora de congelar células de mieloma, punto importante para poseer un remanente de células (al igual que de híbridos) en previsión de posibles contaminaciones o accidentes en el cultivo normal.

A.IX.a.2.2: Crioconservación en microplaca: Wells y Bibb [281] y Wells y Price [282] describen un método de congelación de hibridomas directamente en microplacas de cultivo de 96 pocillos obteniendo de esta manera una supervivencia del 95-100 % de los híbridos tras descongelar (congelan primero a -70°C y luego transfieren las placas a nitrógeno líquido). Patel y Brown [207] simplifican este método congelando sólo a -70°C con un límite de almacenamiento de 6 meses.

A.IX.b: Producción en gran escala:

Existen dos métodos para realizar este proceso:

- * cultivo normal de los híbridos
- * inoculación de dichos híbridos en ratón, provocando de esta manera la aparición de un tumor ascítico

Con el primer sistema la concentración de anticuerpos obtenida es relativamente pobre (1-20 $\mu\text{g/ml}$) [102, 171, 202], mientras que en la ascitis es mucho mayor (mil veces más: 10-50 mg/ml) [171], aunque las concentraciones de IgM suelen ser mucho menores [111]. Sin embargo Oi y Herzenberg [202] y Galfré et al. [102] hallan concentraciones menores de anticuerpos monoclonales en ascitis (1-20 mg/ml), siendo

en cualquier caso un medio sencillo para obtener pequeños volúmenes de anticuerpos relativamente concentrados [279].

La concentración del anticuerpo monoclonal en cultivo puede aumentarse considerablemente si no se realimentan los cultivos de hibridomas, incluso cuando el crecimiento cesa o desaparece, y todavía más si los cultivos se incuban en rotación [31]. Es de destacar que con este sistema la concentración del anticuerpo monoclonal aumenta a partir del día 15, cuando prácticamente el 100% de las células están muertas, incrementándose paralelamente la actividad del anticuerpo, que no parece verse afectado por la presumible acción de proteasas celulares.

A.IX.b.1: Medio de cultivo vs. ascitis: la ventaja de la producción de anticuerpos monoclonales "in vitro" radica en que se facilita en gran manera su purificación al ser las únicas inmunoglobulinas de ratón o rata presentes en el medio de cultivo, requiriendo esta técnica, por otro lado, un coste muy bajo en aparatos y una atención casi nula [16].

Por el contrario, la preparación de anticuerpos monoclonales derivada de hibridomas propagados "in vivo" se encuentra con el problema de que contienen una gran variedad de proteínas de ratón [49, 194, 279], siendo la concentración de las inmunoglobulinas contaminantes más del 10% del total de inmunoglobulinas [275], mientras que la propagación "in vitro" ofrece mejores posibilidades para obtener preparaciones de anticuerpos monoclonales libres de inmunoglobulinas de ratón irrelevantes [49]. Desafortunadamente las concentraciones obtenidas son mucho menores que "in vivo" [279].

A.IX.b.2: Producción en cultivo continuo: Fazekas [89, 90] describe un aparato ("Cytostat") que permite mantener los cultivos de hibridomas en crecimiento exponencial, acompañando su grado de replicación con la adición automática de medio y agitando dicho medio a una velocidad menor a 60 rpm. El grado de multiplicación es un 15% más lento que en cultivo estático, pero la concentración celular se dobla, siendo la recogida de anticuerpos

monoclonales función del número de células vivas, y no del grado de crecimiento. De esta forma se obtienen en un día el equivalente a 50 botellas de cultivo estándar, y esto durante varias semanas. Hay que tener en cuenta que para realizar cultivos en agitación el inóculo inicial necesario es mayor que en cultivos estáticos, quizás debido a que en agitación las células están distribuidas homogéneamente en el material, mientras que en estacionario se agrupan en el fondo de la botella de cultivo, lo que favorece el crecimiento [279].

Por lo tanto, parece posible que bajo las condiciones adecuadas de cultivo se puede aumentar el rendimiento en anticuerpos monoclonales, con lo que su producción en fermentadores puede ser práctica a escala industrial [279]. Reuveny *et al.* [222] estudian los factores que prolongan la viabilidad y aumentan por lo tanto la producción de anticuerpos monoclonales en reactores en agitación.

A.IX.c: Producción de ascitis:

El tumor se induce en ratones de la misma cepa que la que donó el bazo, para evitar los rechazos debidos a los Antígenos de Histocompatibilidad [171], aunque Brodeur y Tsang [41] proponen la utilización de la primera generación (F1) del cruce entre machos BALB/c y hembras Swiss. El empleo de esta F1 tiene varias ventajas como es la producción de cuatro veces más ascitis, con la misma concentración de anticuerpos y durante más tiempo que en BALB/c.

A.IX.c.1: Preparación de la cavidad peritoneal: para favorecer el crecimiento de los híbridos en la cavidad peritoneal del ratón o rata, se emplea una sustancia oleosa que normalmente se usa como lubricante y agente anticorrosión, el pristano (2,6,10,14-tetrametil pentadecano). Esta se aplica intraperitonealmente (0.5 ml) [14, 41, 202, 216, 276] unos 7 a 20 días antes de la implantación de los híbridos [14, 41, 216], siendo capaz de irritar el peritoneo de tal manera que se forme el medio

ambiente propicio para su crecimiento, provocando además una fuerte inmunodepresión del animal. Si no se inoculara pristano no se produce ascitis [42], pero es suficiente una única inoculación [122].

En vez de pristano también puede usarse Adyuvante Completo [110] o Incompleto de Freund (0.5 ml) [110, 190], que parece ser claramente superior al Pristano [110].

Raybould *et al.* [215], además de acondicionar el ratón con pristano, aconsejan inmunosuprimir al animal mediante una inyección subcutánea de ciclofosfamida (160 mg/kpv), 18 horas antes y en el momento de inocular los híbridos, mientras que otros autores prefieren aumentar la eficacia irradiándolo previamente con 400 Rads [144, 185].

La cantidad de híbridos a inocular intraperitonealmente es variable ($1-4 \times 10^6$ células) [41, 216], pero lo que sí es recomendable es que estas se encuentren en crecimiento activo [76]. Las células se suspenden en 0.5 ml de DMEM [41]. El tumor aparece 10 a 30 días después de la inoculación [202].

A.IX.c.): Inoculación intraesplénica: Witte y Ber [288, 289] describen un método de producción de ascitis por inoculación de los híbridos intraesplénicamente. Esta técnica posee una serie de ventajas con respecto a la inoculación tradicional intraperitoneal: requiere un bajo número de Hibridomas (10^4), con lo cual el tiempo necesario de cultivo para su inoculación es más corto, permite el estabilizamiento del crecimiento "in vivo" directamente de muestras congeladas y permite la utilización del medio esplénico para eliminar la contaminación de los cultivos.

A.IX.c.3): Recolección de líquido ascítico: una vez se ha producido el tumor, se procede a recolectar el líquido ascítico, bien sacrificando previamente el animal, con lo que la cantidad de anticuerpos recogidos es de 10 a 50 mg por ratón [216], bien recogiendo líquido ascítico a intervalos de 2 ó 3 días hasta que el ratón muere [76], siendo así la obtención mucho mayor. En este caso debe

drenarse el líquido en cuanto éste se acumule, para así retrasar la muerte del animal [42].

A.IX.c.4: Factores que afectan a la producción de ascitis: Brodeur et al. [42], describen los parámetros que afectan a la producción de ascitis:

- * número óptimo de híbridos inoculados: $6-32 \times 10^5$ cel
- * volumen de pristano inoculado: 0.5 ml
- * momento de tratamiento con pristano: 14 días antes de la inoculación de los híbridos
- * sexo del animal empleado: en macho se forma ascitis y se producen anticuerpos monoclonales mejor que en hembras
- * edad del ratón: 6-11 semanas

Controlando todos estos factores, cada ratón comienza a producir entre el quinto y el noveno día, formándose unos 7-10 ml de ascitis y sobreviviendo 11-16 días tras inyectar los híbridos. Sin embargo Fazekas [88], aunque sin especificar unas condiciones tan estrictas, describe una producción de 5-6 ml de ascitis, lo que significan unos 10^{16} anticuerpos monoclonales mezclados con otros anticuerpos irrelevantes. Por otro lado, el isotipo no parece ser importante para la producción de anticuerpos monoclonales en ascitis [110].

La producción de ascitis presenta una serie de desventajas como son:

- * necesidad de mantener una colonia de animales exclusivamente destinados a la producción de ascitis [33, 197], lo que carece de sentido industrial [279]
- * el que algunos híbridos se multiplican difícilmente incluso en animales histocompatibles [33]
- * que el fluido ascítico contiene una gran cantidad de proteínas irrelevantes incluyendo anticuerpos no específicos [49, 279]
- * que en el caso del hombre está desechada la producción de ascitis [33].

En rata se produce una mayor cantidad de ascitis, pero

A. Introducción

pocas IgG de rata se unen a la proteína A estafilocócica, con lo cual se elimina desde el principio este sistema de purificación [15].

El anticuerpo monoclonal viene a representar entre un 2 y un 25% de las proteínas totales de la ascitis [6, 194], por lo que hay que recurrir, la mayoría de las veces, a una purificación previa [46]. Así, las proteínas adicionales de la ascitis no interfieren en muchos usos de los anticuerpos monoclonales, pero deben ser eliminadas siempre que puedan competir con el anticuerpo monoclonal por los sitios de unión, y siempre que sea posible hacerlo. Por lo tanto cuando un anticuerpo monoclonal va a ser conjugado con fluorocromo o biotina, o ligado a un soporte sólido para su uso como inmunoabsorbente o en un ELISA, deberían eliminarse la mayoría de proteínas extrañas [194].

A.X. PURIFICACION, CARACTERIZACION Y ALMACENAMIENTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

A.X.a: Determinación de clase y subclase:

El conocer la clase y subclase del anticuerpo monoclonal producido es importante para determinar el protocolo más adecuado de purificación, así como para interpretar los ensayos inmunológicos en los que vayan a ser empleados [171], siendo además muy útil para predecir las propiedades del anticuerpo (por ejemplo fijación de complemento o unión a la SpA) [296]. Por ejemplo, los anticuerpos de la subclase IgG_{2a} son muy estables y fácilmente purificables, por lo que puede ser la subclase más adecuada para su empleo en ELISA comercial, donde los reactivos requieren una larga vida propia [208].

Los anticuerpos más frecuentes son IgM y sobre todo IgG. Los hibridomas secretores de IgE son poco frecuentes, y los que producen IgA sólo se obtienen cuando se emplea tejido linfoide asociado al intestino para realizar la fusión [145].

La probabilidad de obtener clones productores de IGM se puede incrementar con una única gran dosis de inmunógenos 1 ó 4 días antes de la fusión [271].

La determinación de clase y subclase se puede realizar por técnicas simples como son Doble Difusión en Placa, RIA, ELISA e IPT. La primera de ellas tiene la desventaja de necesitar una elevada concentración de anticuerpo monoclonal [39]. Storch y Lohmann-Matthes [259] describen un ensayo inmunoradiométrico en fase sólida para determinar clase y subclase de inmunoglobulina de ratón en sobrenadante de cultivo de hibridomas, que no necesita ni concentrar ni purificar. Además, tiene las ventajas de obtener resultados en pocas horas y el poder deducir si se trata de cultivos oligo o policlonales (aquellos sobrenadantes con muchas subclases), aunque esto último parece irreal.

A.X.b: Purificación:

Idealmente, el método debería ser rápido, simple y barato, siendo además capaz de procesar grandes cantidades de ascitis y de purificar IgG e IGM [254]. No obstante se puede producir una cierta degradación en las cadenas ligeras y pesadas al realizar cualquier proceso de purificación.

Se han descrito muchos métodos para purificar anticuerpos monoclonales. Los más usados son las precipitaciones con sulfato amónico y las cromatografías (bien de intercambio iónico o de afinidad). La cromatografía de intercambio iónico está constituida por una matriz de celulosa o agarosa a la que van unidos grupos DEAE [111], capaces de ligar las inmunoglobulinas a baja fuerza iónica, pudiéndose separar éstas cuando se aumenta la concentración de aniones o se baja el pH. Este método generalmente no proporciona una purificación completa de medio de cultivo, siendo más adecuado para ascitis y suero [111]. Se trata de un sistema multipaso que no separa todas las inmunoglobulinas [254], aunque Menozzi *et al.* [172] describen una purificación en un solo paso con cromatografía de intercambio

iónico en Zetaprep. Por el contrario, Carlsson et al. [49] opinan que el intercambio catiónico da una concentración 50 veces mayor y purifica mejor, siendo la purificación de IgG₁ mejor que con SpA-Sepharosa (pudiendo purificar también otros isotipos de inmunoglobulinas y subclases de IgG).

En las cromatografías de afinidad se inmoviliza de forma irreversible bien el antígeno, bien proteína A [154]. A la proteína A se une las inmunoglobulinas de ratón IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ [86, 111, 202, 254], varias IgG₁ y varias IgM [202]. Ey et al. [203] describen detalladamente el empleo de diversos tampones para eluir las diferentes clases de inmunoglobulinas de ratón. La elución se realiza disminuyendo el pH de la columna de proteína A. La mayoría de las inmunoglobulinas de ratón se unen a la proteína A a pH 8.6 y se eluyen de la columna a pH 4.3 [202].

En los casos en que la purificación con SpA o por intercambio iónico no sean aplicables (como es el caso de medios de cultivo con anticuerpos monoclonales de rata), se pueden emplear anti-inmunoglobulinas ligadas a agarosa [111]. Antes del primer empleo de la columna es conveniente pasar suero irrelevante de ratón o de rata para saturar cualquier anticuerpo con afinidad excesiva que pueda ocasionar una unión irreversible [111].

Manil et al. [168] estudian la eficacia de varios protocolos de purificación para IgG, llegando a la conclusión de que el uso de proteína A produce constantemente el grado de pureza más alto sea cual sea la subclase de IgG, aunque para obtener los mejores resultados se debe producir la optimización del protocolo. Así para IgG₂, se describe el protocolo de tres horas, para IgG₁ con suficiente afinidad para la proteína A, un protocolo de 16 horas con gradientes de pH discontinuos y un protocolo más complejo para IgG₁ con baja afinidad por la proteína A. Si sólo se utiliza cromatografía DEAE (intercambio iónico) la recolección es mejor, pero la pureza es sólo moderada. El empleo de cromatografía de hidroxil-apatita provee un menor rendimiento en la cantidad de anticuerpos, una menor pureza y los resultados son

poco reproducibles en el trabajo diario. De los métodos citados hasta ahora el único que es capaz de diferenciar entre los anticuerpos de interés y aquellos inespecíficos o los apropiados con cadenas ligeras o pesadas inadecuadas (en el caso de la purificación de ascitis) es la cromatografía de hidroxilapatita, que además consta de un solo paso [254]. La precipitación con sulfato amónico y gel filtración muestran un relativo enriquecimiento de la solución de anticuerpos monoclonales, siendo un método rápido que provee material de baja pureza y en poca cantidad, mientras que otros métodos de purificación emplean mucho tiempo [194].

Russo *et al.* [229] describen un sistema de purificación mediante una única precipitación con ácido caprílico (que no afecta a las inmunoglobulinas tipo G), recuperándose en ascitis entre el 60 y 80% de las inmunoglobulinas. Este tipo de precipitación es tan simple y rápido como el realizado con sulfato amónico, presentando la ventaja de que la formación de agregados se ve marcadamente reducida. Kinney y Parkinson [140] describen otro método de purificación no cromatográfico para IgG de suero y ascitis, empleando dos precipitaciones, una con ácido caprílico y otra con sulfato amónico, aportando simplicidad y bajo costo.

Según Neoh *et al.* [194] un paso previo de delipidación (con dióxido de silicón) aumenta la eficacia de la purificación y no es desfavorable a la actividad biológica del anticuerpo monoclonal (ellos lo realizan previamente a una precipitación con PEG, realizándose posteriormente un paso de intercambio iónico si el grado de pureza requerido es mucho mayor).

Burchiel [45] y Burchiel *et al.* [46] proponen el empleo de HPLC ya que se obtienen altas concentraciones de anticuerpos monoclonales muy purificados de forma rápida y efectiva.

A.X.c: Determinación de las características del anticuerpo:

La especificidad debe establecerse en el contexto del

uso potencial del anticuerpo, ya que ésta no puede determinarse de forma absoluta, al no ser posible analizar toda fuente de material. Así, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal frente a un parásito debe ser contrastado frente a otros parásitos con los cuales pueda confundirse antigénicamente y con los tejidos que se puedan encontrar con el parásito [296].

Para su empleo potencial en ELISA se debe observar si el anticuerpo pierde su capacidad de unirse al antígeno tras ser conjugado con peroxidasa. Burkot et al. [47] proponen un método indirecto usando fluorodinitrobenceno, con lo que se determina si la posible pérdida de unión es debida al requerimiento de aminoácidos primarios no modificados en el lugar de unión.

Es importante conocer el título, indicativo de la cantidad de material disponible. Este dato es muy útil para seguir la pérdida de actividad durante el almacenamiento, aunque no aporta información alguna sobre la actividad específica del anticuerpo monoclonal, que debe ser expresada en unidades de actividad por mg de anticuerpo [296].

Otra prueba que conviene realizar es ver si existen reacciones cruzadas. Normalmente se piensa que el ELISA es más sensible que las pruebas de inmunodifusión porque se necesitan menos moléculas de anticuerpos para una reacción enzimática visible que para una línea de precipitación visible. Sin embargo la prueba de doble difusión en gel puede revelar reacciones cruzadas de anticuerpos monoclonales que pueden no ser detectadas por ensayos más sensibles [181]. Las reacciones cruzadas de un anticuerpo monoclonal pueden proporcionar una información muy valiosa sobre las relaciones biológicas entre proteínas y otras macromoléculas [153].

La afinidad del anticuerpo por el antígeno es un dato de interés en los ensayos empleados para la medida cuantitativa del antígeno o para detectar su presencia o ausencia [276]. Beatty et al. [19] han descrito un enzoinmunoensayo no competitivo para medir la afinidad de un anticuerpo

monoclonal.

Moyse et al. [189] dicen que mezclas de algunos anticuerpos monoclonales que se unen a epitopos separados, muestran un ausente de la afinidad por el antígeno. Para explicarlo describen un modelo matemático.

A.I.d: Almacenamiento:

Si el almacenamiento de anticuerpos monoclonales se realiza inadecuadamente, la reactividad con el antígeno homólogo puede verse muy reducida. La congelación-descongelación puede reducir el título homólogo de algunos anticuerpos hasta un 50% y aumentar las reacciones cruzadas más o menos al doble [276]. El uso de pH y temperatura inadecuados pueden ocasionar cambios no deseados [276], entre los que se encuentran alteraciones en la especificidad [185]. La liofilización, bien de medio de cultivo, bien de suero o anticuerpos monoclonales purificados, da frecuentemente como resultado una pérdida de actividad [111]. Esto hace patente una de las desventajas de los anticuerpos monoclonales y es que en muchos casos son extremadamente sensibles a la inactivación [232].

En general, el almacenamiento correcto de un anticuerpo monoclonal debe tener en cuenta el medio en que se encuentra [111]:

- * medio de cultivo: generalmente muy estables a 4°C con 0.1% de azida de sodio
- * suero o ascitis: preferiblemente se debe almacenar a -70°C, aunque durante un corto espacio de tiempo se pueden mantener a -20°C. Otro modo de almacenamiento es en forma de precipitados de sulfato amónico.
- * anticuerpos monoclonales purificados: durante unos meses pueden ser almacenados a 4°C en PBS con 0.1% de azida de sodio. La concentración óptima es de 1-10 mg de anticuerpo por mililitro. Si se mantiene a temperatura ambiente, en unos días se produce una cierta pérdida de actividad

A.XI. MARCADO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

Goding [111] describe tres clases de marcado de anticuerpos monoclonales:

* radiactivo: es muy sencillo realizarlo de forma bio-sintética con aminoácidos marcados radiactivamente. Ya que más de la mitad de la proteína total es anticuerpo monoclonal, se obtienen de manera fácil actividades altamente específicas. Aquí el producto no se altera, por lo tanto el anticuerpo monoclonal marcado debe comportarse de forma idéntica al anticuerpo sin marcar [296].

* con fluorocromos: debido precisamente a la homogeneidad de los anticuerpos monoclonales, se podría esperar que ciertos anticuerpos fueran inactivados al ser conjugados con fluorocromos, no obstante, esto sólo ocurre en una minoría de los casos.

* con biotina: la biotina es una vitamina soluble en agua que puede ser ligada fácilmente a proteínas. Como es relativamente polar, se pueden ligar una gran cantidad de moléculas a los anticuerpos alterando relativamente poco su estructura. La biotina y la avidina son baratas y su conjugación sencilla. La clave del éxito radica en ligar tanta cantidad de biotina como sea posible, aunque, paradójicamente, si se liga demasiada la especificidad y actividad del anticuerpo se pierde.

A.XII. CONCLUSION

El desarrollo de esta técnica tal como la conocemos puede verse frenado por el auge de la ingeniería genética, gracias a la cual se llegará a que los anticuerpos sean producidos por bacterias [141] o en mielomas [176] mediante la clonación de genes y su expresión en las mismas, o bien por el crecimiento en cultivo tisular normal de la respectiva célula B [141], o por otro lado continuando con la transformación directa de las células productoras de inmunoglobulinas con virus o carcinógenos [141], pudiéndose

producir anticuerpos recombinantes con propiedades nuevas [176].

En cuanto al primer punto, la complicada estructura del anticuerpo y la baja frecuencia de células que producen un determinado anticuerpo hacen que la clonación en bacterias no sea el camino óptimo para reemplazar la fusión tradicional, aunque no se debe ignorar el tremendo potencial del clonaje de genes [103]. No obstante, esto se puede realizar mediante la introducción del gen de la producción de inmunoglobulinas manipulado "in vitro", con lo cual se pueden obtener anticuerpos quiméricos o de segunda generación [105], como aquellos en los cuales la porción de unión al antígeno es "fusionada" a una mitad enzimática [195] o "construir" anticuerpos cuya cadena pesada está compuesta por una porción constante de origen humano unida a una región variable de ratón [196].

En lo referente al segundo punto, el crecimiento en cultivo tisular de la célula es limitado y existe poca producción de anticuerpos, no obstante no es imposible encontrar condiciones bajo las cuales el linfocito B se divide y secreta grandes cantidades de anticuerpos.

Por último, en el caso de los linfocitos B humanos, se puede provocar la infección de los mismos con el virus Epstein-Barr (EBV), con lo cual los linfocitos B portan el genoma EBV pudiendo mantenerse indefinidamente en cultivo manteniendo sus propias características, incluyendo la producción de anticuerpos [255]. Uno de los primeros pasos en este punto fue la transformación con el virus de mono 40 (SV 40) de linfocitos B de conejo hiperinmunizado [260], pero las transformaciones eran escasas y la producción de inmunoglobulinas baja. La transformación con EBV produjo mejores resultados [256]. Desgraciadamente, las células transformadas por EBV suelen crecer mal a bajas densidades celulares incluso con la ayuda de células "feeder layer" o factores de crecimiento exógenos [50, 127] o tras crecer bien 1 ó 2 meses, su título de anticuerpos declina subitamente, hecho que se acompaña de un cambio de fenotipo

[127].

Una variación de este sistema sería una combinación de las técnicas con EBV y las normales de hibridación [148, 226] eliminándose de esta forma una de las grandes desventajas de trabajar con sangre periférica (los linfocitos no se encuentran en estado de división activa) ya que el EBV activa los linfocitos, aunque no se transformen, por lo que la fusión es más eficiente [127]. Founq et al. [94] fusionan células B-EBV activadas con un hibridoma hombre-ratón.

Si nos centramos en la terapia en el hombre con anticuerpos monoclonales, ésta mejorará sensiblemente con la producción de anticuerpos totalmente humanos [1], pero mientras tanto, se puede obtener genéticamente anticuerpos monoclonales ratón-hombre "casi humanos" con una unión al antígeno predefinida, siendo en teoría mucho menos inmunógenos en el hombre que los de ratón, aunque estas hipótesis deben ser confirmadas en la práctica [50].

Otro punto que todavía debe desarrollarse es el de los anticuerpos anti-idiotipo con sus posibles aplicaciones en vacunación (al ser la imagen interna del antígeno pueden estimular, bajo ciertas circunstancias, la respuesta inmunitaria de forma específica), y el tratamiento de enfermedades autoinmunes (al poder ejercer un efecto supresor directo sobre los clones celulares contra los que se dirige) y el tratamiento de leucemias y linfomas (al dirigirse contra los idiotipos que portan los linfocitos tumorales) [182].

A.XIII. ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS

Las enterotoxinas estafilocócicas son proteínas de bajo peso molecular, similares en su actividad y composición, pero diferenciadas por su comportamiento antigénico. Son clasificadas como enterotoxinas debido a que producen una reacción emética cuando son suministradas intragástricamente a monos. Las enterotoxinas son las únicas sustancias conocidas de origen estafilocócico, biológicamente activas,

que producen el anteriormente citado efecto emético y son resistentes a la proteólisis. Por lo tanto, cualquier cepa estafilocócica que produzca una sustancia que cause emesis, es considerada como enterotoxigenica.

A.XIII.a: Propiedades físico-químicas:

Las enterotoxinas son proteínas sencillas y de relativamente bajo peso molecular (entre 26.000 y 29.000 daltons), higroscópicas y fácilmente solubles en agua y soluciones salinas. Están formadas por una cadena polipeptídica simple que contiene relativamente grandes cantidades de lisina, ácido aspártico, ácido glutámico y tirosina.

De acuerdo a la composición aminoacídica se pueden establecer dos grandes grupos: uno que incluye las enterotoxinas A (EEA), D (ED) y E (EE); y otro que incluye la B (EB) y la C (EC). Por ejemplo, el número de residuos de metionina en EB y EC es 7 u 8, mientras que en el primer grupo anteriormente citado es 1 ó 2. Existen otras diferencias entre ambos grupos, que aparentemente no juegan un papel importante en su actividad, pero que son muy importantes en su antigenicidad, ya que cada enterotoxina provoca la producción de anticuerpos específicos.

La secuencia aminoacídica parcial de la EEA [126] y las secuencias de EB [125] y EC [234] muestran un área de homología que podría ser el lugar activo de las enterotoxinas [126]. Se cree que el resto de metionina en este área de homología es importante ya que la EE sólo posee uno [24]. Se realizó un intento infructuoso para sustituir de forma química ese resto de metionina en EEA, en un esfuerzo por demostrar que dicha sustitución inactivaría la acción emética de dicha toxina [24]. La sustitución de los residuos de histidina inactivaron la acción emética de la EEA, se cree que debido a la sustitución del resto de histidina en ese área de homología [257].

Los dos restos de cistina están situados cerca del

centro de la molécula de enterotoxina, estableciéndose un puente disulfuro entre ambos y formándose de esta forma el denominado "lazo de la cisteína" [27]. La reducción del puente disulfuro de la EEB y la sustitución de los grupos -SH, no tiene efecto alguno en la capacidad de provocar emésis o de reaccionar con los anticuerpos [72]. Esta estructura es común a todas las enterotoxinas secuenciadas, y se asume que también lo es al resto [24]. La secuencia y el número de residuos en el "lazo" es distinta para cada una de las enterotoxinas.

Se han sustituido diferentes restos aminoacídicos en la molécula de enterotoxina para intentar identificar el lugar de acción. La sustitución de los 6 restos "libres" de tirosina en EEB y EEC₁ carece de efecto sobre la acción emética o reacción con anticuerpos específicos [37, 38, 70], al igual que la guanidación de los grupos amino libres de los restos de lisina en el caso EEB; pero el cambio de carga por acetilación de los grupos amino inactiva la toxina [71]. Cualquier sustitución que altere la conformación de la molécula afecta la actividad de la enterotoxina [24].

Las enterotoxinas son bastante más resistentes, en muchos aspectos, que la mayoría de las proteínas. Así, resisten la acción de enzimas proteolíticas como la pepsina, tripsina, renina y papaína, y son termorresistentes. Hay que destacar que la termorresistencia de las enterotoxinas es mucho mayor cuando éstas se encuentran en alimentos que en la soluciones también en el laboratorio [23], con las consecuencias que de ello se derivan para la higiene y tecnología de los alimentos.

Las enterotoxinas son resistentes a las enzimas proteolíticas, tales como pepsina y tripsina, gracias a lo cual no son inactivadas en el tracto digestivo cuando se administran intragástricamente. Sin embargo, la digestión suave con tripsina puede alterar el "lazo de cisteína" de EEB [248] y EEC₁ [247].

Hasta el momento no se ha conseguido alterarla EEA con varias clases de enzimas proteolíticas [248]. Sin embargo,

Ezepchuk et al. [87] y Noskova et al. [199] lo lograron con papaina tras una reducción con β -Mercaptoetanol. Estos experimentos no pudieron ser reproducidos por los investigadores del "Food Research Institute" [24].

A.XIII.b: Propiedades inmunológicas de las enterotoxinas:

La nomenclatura aplicada a las enterotoxinas estafilocócicas se basa en sus reacciones con antisueros obtenidos en conejos [224], que son específicos para cada enterotoxina excepto para las EECs [29].

Hasta ahora se han identificado y aislado 7 enterotoxinas (A, B, C₁, C₂, C₃, D y E), pero existen otras sin identificar. Las enterotoxinas fueron identificadas por los siguientes autores:

- * EEA [51, 54]
- * EEB [30]
- * EEC₁ y EEC₂ [25]
- * EEC₃ [221]^a
- * EED [53]
- * EEE [26]

En un principio EEC₁ y EEC₂ fueron identificadas como enterotoxinas diferentes debido a sus propiedades físicas. Sin embargo, se descubrió que aunque cada una reaccionaba con el antisuero obtenido con la otra enterotoxina, la reacción con el anticuerpo heterólogo era ligeramente diferente a la obtenida con el homólogo. Lee et al. [159] describieron que aunque las dos toxinas reaccionaban con un anticuerpo común, cada una reacciona con uno específico para cada una de las dos toxinas. Las reacciones de la tercera EEC en RIA con antisuero obtenido frente a EEC₁ y EEC₂ indican que es una enterotoxina diferente [221].

Aunque no había ningún indicio de reacciones cruzadas entre EEA y EEE antes de la purificación de esta última, tras purificarla se comprobó que reaccionaba con antisuero preparado contra EEA y que EEA reaccionaba con el suero obtenido contra EEE [26]. Lee et al. [158] identificaron los

anticuerpos específicos y los que producen reacciones cruzadas entre EEA y EEE.

A.XIII.c: Patogenia:

El punto de acción de las enterotoxinas estafilocócicas es el tracto digestivo; no obstante, aparecen otras manifestaciones ajenas a éste. De estas últimas se puede deducir la instauración de toxemia, difundiendo la toxina por el torrente circulatorio hacia otras localizaciones orgánicas, aunque los datos sobre este punto son muy escasos.

Los efectos inducidos por las enterotoxinas estafilocócicas pueden dividirse en dos grandes grupos:

* Efectos gástricos:

Emesis: al parecer [262], la respuesta aferente alcanza el centro del vómito por el nervio vago y otros nervios simpáticos, aunque para Thatcher [267], todas las respuestas eméticas están mediadas vía arcos reflejos que pasan a través del centro del vómito.

Diarrea: síntoma característico, pero no privativo de esta intoxicación. Puede estar debida bien a la inhibición de la absorción de líquidos desde el lumen intestinal o del incremento del flujo de fluidos hacia el lumen. Kaplan y Tenenbaum [131] indicaron que la ingestión de enterotoxina induce un incremento del peristaltismo intestinal.

Enteritis: se observa en los casos de intoxicación grave, manifestándose como hiperemia mucosa zonal, edema, irritación muscular, erosiones, petequias y exudado purulento [22]. También se producen cambios microscópicos.

* Otros efectos:

Pirogénicos: el carácter pirogénico de las enterotoxinas fue puesto de manifiesto por Clark y Page [58]. Los efectos pirogénicos de la enterotoxina A son al parecer 3-6 veces más potentes que los de la B [21].

Descamación: el contacto con enterotoxinas ha provocado erupción vesiculosa y descamación, afectando

- * Radioinmunoensayo
- * ELISA

Se han desarrollado otros métodos como la hemaglutinación pasiva inversa [243], inmunofluorescencia [212] y electroinmunodifusión [104], pero su empleo no se ha extendido mucho.

Los métodos de inmunodifusión comprenden un grupo de técnicas que emplean la difusión del antígeno y anticuerpo a través de una matriz de agar con la formación de una línea de precipitado. Entre ellas se encuentran la inmunodifusión sencilla en tubo [30], inmunodifusión sencilla en placa [174], inmunodifusión doble en tubo [117] e inmunodifusión doble en placa que puede realizarse conforme a dos versiones: macrométodo [225] y micrométodo [52], siendo este último el más utilizado. No obstante, este método no es muy sensible (0.1 µg de toxina por mililitro), por lo tanto se debe realizar una extracción de unos 100 gramos de muestra de alimento y concentrarse hasta 0.2 mililitros para poder detectar 1 nanogramo de toxina por gramo de alimento, requiriendo todo el proceso entre 3-6 días para ser finalizado [268].

La necesidad de pruebas más rápidas permitió el desarrollo del RIA. Varios laboratorios han preconizado el empleo del RIA como método de elección para la detección y análisis de enterotoxina en sobrenadantes de cultivos y en los extractos de alimentos [64, 65, 128, 129]. Brevemente, en el RIA, un antígeno en una muestra problema está compitiendo por los anticuerpos específicos con una cantidad determinada del mismo antígeno marcada con algún isótopo radiactivo [28]. De este modo, y por diferencia, puede establecerse no sólo la existencia de una reacción de identidad, sino que también se puede determinar la cantidad del antígeno problema presente en la muestra. Sin embargo, el RIA requiere el empleo de enterotoxinas purificadas, y condiciones necesarias y equipo para trabajar con radioisótopos [264].

Debido a las limitaciones del RIA se procedió al desa-

rollo del ELISA, prueba que posee la sensibilidad del RIA [268]. La aplicación del ELISA para la detección de enterotoxinas estafilocócicas ha sido muy amplia [20, 97, 133, 146, 149, 184, 201].

Fey *et al.* [91] compararon los cuatro tipos básicos de ELISA para la detección de enterotoxinas A, B, C y D:

- * ELISA de competición con toxina conjugada al enzima
- * ELISA de competición con anticuerpo conjugado
- * ELISA de competición con proteína A conjugada
- * ELISA "sandwich" con anticuerpo conjugado

Fey *et al.* [91] concluyeron que el mejor sistema era el ELISA "sandwich" empleando anticuerpos conjugados a la enzima y esferas de poliestireno como fase sólida. Sin embargo, en el FRI se abandonó la utilización de esferas pasando al de placas de microtitulación de 96 pocillos [97].

El mayor problema que presenta la detección de las enterotoxinas es la existencia de enterotoxinas aún no identificadas. Esto se resolvería analizando exhaustivamente las enterotoxinas con la esperanza de encontrar una prueba específica para todas ellas, identificadas y no identificadas.

A.XIII.e: Anticuerpos monoclonales frente a enterotoxinas:

Se han producido anticuerpos monoclonales que reaccionan con todas las enterotoxinas estafilocócicas conocidas hasta el momento:

- * EEA [83, 156, 236, 268]
- * EEB [77, 139, 156, 163, 218, 269]
- * EEC [35, 139, 156, 269]
- * EEC₁ [269]
- * EEC₂ [269]
- * EEC₃ [269]
- * EED [156]
- * EEE [268]

También se ha descrito la producción de un anticuerpo monoclonal que reacciona con todas las EEs conocidas [173].

Este monoclonal se desarrolló mediante inmunizaciones con dos serotipos de enterotoxinas (EEA y EED). No obstante se ha comprobado que dicho anticuerpo reacciona con otras proteínas extrañas [24]. Thompson et al. [268] también realizan inmunizaciones con dos clases de toxinas (EEB+EEC₁, EEB+EEC₂, EEE+EEA, TSST-1-EEC₃). Edwin et al. [82] también describen anticuerpos monoclonales que reaccionan con todas las enterotoxinas conocidas, pero obtenidos inmunizando exclusivamente con EEA.

De estos anticuerpos monoclonales, los hay específicos para las enterotoxinas A [81, 82, 83, 156, 236, 268], B [77, 119, 163, 218, 269], EEC [15, 139, 156], D [156] y EEE [268]. Otros anticuerpos presentan reacciones cruzadas con más de una enterotoxina:

- * EEA+EEE [83, 268]
- * EEB+EEC [156, 269]
- * EEB+EECs₁ [268]
- * EECs [269]
- * EEC₂+EEC₃ [268]
- * EEA+EED+EEE [268]
- * EEs [82, 173]

Estos anticuerpo monoclonales han sido aplicados en sistemas de detección de enterotoxinas estafilocócicas [77, 82, 153, 157, 236, 270], aunque de ellos solo tres emplean de forma exclusiva anticuerpos monoclonales en el sistema ELISA [77, 236, 270]. Otros monoclonales han sido utilizados en estudios diferentes al del campo de la detección de toxinas en alimentos o sustratos laboratoriales [15, 218].

También se han producido anticuerpos monoclonales anti-TSST-1 [31, 12, 16, 206, 231, 268, 283] que es una toxina emparentada estructuralmente con las enterotoxinas aunque con un modo de acción totalmente diferenciado.

B. OBJETIVOS



Las intoxicaciones estafilocócicas, uno de los principales problemas en la higiene y tecnología de los alimentos, surgen de la ingestión de alimentos contaminados con enterotoxinas estafilocócicas. Hasta el momento existen siete serotipos descritos (A, B, C₁, C₂, C₃, D y E), reconocibles por reaccionar con anticuerpos específicos. Las enterotoxinas estafilocócicas son resistentes a los tratamientos térmicos, así como a otras muchas condiciones que disminuyen o eliminan la presencia de estafilococos productores. Por lo tanto, es imprescindible detectarlas en los alimentos, no siendo correcto el tratar de aislar el microorganismo productor.

La detección de enterotoxinas en los alimentos, generalmente se realiza mediante sistemas inmunológicos. Hasta la fecha, este proceso presenta el gravísimo inconveniente de la necesidad de detectar cada una por separado [173], empleando anticuerpos policlonales, con los problemas que ello acarrea como son la dificultad de producir anticuerpos de elevada calidad en grandes cantidades [156]. Como los anticuerpos monoclonales ofrecen un mayor grado de especificidad que los anticuerpos policlonales, la producción de anticuerpos monoclonales y su aplicación en métodos de detección rutinaria conllevaría análisis más rápidos, sensibles y específicos [82].

Se han producido anticuerpos monoclonales contra todas las enterotoxinas estafilocócicas conocidas. Estos anticuerpos han sido empleados en varios sistemas de detección, aunque sólo tres grupos de investigación han descrito el empleo de forma exclusiva de anticuerpos monoclonales en un método de detección [77, 236, 270]. Es difícil entender el empleo de sistemas combinados de anticuerpos monoclonales y policlonales, si se intenta evitar la dependencia de los sueros tradicionales [268].

Los objetivos de este trabajo son, por un lado producir anticuerpos monoclonales contra dos de las enterotoxinas representativas de los dos grupos inmunológicos en que se pueden dividir las enterotoxinas conocidas: el grupo EEA-

EEB-EHE y el grupo EEB-EECs, intentando aplicar estos anticuerpos en un sistema de detección de enterotoxinas. Como objetivo final, nos propusimos el desarrollar un sistema de detección para todas las enterotoxinas conocidas, bien por medio de anticuerpos monoclonales que reaccionaran con una o varias enterotoxinas, hasta cubrir todo el espectro conocido, o bien empleando dos o más anticuerpos monoclonales que reaccionaran con todos los serotipos.

El desarrollar un "kit" del "si-no", es decir una prueba que nos permitiera asegurar la presencia o ausencia de enterotoxinas estafilocócicas, podría ser muy útil en la higiene y salud pública, aplicándolo en el análisis rutinario de los alimentos consumidos por grupos de alto riesgo (hospitales, colegios, grandes restaurantes, etc.) y en general en todo alimento que por si mismo entrañe un elevado riesgo (comidas preparadas en grandes cantidades, con elevada manipulación y realizadas con suficiente anterioridad a ser consumidas).

Hasta hoy solo dos grupos de investigación han producido anticuerpos monoclonales que reaccionen con todas las enterotoxinas [12, 17], pero ninguno ha podido desarrollar un método con estos anticuerpos monoclonales.

C. MATERIAL Y METODOS



El trabajo que ahora presentamos se llevó a cabo casi en su totalidad en el Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de Madrid. Sin embargo, las electroforesis y electroeluciones fueron realizadas en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV (Laboratorio de Química) de esta misma facultad.

C.I. MATERIAL

C.I.a: Línea de mieloma:

Para la producción de hibridomas se empleó la línea Sp2/O [241], amablemente cedida por el Dr. Melero (C.N.M.V.I. Sanitarias, Majadahonda).

C.I.b: Medio de cultivo para mieloma:

C.I.b.1: Medio de Eagle Modificado según Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (DMEM): se empleó DMEM en polvo sin Bicarbonato Sódico (EUTROPH, EUROBIO).

Para obtener aproximadamente 1 litro de DMEM se resuspendían en 950 ml de agua Milli-Q (MILLIPORE) los siguientes componentes:

* DMEM.....	12'46 g
* Glucosa (PANREAC).....	4'5 g
* Piruvato Sódico (MERCK).....	0'11 g
* L-Glutamina (BDH Chemicals Ltd.).....	0'22 g
* Bicarbonato Sódico (PANREAC).....	3'7 g

Posteriormente se añaden los agentes antimicrobianos y la Hipoxantina y Timidina (ver los apartados correspondientes).

El pH se ajustaba hasta 7-7'1 con HCl 1N (PANREAC), midiéndolo con un pH-metro (CRISON, modelo 414).

Una vez completado, el medio era esterilizado por medio de un filtro Sterivex-GS (0'22 μ m) (MILLIPORE), siendo

impulsado gracias a una bomba pulsátil (MILLIPORE), distribuyéndose en botellas de cultivo tisular de 275 ml (COSTAR) hasta un volumen aproximado de 250 ml.

Posteriormente se llevaban las botellas a 37°C durante 18 h y se realizaba un control de esterilidad en Agar Sangre, tras el cual se almacenaban a 4°C.

C.I.b.2: Suero Fetal Bovino (Foetal Calf Serum) (FCS): se utilizó FCS (GIBCO). Tras recibir el lote se inactivaba el complemento (56°C durante 30 minutos, agitando cada cierto tiempo) y se almacenaba a -20°C hasta su utilización.

Los cultivos de mieloma se suplementaban con un 15% de FCS, mientras que los hibridomas se cultivaban con el 20% de FCS salvo en las últimas etapas en las que eran suplementadas con el 15% de suero, ya que en esos momentos estaban totalmente adaptadas al cultivo.

En las etapas críticas (tras la fusión y en la clonación) se sustituía el FCS normal por otro que había sido testado para su capacidad de soportar altas diluciones de células (Myclone Foetal Calf Serum, GIBCO) (FCS-M).

C.I.b.3: Soluciones antimicrobianas: tras preparar el DMEM y antes de ajustar el pH y filtrarlo se añadía Gentamicina de modo que la concentración final fuera de 0.2 mg/ml (de una solución inicial de 50 mg/ml) (GIBCO) y un agente anti-PPLO (TylocinaTM) (partiendo de una solución 100x) (GIBCO).

C.I.b.4: Hipoxantina (6-Hidroxipurina): para obtener una solución 100x se disolvían 0.136 g de Hipoxantina (SIGMA) en 100 ml de agua Milli-Q (MILLIPORE), calentando la mezcla al baño maría. Se distribuía en alícuotas de 10 ml, congelándolas posteriormente a -20°C hasta su uso. Tras descongelar se debía hervir la alícuota para que se solubilizara totalmente la hipoxantina.

C.I.b.5: Timidina-Glicina: para preparar un stock 100x, se añadían 0.038 g de Timidina (SIGMA) y 0.0022 g de Glicina (SIGMA) a 100 ml de agua Milli-Q (MILLIPORE), procediéndose

a su distribución en alícuotas de 10 ml, y congelando estas a -20°C hasta su utilización.

Con las soluciones anteriores preparábamos DMEM-HT.

C.I.b.6: 8-Azaguanina: para obtener una solución 100x se añadía a 100 ml de agua Milli-Q (MILLIPORE) 0'152 g de 8-Azaguanina (SIGMA). Posteriormente y en agitación, se añadía NaOH 1N (PANREAC) hasta que la solución se clarificase, llevándola a 37°C en agitación hasta su total disolución, filtrándola a continuación por medio de un filtro acoplable a jeringuilla (0'22 μm) (MILLIPORE), y distribuyéndolo en alícuotas de 1 ml y conservándolas a -20°C hasta su utilización.

C.I.c: Medio de cultivo selectivo (Aminopterina):

Tras realizar la fusión, e incluso en las clonaciones, y por supuesto siempre que se renovara el medio de cultivo en estos momentos, el DMEM-HT se suplementaba con Aminopterina (SIGMA) a partir de una solución 100x, que se obtenía añadiendo 0'002 g en 100 ml de agua Milli-Q (MILLIPORE). Tras resuspender la Aminopterina, se distribuía en alícuotas de 1 ml previa filtración por medio de un filtro acoplable a jeringuilla (0'22 μm) (MILLIPORE).

Las alícuotas de Aminopterina debían cubrirse con papel de aluminio, ya que la Aminopterina es un compuesto fotosensible.

La otra sustancia selectiva empleada en este trabajo, la Ametopterina (Metotrexato), fue preparada tal y como se ha descrito para la Aminopterina, pero sin necesidad de preservar la sustancia de la luz ya que no es fotosensible.

C.I.d: Material de cultivo:

C.I.d.1: Frascos de cultivo tisular: normalmente se empleaban dos tipos de frascos de cultivo tisular (COSTAR), unos pequeños (50 ml de volumen y 25 cm^2 de área de

crecimiento), cuya boca estaba inclinada para facilitar el manejo de la pipeta y otras más grandes (275 ml de capacidad y 75 cm² de superficie de crecimiento), empleados cuando se necesitaban grandes cantidades de células.

C.I.d.2: Microplacas: se emplearon dos tipos (COSTAR). Placas de 96 pocillos (6'4 mm de diámetro cada uno y 0'32 cm² de superficie de crecimiento), que se utilizaban para distribuir las células tras la fusión y para la clonación. Las de 24 pocillos (16 mm de diámetro cada pocillo y 2 cm² de área de crecimiento) servían como paso intermedio para la expansión de los clones a botella de cultivo.

C.I.d.3: Pipetas y micropipetas: para el manejo de los medios de cultivo y dar los pases a las células se disponía de pipetas de vidrio estériles de 5 y 10 ml (CORNING). Para volúmenes menores se empleaban micropipetas con puntas estériles. Se empleaban dos tipos de micropipetas: de un solo canal (GILSON), unas regulables de 5 a 100 µl y otras de 200 a 1000 µl, y multicanal (8 canales) (TITERTEK) regulable entre 5 y 250 µl. Las puntas para las micropipetas (COSTAR) eran esterilizadas en autoclave en cajas especiales para cada tipo de punta (COSTAR).

C.I.e: Material para la congelación:

C.I.e.1: Mezcla de congelación: el medio de congelación estaba formado por una solución al 10% de Dimetilsulfóxido (MERCK) en FCS (GIBCO).

C.I.e.2: Criotubos: los tubos para la congelación con tapón a rosca (COSTAR) tenían una capacidad de 2 ml, aunque como máximo se añadía 1'5 ml.

C.I.f: Cepa de ratones:

Se utilizaron ratones de la estirpe BALB/c. En la inmunización se emplearon sólo hembras, mientras que para la producción de ascitis se utilizaron indistintamente machos y hembras. Los animales empleados en la inmunización tenían al

comienzo de la misma 8-12 semanas de vida, mientras que las edades de aquellos empleados en la producción de ascitis oscilaba entre 10 y 15 semanas.

C.I.g: Material para la inmunización:

C.I.g.1: Adyuvantes: empleamos dos tipos de adyuvantes (DIFCO): Adyuvante Completo de Freund (Freund's Complete Adjuvant) (FCA) para la primera inoculación y Adyuvante Incompleto de Freund (Freund's Incomplete Adjuvant) (FIA) para las restantes realizadas por vía intraperitoneal.

C.I.g.2: Enterotoxinas: las enterotoxinas A, B, C, D y E (tanto pura en el caso de EEA como crudas en el resto de los casos, y en el de la EEA) fueron amablemente cedidas por el Dr. M.S. Bergdoll (Food Research Institute, Madison, Wisconsin), mientras que la enterotoxina B era comercial (SIGMA).

C.I.h: Material para la fusión:

C.I.h.1: Rejillas de ruptura: para disgregar el bazo se disponía de mallas metálicas (2'5 cm de diámetro) esterilizadas en autoclave, encima de las cuales el bazo era presionado con un émbolo de goma de jeringuilla.

C.I.h.2: Polietilenglicol: se utilizó PEG con un peso molecular de 1540 (SIGMA). Para la fusión se disolvía en DMEM-HT al 5% (p/v), calentándolo a unos 55-60°C para que el PEG pasara a fase líquida, siendo esterilizado posteriormente por filtración mediante un filtro acoplable a jeringuilla.

C.I.h.3: Tubos de centrifuga: se emplearon tubos de centrifuga de plástico de fondo cónico, pero con base autoportante que permite su sujeción vertical sin necesidad de utilizar gradillas (GREINER) con una capacidad aproximada de 50 ml.

C.I.h.4: Solución de lisado de eritrocitos (ACK): esta solución tampón estaba formada por:

- * Cloruro Amónico (NH Cl) 0'155 M (MERCK)
- * Sal Disódica del ⁴Acido Etiléndiaminotetraacético (NA EDTA) 0'1 mM (SIGMA)
- * Bicarbonato Potásico (KHCO₃) 0'01 M (PANREAC).

Para preparar esta solución se añadían las siguientes cantidades en 100 ml de agua Milli-Q (MILLIPORE):

- * NH Cl (MERCK)..... 0'829 g
- * Na⁴ EDTA (SIGMA)..... 3'362 g
- * KHCO₃ (PANREAC)..... 0'1 g

Tras resuspender los componentes se distribuía la solución en alícuotas de 1 ml tras ser filtrado através de un filtro acoplable a jeringuilla (0'22 µm) (MILLIPORE) y almacenado a -20°C hasta el momento de su utilización.

C.I.h.3: Solución para el recuento celular: para el recuento celular empleábamos una solución de tinte Tripán azul forzada por los siguientes componentes:

- * agua Milli-Q (MILLIPORE)..... 95 ml
- * Tripán azul (SIGMA)..... 0'4 g
- * CINA (PANREAC)..... 0'81 g
- * PO₄ H₂ K (PANREAC)..... 0'66 g

Una vez resuspendidos los componentes se hervía la mezcla al baño maría durante 5 minutos, dejándola enfriar a temperatura ambiente, para ajustar posteriormente el pH hasta 7'2-7'3 mediante la adición de sosa 1N. Tras terminar el proceso se ajustaba el volumen a 100 ml con agua Milli-Q (MILLIPORE).

C.I.i: Material para realizar el método ELISA indirecto:

C.I.i.1: Microplacas: se emplearon microplacas de poliestireno cristalino de 96 pocillos con fondo plano, no esteriles (GREINER).

C.I.i.2: Micropipetas: ver apartado C.I.d.3.

C.I.i.3: Tampones: se emplearon los siguientes tampones en el sistema ELISA indirecto:

C.I.i.3.1: **Tampón de tapizado:** para resuspender el antígeno a la concentración adecuada se utilizó un tampón fosfato 0'01 M pH 7'2 (PBS).

C.I.i.3.2: **Tampón de lavado:** se trata de tampón fosfato 0'01 M con pH 7'2 al cual se le añadia Tween-20 (MERCK) al 0'01% (PBS-T).

C.I.i.3.3: **Tampón citrato:** para el sustrato se empleó un tampón citrato pH 4'5 que se obtenia de la forma siguiente:

Solución A:

* ácido cítrico (PANREAC) (0'11 M)..... 2'14 g
 * agua destilada..... 100 ml

Solución B:

* PO HNa₂.2H₂O (FLUKA) (0'1 M)..... 3'56 g
 * agua destilada..... 100 ml

Para su preparación se añade la solución B sobre la A hasta que se obtiene el pH de 4'5.

C.I.i.4: **Antígeno de tapizado:** se emplearon enterotoxinas crudas o altamente purificadas, según los casos (ver apartado C.I.g.2).

C.I.i.5: **Seroalbúmina bovina (Bovine Serum Albumin) (BSA):** para cubrir el plástico que quedara libre tras el tapizado con el antígeno, y así evitar reacciones inespecíficas por uniones de anticuerpos o conjugado al plástico, se empleaba BSA (SIGMA) al 3% en PBS.

C.I.i.6: **Anticuerpos monoclonales:** produjimos y empleamos en este estudio un total de 22 anticuerpos monoclonales, 14 de ellos producidos frente a la enterotoxina B, y denominados por una letra B inicial seguida de un número del 1 al 14, y 8 frente a la enterotoxina A, y denominados por una letra A seguida de un número del 1 al 8.

C.I.i.7: **Conjugado para el análisis de hibridomas:** se empleó polisúero de conejo anti-IgG de ratón (Rabbit anti

Mouse) (RAM) (NORDIC) al 1/1000 en PBS-T.

C.I.i.8: Conjugado para la determinación de subclase de IgG: se dispuso de suero anti subclase de IgG de ratón (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃) obtenido en oveja (SEROTEC) al 1:3200, 1:800, 1:400 y 1:800 en PBS-T, respectivamente.

C.I.i.9: Substrato: como substrato se empleó una mezcla de 40 mg o-Fenilendiamina Dihidrocloruro (OPD) (SIGMA), 80 ml de Tampón Citrato y 40 µl de Peróxido de Hidrógeno (PANREAC).

C.I.j: Material para la inmunotransferencia:

C.I.j.1: Geles de electroforesis: empleamos geles SDS comerciales, adecuados para el sistema de electroforesis rápido del que disponíamos ("Phast Gel gradient 8-25", PHARMACIA).

C.I.j.2: Tampones: se utilizaron tiras de tampones indicadas para los geles SDS que empleábamos ("Phast Gel SDS buffer strips", PHARMACIA).

C.I.j.3: Aplicadores de muestra: las muestras eran aplicadas sobre el gel de electroforesis por medio de peines adecuados para el empleo de 8 muestras distintas ("Phast Gel Sample Applicator 8/1", PHARMACIA).

C.I.j.4: Marcadores de peso molecular: se empleó un "kit" de calibración del tipo bajo peso molecular "LMW" (PHARMACIA).

C.I.j.5: Reactivos y tampones: los reactivos y tampones utilizados fueron los detallados en los siguientes apartados:

C.I.j.5.1: Tampón de transferencia: se utilizó un tampón de transferencia 25 mM Tris (MERCK), 192 mM glicina (MERCK), 20% metanol (MERCK), cuyo pH final era de 8.3. Este tampón no se debe ajustar con HCl, pudiendo ser conservado durante un mes a 4°C.

C.I.j.5.2: Tampón de bloqueo: se trata de un tampón

fosfato 0'01 M, NaCl 0'15 M con un pH de 7'1) al cual se le añadía Tween-20 al 0'5%. Todos los productos necesarios para la realización de este tampón son de la marca PANREAC.

C.I.j.5.3: Tampón de lavado: empleamos un tampón 0'15 M de cloruro sódico con el 0'5% de Tween-20. NaCl y Tween-20 son de marca PANREAC.

C.I.j.5.4: Substrato: como substrato se empleó una mezcla de 50 mg de Diaminobencidina (DAB) (SIGMA), 100 µl de Peróxido de Hidrógeno al 33% (PANREAC) y 100 ml de tampón fosfato 0,01 M-NaCl 0'15 M (pH 7'1).

C.I.j.5.5: Tampón de muestra: este tampón estaba formado por PBS 0'01 M-NaCl 0'15 M, pH 7'1, con el 10% de SDS (FLUKA) y 10% de mercaptoetanol (FLUKA), con 5 µl por cada 100 ml de tampón de una solución de azul de bromofenol (FLUKA) al 0'005%.

Para preparar la muestra para la realización de una electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida se añadieron 10 µl del tampón de muestra a 40 µl de la muestra, siendo así la concentración final de SDS y mercaptoetanol del 1%. Esta mezcla se introdujo en un tubo tipo Eppendorf y se sometió a un tratamiento térmico de 100°C durante 5 minutos. Esta muestra puede congelarse a -20°C.

C.I.j.5.6: Solución de tinción: se tenía que preparar dos soluciones:

* Solución "stock": se disolvió una tableta de "Phast Gel Blue R" (PHARMACIA) en 80 ml de agua destilada y se agitó durante 5-10 minutos. Posteriormente se añadieron 120 ml de metanol (PANREAC) agitándose durante 2-3 minutos, con lo cual obteníamos una solución final del 0'2%.

* Solución final: se realizó una mezcla 1:1 de la solución "stock" filtrada, con una solución al 20% de ácido acético (PANREAC) en agua destilada. Esta solución debe prepararse el mismo día de la realización de la electroforesis y no puede ser reciclada. Se prepararon 100 ml cada vez.

C.I.j.5.7: Solución de destañido: solución a base del

30% de metanol (PANREAC) y 10% de ácido acético (PANREAC) en agua destilada.

I.j.5.8: Solución de conservación: compuesta por el 10% de glicerol (PANREAC) y 10% de ácido acético (PANREAC) en agua destilada. Esta solución ayuda a mantener el gel flexible y resistente.

C.I.j.6: Toxinas y RAM: fueron las mismas que las utilizadas en el sistema ELISA indirecto.

C.I.j.7: Membranas inmovilizantes: se emplearon membranas de nitrocelulosa de la marca SCHLEICHER y SCHULL.

C.I.j.8: Material para la separación del gel de electroforesis: se utilizó un taco de madera lo más liso posible y cuerda de piano con un diámetro de 0'2 mm.

C.I.k: Material para ELISA doble "sandwich" (DAS):

El material empleado en este sistema era idéntico al utilizado en el sistema indirecto, exceptuando en que el tampón de tapizado en el que se diluían las globulinas era un tampón carbonato-bicarbonato 0'1 M pH 9'6, y que se obtenía tal y como se indica a continuación:

Solución A:

* CO_3HNa 1'68 g
* agua destilada..... 200 ml

Solución B:

* CO_3Na_2 1'06 g
* agua destilada 200 g

Se añade la solución B sobre la A con agitación constante, hasta que se alcance el valor de pH de 9'6.

C.I.l: Material para la extracción de EE de alimentos:

C.I.l.1: Alimentos: se probaron 3 tipos de alimentos:

leche entera UHT, yogur natural y salchichas cocidas y ahumadas, que fueron contaminadas con 10 μ g totales de enterotoxina B, para luego proceder a la extracción de la misma.

C.I.1.2: Bolsas para Stomacher: se utilizaron bolsas para Stomacher 400 de la marca SEWARD MEDICAL, en las cuales se introdujo el producto carnico.

C.I.1.3: Otros: también se necesitaron ClH 6 N, NaOH 5N, PEG 20000 (SERVA) y tubos de diálisis ("Viking Dyalisis Tubing" 20/32, SERVA).

C.I.m: Aparatos:

Contamos con los siguientes aparatos relevantes para la realización del presente trabajo:

- * Agitador magnético termostatzado (SELECTA, mod. Agimatic).
- * Centrifuga con refrigeración (SORVALL INSTRUMENTS, mod. RC5B).
- * Colector de Fracciones (PHARMACIA, mod. Frac 100).
- * Espectrofotómetro (HITACHI, mod. 150/20).
- * Campana de Flujo Laminar Horizontal (TELSTAR)
- * Campana de Flujo Laminar Vertical (ESI-FLUFRANCE, mod. Miniflux).
- * Incubador de CO₂ con paredes de cobre y autocero de CO₂ (HERAEUS, mod. B5061 EC/CO₂).
- * Baño termostatzado (BRAUN, mod Thermomix 1442 D).
- * Centrifuga de mesa con rotor orbital para tubos de 50 ml sin regulador de temperatura (ORTO, mod. Tornax).
- * Sistema de pipetaje con filtro de aire (TECNOMARA, mod. Pipet-Boy).
- * Bomba Pulsátil sin regulación de flujo (MILLIPORE, n° de catalogo xx80 202 30).
- * Sistema rápido de electroforesis ("Phast System", PHARMACIA), consistente en una unidad de separacion y control, y una unidad de desarrollo.
- * Cubeta de transferencia (LKB).
- * Lector de ELISA automatico con longitud de onda

variable (DYNATECH, mod. MR 580).

* Shaker con regulación de temperatura (LAB LINE INSTRUMENTS).

* Microscopio Invertido (LEITZ).

* Arcón congelador de -80°C (KOXKA).

* Centrifuga de mesa para Eppendorf (SORVALL INSTRUMENTS, mod. Micro Spin 12).

* Lector de pH (CRISON, mod. 414).

* Balanza digital (SARTORIUS, mod. 1475 MP8-2).

* Stomacher (COLWORTH, mod. 400)

C.II. METODOS

C.II.a: Cultivo:

Expandíamos las células de mieloma en medio DMEM-HT con el 15% de FCS, por ser mucho más sencillo tener un único tipo de medio de cultivo que producir dos distintos o tener que suplementar el DMEM con Hipoxantina y Timidina, aunque el mieloma no necesita de estos suplementos. Los hibridomas necesitan la presencia en el medio de cultivo de Hipoxantina y Timidina, a no ser que se acostumbren progresivamente a concentraciones decrecientes y posterior ausencia. Esto puede realizarse siempre y cuando se haya eliminado totalmente la Aminopterina acumulada intracelularmente, aunque no siempre llegan a acostumbrarse.

A la hora de cultivar híbridos en medio selectivo, el DMEM-HT se suplementaba con Aminopterina (a partir de una solución 100x). Normalmente la Aminopterina se suprimía tras la segunda clonación, manteniéndose a partir de aquí los híbridos en DMEM-HT y FCS.

Para realizar los pases, calentábamos tanto el DMEM-HT como el FCS en el baño termostático hasta 37'5°C durante unos 20 minutos (a partir de ahora siempre que se hable de medio DMEM-HT y FCS se dará por supuesto que éstos se encuentran a unos 37°C). Tras este tiempo se mezclaban DMEM-HT y FCS al 15% en una botella. Tras ello se tomaba la botella con el cultivo (que debía estar en fase exponencial,

con células con aspecto sano y normal y sin formar un tapiz excesivamente denso) y con una pipeta se tomaba medio de cultivo y se iba lavando poco a poco el área de crecimiento de la botella de cultivo con el fin de desprender las células de dicha superficie. Este proceso se realizaba de manera suave, sin formar burbujas y tratando de recorrer toda la superficie de crecimiento.

Tras 10 ó 15 lavados, mediante una micropipeta se tomaban unos 200 μ l de medio con células que se pasaban a la botella con 10 ml de medio fresco, y se incubaban (6% de CO_2 y 37°C con el 98% de humedad relativa) con el tapón ligeramente suelto para permitir el paso de gases.

Observábamos el cultivo diariamente con el microscopio invertido, y cuando era necesario se realizaba otro pase bien a botella pequeña o a grande si se necesitaban cantidades mayores.

Nosotros optamos por no realizar cultivos de mantenimiento (con menor cantidad de suero), decidiéndonos a congelar las células siempre que no las necesitáramos, evitándose así los riesgos de un cultivo continuado (contaminación, pérdida de sensibilidad a la Aminopterina, etc.).

Cada dos o tres meses se añadía al medio de cultivo normal 8-Azaguanina (a partir de una solución 100x) para eliminar las posibles variantes HGPRT +, y que así todas las células fueran sensibles a la Aminopterina.

C. II. b: Inmunización:

El protocolo de inmunización que seguimos era el detallado en la Tabla C.1.

Cada animal (ratones hembra de 8-12 semanas de edad) se inculaba intraperitonealmente con 500-600 μ l de la mezcla inmunizante, compuesta por Adyuvante de Freund (Completo en la primera inoculación e Incompleto en las restantes realizadas por vía intraperitoneal) y Solución

Salina (relación 1'2:1), a las cuales se añadía la cantidad necesaria de SET partiendo de una solución de 1 mg/ml.

Para homogeneizar la mezcla disponíamos de dos jeringuillas de plástico de 5 ml (cono Luer) y de dos agujas totalmente metálicas cuyas puntas habían sido soldadas sin obstruir su abertura, de esta manera se pasaba la mezcla de una jeringa a otra homogeneizándose en poco tiempo, tras lo cual se inculaba a los ratones.

Para realizar la última inmunización (intravenosa) se tomaba la cantidad necesaria de SET en una jeringuilla de insulina. Introducíamos el ratón en un embudo sacando la cola por fuera del mismo, apoyándola en la mesa y tirando ligeramente de ella, teniendo cuidado de no presionar el embudo. Con un algodón empapado en xilol (PANREAC) se dilataban las venas caudales y posteriormente inculábamos lentamente la suspensión antigénica. Tras 3-5 días se procedía a realizar la fusión.

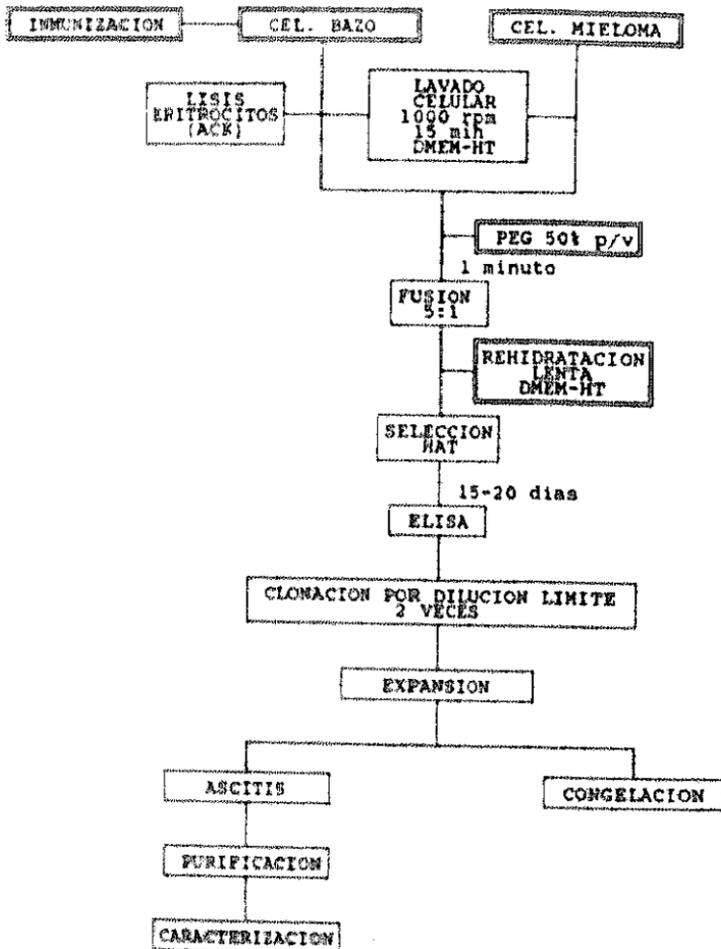
C.II.C: Fusión:

Tras realizar la inoculación final al ratón, preparábamos las células de mieloma para el día de la fusión. Aquí empezábamos a aplicar el protocolo de producción de anticuerpos monoclonales que se resume en la Figura C.1. Con anterioridad debíamos comprobar su sensibilidad a la Aminopterina, ver que presentaban una aspecto macroscópico normal y que se multiplicaban con normalidad.

Como regla general preparábamos 3 botellas grandes de cultivo, lo que suponía $3-4 \times 10^7$ células de mieloma.

Lo primero que necesitábamos era obtener las células peritoneales que emplearíamos como células "Feeder Layer". Para ello sacrificábamos un ratón por dislocación del cuello y separando la piel por la línea blanca dejábamos al descubierto la pared abdominal. Con una jeringuilla y tras limpiar la musculatura abdominal con Solución Salina estéril, inculábamos 5 ml de Solución Salina en la cavidad

Figura C.1: Diagrama de flujo de la producción de anticuerpos monoclonales.



abdominal. Durante 5 minutos dábamos masajes suaves a la pared abdominal para mejorar el efecto de lavado de la Solución Salina sobre el peritoneo. Posteriormente, se succionaba la Solución Salina con una jeringuilla de 5 ml, teniendo cuidado de no dañar ningún asa intestinal para así evitar contaminaciones. En la Solución Salina que introducíamos en un tubo de centrifuga estéril se encontraban gran cantidad de macrófagos peritoneales, pero también otras células.

Estos macrófagos se añadirían de forma previa al proceso de emplacamiento de los productos de la fusión, como ya veremos más adelante. No obstante estos macrófagos debían lavarse con DMEM-HT antes de su uso. El lavado consistía en añadir al tubo de centrifuga aproximadamente 20 ml de DMEM-HT, centrifugándolo a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminaba y la operación se repetía una vez más.

El siguiente paso era obtener el bazo del animal inmunizado. Para ello sacrificábamos el animal por descervicación, inmovilizándolo seguidamente en una tabla de corcho mediante unos alfileres. Tras desinfectar la piel con alcohol de 90° y lavarla seguidamente con Solución Salina estéril, procedíamos a separar la piel realizando un corte por la línea blanca. Una vez separada, lavábamos la pared abdominal con Solución Salina estéril, abriéndola inmediatamente de forma aséptica. Una vez que la cavidad abdominal estaba al descubierto, realizábamos una rápida inspección visual para comprobar que el aspecto de la misma era normal, y seguidamente procedíamos a la localización y extracción del bazo que se depositaba en una Placa de Petri estéril de 15 mm de diámetro (GREINER). A esa placa y a otras cuatro similares se les añadía 4 ml de DMEM-HT con el fin de lavar la superficie del bazo. El bazo era pasado suavemente de una placa a otra con ayuda de unas pinzas que previamente habían sido introducidas en alcohol de 90° y luego flameadas para eliminarlo.

Una vez que el bazo estaba situado en la quinta placa,

tomábamos una rejilla esterilizada en autoclave y la depositábamos debajo del bazo. Con la ayuda del embolo de goma de una jeringuilla de plástico de 5 ml y unas pinzas rompíamos el bazo, actuando la rejilla como un tamiz, obteniéndose así células sueltas. La operación se daba por concluida al observar la inexistencia de grumos, retirándose seguidamente la rejilla, encima de la cual se encontraban restos de tejido conectivo y acumulos grasos del bazo.

Esta suspensión de células de bazo en DMEM-HT era traspasada mediante una pipeta a un tubo de centrifuga, realizando dos lavados más de la placa de ruptura con DMEM-HT para recoger más células. Una vez traspasado todo al tubo de centrifuga, se completaba con DMEM-HT hasta 45 ml aproximadamente. En este momento se añadía 1 ml de la solución de lisado de eritrocitos ACK, dejándola actuar aproximadamente 2 minutos tras los cuales se centrifugaba el tubo, tal y como veremos más adelante.

Simultáneamente se recogían las células de mieloma mediante lavados de la superficie de crecimiento de las botellas con la ayuda de una pipeta de 10 ml, procurando recorrer toda la superficie. Una vez que observábamos que la pared de la botella se encontraba limpia, se trasladaba el contenido de las botellas a dos botes de centrifuga, completándose el volumen hasta 45 ml con DMEM-HT.

Una vez que las células de mieloma y las esplénicas estaban en sus respectivos tubos, se realizaba una centrifugación de 10 minutos a 1000 rpm y temperatura ambiente. Tras ello, se eliminaba el sobrenadante y se rompía el sedimento agitando ligeramente los tubos, añadiéndose unos 45 ml de DMEM-HT. En el caso de las células de mieloma, en este primer lavado, añadíamos primero unos 10 ml de DMEM-HT a uno de los tubos, y tras agitarlo un poco se pasaba el contenido al otro tubo, completándose entonces el volumen hasta 45 ml con DMEM-HT y se llevaban a centrifugar.

Este proceso de lavado se realizaba tres veces, y tenía como objeto eliminar el Suero Fetal Bovino en el caso de las células de mieloma, y grasa y los productos del lisado de

los eritrocitos en el caso de las células de bazo.

Tras realizar todos los lavados, contábamos las células de bazo y de mieloma de que disponíamos, para lo cual resuspendíamos el sedimento en una cantidad conocida de DMEM-HT (5 ml para las células de mieloma y 10 ml para las de bazo ya que su número es mucho mayor y con ello facilitamos el recuento).

Para contar ambos tipos de células, así como los macrófagos, y para hacernos una idea aproximada (aunque no exacta) del número de células viables, mezclábamos 100 µl de la suspensión de células de mieloma con 100 µl de Tripán Azul (1:1) y 100 µl de células de bazo con 400 µl del mismo colorante (1:4). Para contar nos valíamos de una cámara de Thoma (BRAND). Tras realizar el recuento al microscopio invertido y obtener la media de las diversas cuadrículas contadas de la malla de la cámara (se contaban las cuadrículas más pequeñas de que consta esta cámara), obteníamos la cantidad total de cada uno de los tipos celulares gracias a la siguiente fórmula:

$$n = a \times 16 \times 10 \times 1000 \times b \times c$$

donde a es la media del recuento, b la inversa de la dilución realizada (2 en mieloma y 5 en bazo) y c el número de mililitros de DMEM-HT (5 en mieloma y 10 en bazo).

El recuento de macrófagos se realizaba tras resusponderlos en 1 ml de DMEM-HT y mezclar 100 µl de los mismos con 100 µl de Tripán Azul.

Una vez que sabíamos el número de células de mieloma y de bazo, las mezclábamos en una proporción 1:5 (1 célula de mieloma por cada 5 de bazo) y procedíamos a realizar la fusión.

Para preparar el PEG, pesábamos 2 g del mismo y los añadíamos a un tubo de cristal que tenía 2 ml de DMEM-HT. Para homogeneizar la mezcla, calentábamos el tubo a unos 60°C durante unos 5 minutos para que el PEG pasara a fase

líquida. Una vez conseguido se homogeneizaba bien agitando el tubo y se esterilizaba a través de un filtro acoplable a jeringuilla (0'22 µm) (MILLIPORE) pasándolo a un tubo de vidrio con tapon de goma esterilizados por autoclave.

Para realizar la fusión tomábamos 1 ml de la solución de PEG y lo añadíamos a la mezcla celular durante 1 minuto, gota a gota, haciendo que estas resbalasen por toda la pared del tubo mientras que éste se giraba lentamente. A continuación, y de forma muy lenta, se iba realizando el proceso de rehidratación con DMEM-NT. Así, los primeros 5 ml se añadían gota a gota, de la misma forma que el PEG, y a la misma velocidad (1 ml por minuto). Los siguientes 10 ml eran añadidos del mismo modo pero doblando la velocidad (aproximadamente 2 ml cada minuto). El resto del DMEM-NT (hasta un volumen de 45 ml) se añadía ligeramente más rápido, pero siempre resbalando por las paredes del tubo mientras se giraba el mismo lentamente.

En este proceso de rehidratación, resulta más importante realizarlo de forma lenta y suave, que el estricto respeto de los tiempos.

Una vez concluida la rehidratación, los híbridos se dejaban a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo que se centrifugaban a 1000 rpm durante 10 minutos y temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se eliminaba el sobrenadante y los productos de la fusión se resuspendían en el medio selectivo que estaba formado por:

- * FCS-M: 20%
- * DMEM-NT
- * Aminopterina (a partir de stock 100x)
- * Macrófagos: 500 células por pocillo

Todo ello para el volumen necesario para que al emplazar las células obtuviéramos un total de 200.000 células y 200 µl por pocillo. Así tras ello, se emplacaban en las microplacas de 96 pocillos con ayuda de una micropipeta de 8 canales y puntas estériles, llevándose dichas placas a la estufa de CO₂.

Los primeros días no se manipulaban las placas, procurando abrir el incubador lo menos posible (siempre que el resto del trabajo lo permitiera) para evitar en lo posible grandes alteraciones en los factores ambientales (temperatura, humedad y concentración de CO_2), lo que es perjudicial para el correcto desarrollo de los híbridos.

Tras una semana ya se podían realizar observaciones microscópicas para comprobar el crecimiento de los híbridomas, teniendo siempre una gran precaución a la hora de manejar las placas.

C.II.d: Detección de híbridos secretores: (Figura C.2)

Ya a partir de los diez días se podía realizar un chequeo para identificar aquellos pocillos que poseían híbridos productores de anticuerpos específicos frente a la enterotoxina con la que fue inmunizada la ratona con cuyo bazo se realizó la fusión.

Nosotros empleamos el sistema ELISA indirecto consistente en los siguientes pasos:

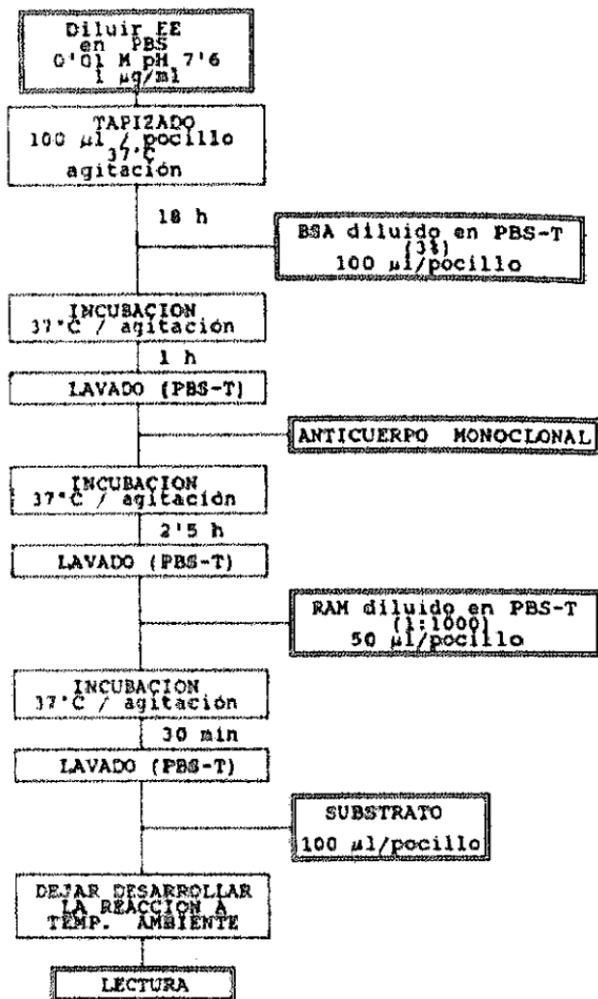
- * Tapizábamos los pocillos de las placas de ELISA con 100 μl de una solución de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (en PBS) del antígeno homólogo empleado en la inmunización. Las placas se incubaban toda la noche a 37°C en agitación dentro de una cámara húmeda.

- * Se volcaba el contenido, y sin lavar se añadían 100 μl de una solución de BSA al 3% en PBS, procediéndose a su incubación, a 37°C en agitación y en cámara húmeda, durante 1 hora.

- * Se volcaban las placas para vaciarlas y se realizaban 3 lavados de aproximadamente 1'5 minutos cada uno con PBS-T. Tras secar las placas golpeando las mismas sobre un papel filtro, se añadían entre 75-100 μl del sobrenadante de los híbridomas incubando las placas en cámara húmeda y en agitación durante 2'5 horas a 37°C.

- * Se vaciaban las placas, lavándolas posteriormente 3 veces con PBS-T y secándolas a continuación.

Fig. C.2: Diagrama de flujo de la secuencia de pasos en el método ELISA indirecto.



Inmediatamente se añadía el conjugado comercial consistente en Inmunoglobulinas de Conejo anti-IgG de Ratón a una dilución 1/1000 en PBS-T (50 µl de conjugado por pocillo) y se llevaban las placas a incubar a 37°C en agitación y en cámara húmeda durante 30 minutos.

* Se vaciaban los pocillos y se lavaban las placas entre 8 y 10 veces, añadiéndose tras secar las placas 100 µl de sustrato, dejándolo reaccionar durante 10-15 minutos aproximadamente. Una vez desarrollada la reacción, las reacciones se medían en el lector automático de ELISA a 450 nm.

Este proceso se realizaba dos veces con un intervalo de 7-10 días (tras cada uno de ellos se añadían 100 µl de medio nuevo a cada pocillo) para confirmar los pocillos positivos.

C.II.e: Clonación por dilución límite:

Una vez determinados los pocillos que poseían híbridos secretadores de anticuerpos frente a la EE en cuestión, necesitamos realizar la clonación para asegurarnos de que el anticuerpo producido era monoclonal. Las clonaciones las realizamos por el sistema de dilución límite.

Para ello el día anterior a la clonación calculábamos el número de placas que se iban a necesitar, teniendo en cuenta que se empleaban 12 pocillos por híbridoma a clonar. Ese día se extraían de un ratón sano células peritoneales, tal y como se describió en el apartado C.II.e. Tras realizar los lavados y el recuento, se emplacaban a razón de 500 células por pocillo en 50 µl de DMEM-NT con el 20% de FCS-M y Aminopterina.

Tras dejarlos hasta el día siguiente en el incubador de CO₂, se procedía a realizar la clonación de los híbridomas efectuando sucesivas diluciones dobles. Así, se tomaban 50 µl del pocillo original (tras remover varias veces con la micropipeta el medio, desprendiendo de esta manera los híbridos del fondo del pocillo) y se pasaban al primer

pocillo de la placa de clonación, mezclando bien el contenido y pasando el contenido al siguiente pocillo, y así sucesivamente hasta completar toda la serie.

Una vez realizado el proceso con todos los híbridos seleccionados, se añadian 100 µl de medio fresco (DMEM-MT con Aminopterina y suplementado con el 20% de FCS-M), trasladando las placas al incubador. Tras 10-15 días se realizaba el testaje tal y como se describió en el apartado C.II.d, teniendo en cuenta que los primeros pocillos presentaba un marcado sobrecrecimiento.

El pocillo positivo de dilución más alta, era reclinado por la misma técnica una vez más y esta clonación analizada de a los 10-15 días.

C.II.f: Expansión de los clones:

El primer paso, para el cual elegíamos el pocillo positivo con la dilución más alta de la segunda clonación, consistía en trasladar el clon a una placa de mayores dimensiones, como paso intermedio al cultivo en botella. Esta placa tenía 24 pocillos. Para realizar el proceso, bien el día anterior añadianos 0'5 ml de DMEM-MT con o sin Aminopterina y con el 20% de FCS normal y con 1000 células peritoneales por pocillo, o bien preparábamos la placa el mismo día de la expansión de igual forma pero sin macrófagos.

En cualquier caso, una vez lista la placa, tras remover varias veces el pocillo elegido, se pasaban 100 µl de dicho pocillo a uno de los de la placa de 24 pocillos. Tras haber pasado todos los clones seleccionados se añadía 1 ml de medio DMEM-MT con o sin Aminopterina y el 20% de FCS.

Tras unos días, y cuando el clon estaba lo suficientemente desarrollado, se procedía a dar el pase a una botella de cultivo tisular pequeña. Para ello añadianos 9 ml de medio a la botella (DMEM-MT sin Aminopterina con el 20% de FCS) y pasábamos 1 ml de medio con células del híbrido tras remover el cultivo del pocillo con una pipeta y lo llevábamos a la

estufa, abriendo ligeramente el tapón para permitir el paso de gases.

Tras esto, realizábamos los pases de forma idéntica, pero trasvasando tan solo 0'5 ml de cultivo a la botella nueva y con el 15% de FCS.

Normalmente tras 4-7 pases el clon estaba completamente estabilizado para el cultivo, y podía ser expandido a botellas mayores para ser congelado o inoculado intraperitonealmente a ratones.

C.II.g: Congelación celular:

Una vez que obteníamos la/s botella/s necesarias con células sanas y en fase de crecimiento exponencial (tanto células de mieloma como hibridomas), procedíamos a separarlas del plástico con la ayuda de una pipeta y depositábamos el medio y las células en un tubo de centrifuga. Tras centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente se eliminaba el sobrenadante y se rompía el sedimento celular agitando el tubo, tras lo que se añadían 3 ml de la mezcla de congelación (FCS con DMSO al 10%) en el caso de tratarse de células procedentes de una botella grande de cultivo o 1 ml si lo eran de una botella pequeña. La mezcla de congelación se añadía gota a gota, procurando que resbalara por la pared del tubo y girando lentamente éste.

Realizado esto se pasaba a los tubos de congelación convenientemente rotulados con la identificación del híbrido y la fecha de congelación, a razón de 1 ml de medio de congelación con células por tubo, para inmediatamente depositar los criotubos en un arcón congelador a -80°C durante 18 horas y luego trasladados directamente a Nitrógeno líquido para su conservación, o manteniéndolos a -80°C permanentemente.

C.II.h: Descongelación:

Se extraía el criotubo del Nitrógeno líquido o del

arcón congelador de -80°C y rápidamente se descongelaba agiténdolo suavemente en un baño a 37°C. Una vez descongelado, se volcaba el contenido en un tubo de centrifuga y se añadían 10 ml de DMEM-NT gota a gota, resbalando por las paredes del tubo y girando este suavemente. El resto del DMEM-NT hasta 45 ml se añadía de forma rápida. Con este lavado intentábamos eliminar el DMSO. Tras centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, eliminábamos el sobrenadante y rompíamos el sedimento agitando el tubo. Seguidamente añadíamos 10 ml de DMEM-NT con el 20% de FCS y tras pasábamos células y medio a una botella de cultivo tisular, que llevábamos a la estufa.

C.II.1: Producción de ascitis:

Para producir anticuerpos monoclonales en grandes cantidades recurrimos a la inducción de tumores ascíticos en ratones BALB/c (machos y hembras), para lo que pretratábamos los ratones inoculando 0.5 ml de Adyuvante Incompleto de Freund entre 1 y 3 días antes de pinchar los hibridomas.

Tras comprobar el estado celular por observación directa bajo el microscopio invertido, desprendíamos las células de la pared de la botella, y las centrifugábamos a 1000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y tras eliminar el sobrenadante, se procedía a su recuento, y se resuspendían en DMEM-NT, de tal manera que en 0.5 ml se encontraran $1-3 \times 10^6$ células, cantidad que iba a ser inoculada en cada ratón.

Traspasábamos las células en DMEM-NT a una jeringuilla de 5 ml y se inoculaban 0.5 ml de la suspensión a cada ratón.

Normalmente a partir de los 7-10 días ya se podía recoger líquido ascítico, lo que hacíamos mediante una aguja de 0.9 X 25 mm (VENOJET). Otras veces sacrificábamos al animal en vez de realizar extracciones sucesivas. El líquido ascítico se distribuía en alícuotas en tubos para Eppendorf de 1.5 ml (GREINER) y almacenados a -80°C hasta su purifica-

ción.

C.II.j: Purificación y almacenamiento:

Para purificar la ascitis, primero descongelábamos los tubos Eppendorf, tras lo que centrifugábamos 15 minutos en la centrífuga para dichos tubos, para así eliminar los materiales no deseados de la ascitis y recoger el sobrenadante de todos los tubos. Tras juntarlos, comenzábamos el proceso de purificación propiamente dicha.

El primer paso consistía en añadir al líquido ascítico un volumen idéntico de agua destilada y otro volumen igual de Sulfato Amónico a saturación calentado previamente al baño maría a 100°C y dejándolo enfriar a temperatura ambiente.

El agua destilada se añadía sin ninguna precaución especial, poniéndose la mezcla a agitar con una barrita magnética. El Sulfato Amónico era añadido gota a gota de la manera más lenta posible, y una vez que éste se había enfriado lo suficiente.

Una vez terminado el proceso se pasaba todo el líquido a tubos de centrifuga y se dejaban reposar 18 horas a 4°C, tras lo que se centrifugaba a 3000 rpm durante 20 minutos a 10°C. Al finalizar la centrifugación se eliminaba el sobrenadante y se resuspendía el sedimento en 5 ml de PBS, pH 7-7'2, dializándolo a 4°C durante 18 horas en el mismo PBS en una tripa de diálisis ("Visking Dyalisis Tubing 8/32", SERVA). A continuación se fraccionaba por gel filtración a través de una columna con resina Sephadex G 200 (PHARMACIA).

Medíamos la absorbancia de las diversas fracciones a 280 nm y concentrábamos los picos en PEG 20000 (SERVA) tras introducirlos en una tripa de diálisis ("Visking Dyalisis Tubing" 20/32, SERVA).

La actividad de los picos (presencia de anticuerpos monoclonales) se comprobaba por el sistema ELISA indirecto (ver apartado C.II.d). La fracción positiva se distribuía en

alícuotas en tubos Eppendorf (1 ml en cada uno) y se almacenaba a -80°C hasta su empleo.

No obstante la mayoría de los anticuerpos monoclonales fueron parcialmente purificados por precipitación simple con Sulfato Amónico y diálisis posterior, como se ha descrito más arriba.

C.II.k: Determinación del título:

Determinamos el título y las curvas de dilución de cada anticuerpo monoclonal, mediante ELISA, tal y como se describió anteriormente. Se analizaron diluciones dobles seriadas de cada anticuerpo monoclonal en PBS a partir de una dilución 1:10 previa en este mismo tampón. También se determinaron ambos factores tapizando las placas con $1\ \mu\text{g}$ de EE por pocillo (10 veces más que anteriormente) [81]. Esta prueba también fue realizada con ascitis, pero en este caso las placas se tapizaron con $0.1\ \mu\text{g}$ de EE exclusivamente, y se realizaron diluciones decimales de dicha ascitis en PBS. Definimos como título la máxima dilución a la que se producía una absorbancia ≥ 0.1 .

C.II.l: Determinación de clase y subclase de IgG:

Empleamos RAM específico para cada subclase de IgG de ratón en la técnica ELISA descrita anteriormente. Cada RAM se diluyó siguiendo las instrucciones de la casa comercial en PBS-T a las concentraciones que a continuación se indican:

- * IgG₁ : 1:3200
- * IgG_{2a} : 1:800
- * IgG_{2b} : 1:400
- * IgG₃ : 1:800

Sólo se analizó una concentración de cada anticuerpo monoclonal, según los resultados obtenidos en la determinación del título.

C.II.m: Determinación de reacciones cruzadas:

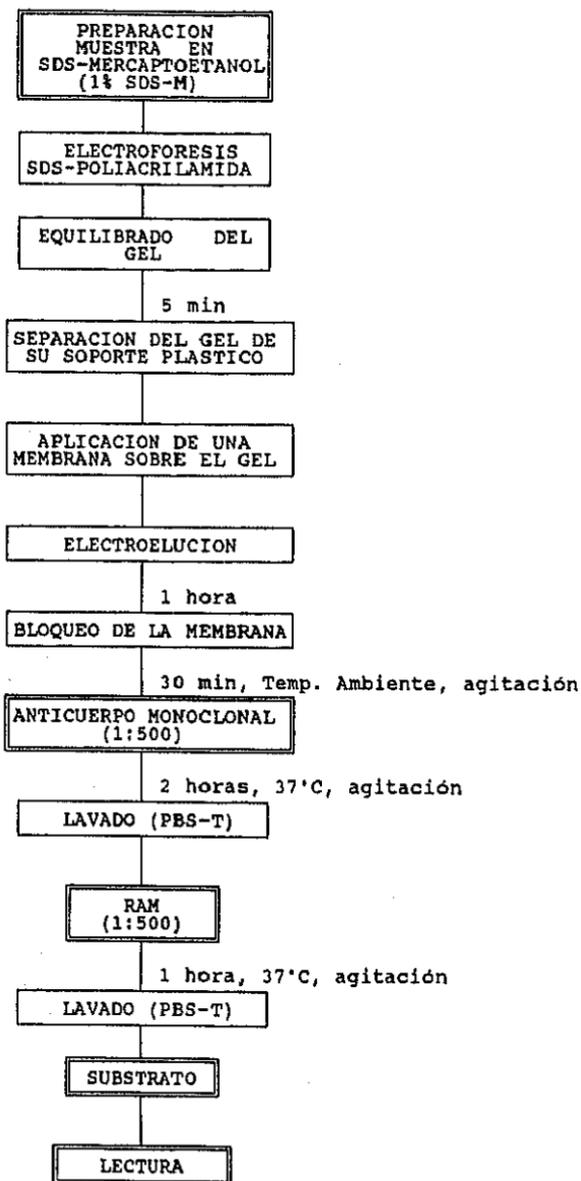
C.II.m.1: ELISA: se trató de determinar las posibles reacciones de cada anticuerpo monoclonal con los serotipos heterólogos en el sistema ELISA. Para ello se tapizaron las placas con 100 μ l de una solución de 1 μ g/ml de enterotoxina cruda, realizándose a continuación el ELISA de forma normal, como ha sido detallado anteriormente.

C.II.m.2: Inmunotransferencia: esta técnica esta compuesta por los siguientes pasos: (Figura C.1)

C.II.m.2.1: Electroforesis: la electroforesis se realizó siguiendo las instrucciones del "Phast System":

- * enfriar la cama de los geles hasta los 15°C. Esta cama se encuentra en la unidad de separación y control.
- * añadir 100 μ l de agua destilada en la zona de colocación de los geles.
- * extraer el gel de su envoltura y separarlo de la cubierta protectora de plástico mediante la utilización de pinzas.
- * depositar el gel en el lugar correspondiente de la unidad de separación y control, evitando que se formen burbujas de aire al deslizar dicho gel por encima del agua destilada, secando posteriormente con la ayuda de papel filtro la zona que bordea el gel.
- * colocar el soporte de las pastillas de tampón, introduciendo posteriormente dichas pastillas empleando guantes de látex para no pasar proteínas de las manos.
- * bajar la unidad de electrodos y comprobar que estos contactan con las pastillas de tampón.
- * cortar un trozo de Parafilm y aplicarlo sobre el molde de las muestras con el empleo de guantes, para producir unas depresiones en el Parafilm en las cuales depositamos las muestras (aproximadamente 5 μ l por pocillo) evitando que al realizarlo se formen burbujas.
- * depositar el peine aplicador de muestras sobre las mismas, ascendiendo estas por capilaridad (1 μ l de cada una de ellas).

Fig. C.3: Diagrama de flujo de la secuencia de pasos en la inmunotransferencia.



- * colocar el aplicador de muestras en el lugar correspondiente de la unidad de separación y control.
- * realizar la electroforesis durante unos 30 minutos bajo las siguientes condiciones: 250 v, 10 mA, 15°C y 65 vh.

Todas las muestras sometidas a este proceso se encontraban a una concentración de 5 µg/ml si ese gel se iba a someter a una posterior transferencia. Si sólo se iba a realizar una electroforesis, las muestras (incluido el marcador de peso molecular) tenían una concentración de 50 µg/ml.

La detección de proteínas en el gel se realizó mediante el método de azul de Coomassie. En este sistema las soluciones empleadas actúan tiempos variables sobre el gel:

- * solución de tinte: 8 minutos
- * solución de lavado/destinte: 5 minutos
- * solución de lavado/destinte: 8 minutos
- * solución de lavado/destinte: 10 minutos
- * solución conservadora: 5 minutos

Todo el proceso, incluyendo los pasos anteriormente citados duraba aproximadamente 40 minutos y se realizaba a 50°C.

C.II.m.2.2: **Transferencia:** para realizar la electroelución y la inmunodetección se siguió la metodología de Towbin et al. [272], con las variantes adecuadas para su optimización.

C.II.m.2.2.a: **Electroelución:** tras finalizar la electroforesis se procedió a la electroelución, proceso que consta de los siguientes pasos:

- * equilibrado del gel en el tampón de transferencia durante 5 minutos
- * colocación del gel sobre un soporte de madera recubierto de papel filtro, fijándolo al mismo mediante chinchetas, procediendo a retirar con una espátula la parte del gel situada por encima del frente y así mismo la zona de empaquetamiento del principio del gel.

* separación del gel de su soporte plástico con una cuerda de piano, comenzando dicha separación por la parte del gel con más alta concentración de poliacrilamida y terminando en la zona de empaquetamiento.

* aplicación del gel sobre una membrana de nitrocelulosa previamente equilibrada en tampón de transferencia, y este conjunto entre dos papeles de filtro humedecidos en tampón de transferencia. Todo ello es colocado entre dos palas de esponjas, e introducido en la cubeta de transferencia, siempre con el gel en el lado del cátodo y la membrana en el del ánodo, ya que las proteínas migran desde el polo negativo al positivo.

La electroelución se realizó a 60 voltios, considerándose terminada tras una hora.

C.II.a.2.2.B: Inmunodetección: tras finalizar la electroelución se separó el gel de la membrana y se procedió a realizar el bloqueo de la misma incubándola en tampón de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. La inmunodetección propiamente dicha constó de los siguientes pasos:

* incubación de la membrana durante 2 horas a 37°C y en agitación con el anticuerpo monoclonal a una dilución 1:500 en tampón de bloqueo, preparada inmediatamente antes de su uso.

* tras el paso anterior se procedió lavar la membrana 3 veces en la solución de lavado. Cada lavado duró 5 minutos y se realizaba a temperatura ambiente y en agitación.

* incubación de la membrana en una solución 1:500 de conjugado realizada en tampón de bloqueo, durante 1 hora a 37°C y en agitación. Se empleó suero anti-inmunoglobulinas de ratón obtenido en conejo marcado con peroxidasa.

* proceso de lavado idéntico al descrito más arriba

* inmersión de la membrana en el sustrato. Esta

solución se preparó momentos antes de ser empleada, no pudiendo ser reciclada.

C.II.n: Determinación de la capacidad de detección de EE homóloga:

Esta prueba se realizó por el sistema de ELISA indirecto. Para ello se procedió al tapizado de las placas de ELISA con 100 μ l de varias concentraciones de la enterotoxina frente a la que fueron producidos los anticuerpos monoclonales de este estudio. Las concentraciones de enterotoxina empleadas fueron 1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 ng/ml. También se analizó el comportamiento de cada anticuerpo monoclonal ante la ausencia de enterotoxina, para lo que los pocillos dedicados a este efecto se rellenaron con PBS-T. Esta etapa de tapizado sufrió el mismo proceso de incubación que el descrito para los demás ELISAs indirectos. Cada anticuerpo monoclonal fue empleado a la concentración habitual, completándose el ELISA de la forma habitual.

C.II.ñ: Prueba de inhibición de la unión a la EE homóloga:

La estimación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales por el antígeno fue realizada por ELISA indirecto. Para ello se emplearon placas de microtitulación tapizadas con 100 μ l de una solución de 1 μ g/ml de EE.

Para poder comprobar esta característica enfrentamos 200 μ l de cada monoclonal a concentración doble de lo normal con 200 μ l de diversas soluciones de enterotoxina (1, 10, 100 y 1000 ng/ml), para que de esta manera la concentración final del anticuerpo fuera la rutinaria. Como referencia se mezclaron 200 μ l de los monoclonales con un volumen idéntico de PBS. Estas mezclas se incubaron durante 1'5 h en agitación a 37°C. Tras este periodo fueron añadidas por triplicado a las placas de ELISA, realizando el resto del proceso de manera normal.

Tras la lectura, se calculó la constante de disociación

(K) mediante la fórmula descrita por Friguat et al. [98], para anticuerpos poco purificados. La fórmula es la siguiente:

$$\frac{A - A'}{A} \times \frac{1}{a} = \frac{1}{KD} \times \left\{ 1 - \left(\frac{A - A'}{A} \right) \right\}$$

donde A es la lectura obtenida sin mezclar con antígeno, A' es la obtenida tras incubar con la toxina y a es la concentración de anticuerpo.

C.II.o: Determinación de la validez del anticuerpo para tapizar:

Previamente se determinó el porcentaje de proteína según la fórmula siguiente:

$$\text{mg/ml proteína} = \frac{\text{densidad óptica (280 nm)}}{1'38} \times \frac{1}{\text{dilución}}$$

La validez o no de un anticuerpo monoclonal para realizar labores de captura de enterotoxinas en la prueba ELISA se realizó de la forma siguiente: se tapizaron las placas de microtitulación con una solución de 10 µg/ml de cada anticuerpo en tampón carbonato-bicarbonato 0'1 M pH 9'6, incubando dichas placas a 37°C en agitación durante 18 h. Tras este periodo, se lavaron con PBS-T las placas tapizadas con los anticuerpos, a las que se añadieron 100 µl por pocillo de diversas concentraciones de enterotoxina homóloga (1, 5, 10, 50 y 100 ng/ml). El blanco se realizó añadiendo 100 µl de PBS-T en cada uno de los pocillos destinados a este fin. Tras sufrir las placas una incubación de 2 h, fueron lavadas 3 veces con PBS-T, y se depositaron 50 µl de suero policlonal específico para cada una de las enterotoxinas homólogas (EEA y EEB) marcados con peroxidasa a una concentración de 30 µl en 10 ml de PBS-T. Estos antiseros fueron producidos en conejos siguiendo la pauta de inoculación descrita por Robbins y Bergdoll [224]. La conjugación

de dichos anticuerpos policlonales se realizó siguiendo la técnica desarrollada por Nakane y Kawaoi [192], con las variaciones citadas en el apartado en el que describe la conjugación de la enzima a los anticuerpos monoclonales. El conjugado fue incubado durante 30 min en agitación a 37°C, tras lo que se lavaron las placas tres veces con PBS-T, procediéndose al llenado de los pocillos con 100 µl de la solución sustrato, que era idéntica a la empleada en el ELISA indirecto descrito con anterioridad. La lectura se realizó de igual manera a 450 nm.

C.II.p: Conjugación de los anticuerpos monoclonales con peroxidasa:

Los anticuerpos monoclonales fueron conjugados con peroxidasa de rábano picante (SIGMA) siguiendo el método de Nakane y Kawaoi [192], excepto en que el complejo IgG-enzima no fue reducido con NaBH₄ y que se emplearon 10 mg de IgG por cada 5 mg de peroxidasa en vez de una relación de 5 a 5. Esto se realizó así ya que en nuestro laboratorio se ha demostrado que esta reducción de pasos no empeora la sensibilidad, ni determina la aparición de reacciones cruzadas [112].

Brevemente, la técnica consistía en los pasos siguientes:

- * se disolvían 5 mg de peroxidasa eran disueltos en 1 ml de NACO H 0'1 M PH 8'1 preparado inmediatamente antes de su utilización. A la solución anteriormente descrita se añadían 0'1 ml de una solución de fluorodinitrobenzenceno al 1% en alcohol absoluto (FABREAC).

- * tras agitar suavemente durante una hora a temperatura ambiente, se adicionaba 1 ml de NaIO₄ 0'08 M en agua destilada, continuando en agitación durante 30 min más. Se añadía a continuación 1 ml de etilen glicol 0'16 M en agua destilada, agitándose durante una hora a temperatura ambiente.

- * la mezcla se introducía en un tubo de diálisis tipo 8/32 (SERVA) y se dializaba frente a 3 l de tampón

carbonato 0.01 M pH 9.5 a 4°C.

• al día siguiente se realizaba la mezcla de 10 mg de IgG con los 5 mg de peroxidasa incubándola 3 h a temperatura ambiente, tiempo tras el cual se daba el proceso como concluido, congelando los inmunocnjugados a -40°C.

C.II.q: Análisis de los conjugados: (Figura C.4)

El comportamiento de cada uno de los anticuerpos monoclonales conjugados a la peroxidasa de rábano picante fue determinado por el sistema siguiente: las placas de poliestireno se tapizaron con los anticuerpos monoclonales que se comportaron de forma adecuada en la prueba de tapizado descrita en el apartado C.II.e, a la concentración descrita en dicho punto (10 µg/ml). Posteriormente y tras realizar la incubación habitual en la anteriormente citada prueba se añadieron 100 µl de toxina a diversas concentraciones: 0, 1, 5, 10, 50 y 100 ng/ml en PBS-T, las cuales fueron incubadas durante 2 h a 37°C. Posteriormente y tras lavar las placas, se añadieron 50 µl de una solución al 1:1000 en PBS-T de cada uno de los monoclonales marcados, incubándose 10 min a 37°C y en agitación, concluyéndose el ELISA de la forma habitual.

C.II.r: Extracción de EH a partir de alimentos: (Figura C.5)

Para realizar este proceso se siguió el método descrito por Kaiser et al. [270]. Brevemente el método consiste en tomar 100 ml de y del alimento. A la muestra semisólida (papas) se añadieron 50 ml de agua destilada, y a la sólida (lechuga) 100 ml. La muestra semisólida se agitaba vigorosamente, mientras que la sólida hubo de ser molturada, sirviéndose de un Stomacher. A continuación se realizaba una precipitación ácida, ajustando el pH a 4.5 con ClH 6 N en aquellos casos en que dicho valor fuera superior. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 25 minutos a 4°C, tras los que se despreciaba el precipitado, ajustándose el sobrenadante a pH 7.5 con NaOH 5 N. Tras verificar el

Fig. C.4: Diagrama de flujo de la secuencia de pasos en el método ELISA "sandwich".

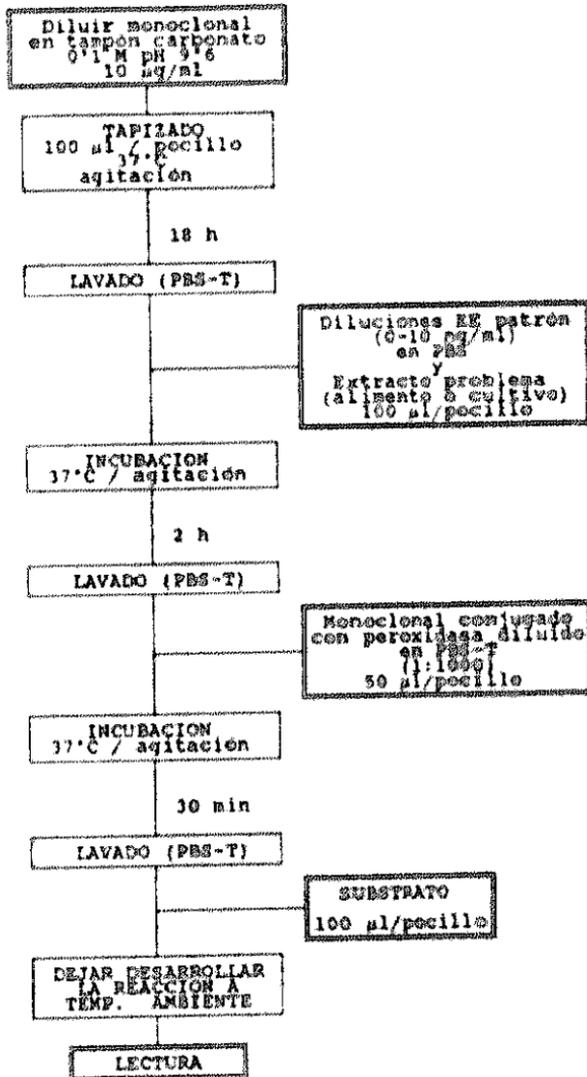
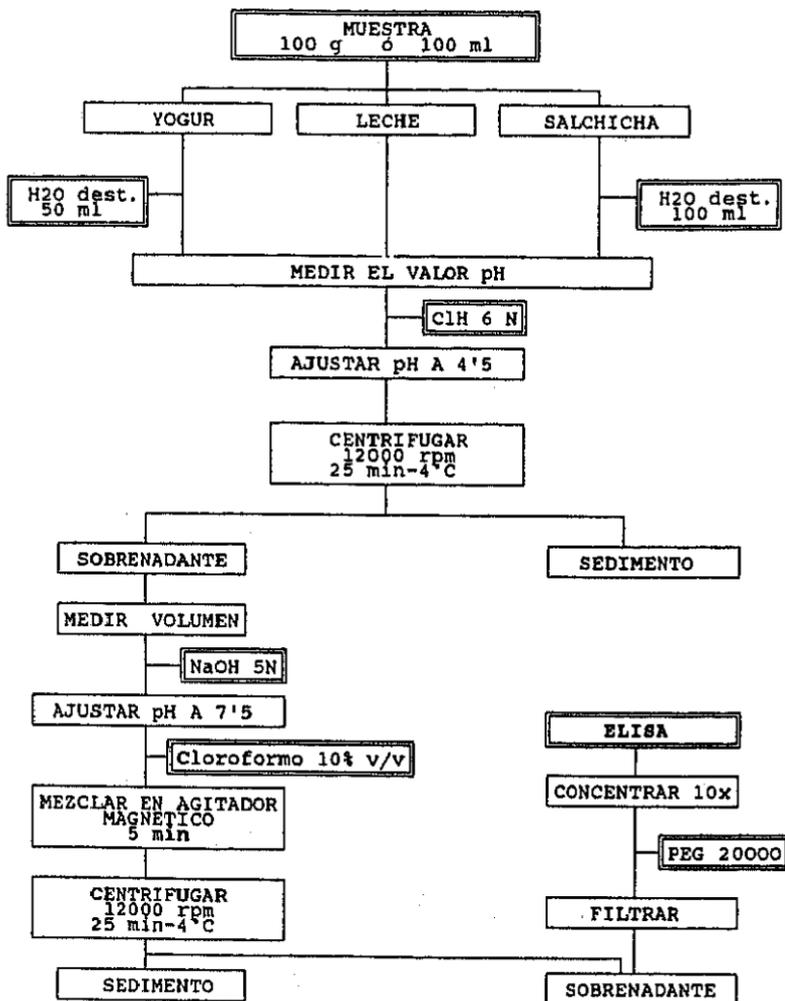


Fig. C.5: Diagrama de flujo de la extracción de enterotoxinas a partir de los alimentos.



volumen se añadia cloroformo (PANREAC) para obtener una concentración del 10% v/v, a fin de conseguir una extracción de los lípidos, mezclando todo ello en un agitador magnético durante 5 minutos. Tras una centrifugación en idénticas condiciones a las anteriormente descritas, el sobrenadante era filtrado a través de papel de filtro a fin de separar el cloroformo de la muestra.

El proceso se finalizaba concentrando la muestra mediante diálisis frente a PEG 20000 (FLUKA) en un tubo de diálisis ("Visking Dialysis Tubing" 10/12, SERVA), hasta que el volumen final era aproximadamente 1/10 del original.

C.II.5: ELISA DAS:

Una vez elegidas las parejas de anticuerpos monoclonales se procedió a probar la capacidad de detección de dichas parejas de todas las enterotoxinas por medio del ELISA tipo DAS (Fig C.4). Las placas se tapizaban con 100 μ l de una solución de 10 μ g de anticuerpo monoclonal por ml en tampón carbonato-bicarbonato pH 9.6. Tras incubación a 37°C durante 18 h, se lavaban 3 veces con PBS-T, depositando a continuación 100 μ l de diversas concentraciones de cada toxina (0, 0.625, 1.25, 2.5, 5 y 10 ng/ml) en PBS-T. Las placas se incubaban 2 h a 37°C en agitación. Al finalizar este periodo se lavaban los pocillos 3 veces con PBS-T y se añadían 50 μ l del anticuerpo monoclonal correspondiente marcado con peroxidasa a una concentración de 1:1000 en PBS-T, dejándolo reaccionar durante 30 minutos a 37°C en agitación, periodo tras el cual las placas eran lavadas de nuevo tres veces con PBS-T. Para finalizar se añadían 100 μ l de sustrato tal y como se describe en el apartado C.I.1.7, realizándose la lectura a 450 nm.



D. RESULTADOS

D.I. FUSIONES

En total realizamos 12 fusiones a lo largo de la duración de este estudio. En este número están incluidas todas las fusiones realizadas a fin de lograr la puesta a punto de la técnica, creando un protocolo que se adaptara a las características de nuestro laboratorio.

D.I.a: Elección PEG:

Probamos 2 marcas de PEG (FLUKA y SIGMA) y dos lotes distintos de la marca SIGMA. Con el PEG de la marca FLUKA, y siguiendo nuestro protocolo de fusión se produjo el 100 % de mortalidad celular (empleando exclusivamente células de mieloma) en las dos fusiones que realizamos. Con el PEG de SIGMA llevamos a cabo dos fusiones, obteniendo en ambas buenos resultados, pero con la aparición de un mayor número de células muertas en el lote luego desechado, comprobación realizada al observar los pocillos bajo el microscopio invertido y ver gran cantidad de detritus (fondo del pocillo opaco). No obstante, con ambos lotes existía un número de pocillos con crecimiento similar y cercano al óptimo obtenido en las fusiones definitivas (85-90 %). En ambas fusiones la población celular fue dividida por la mitad y tratada cada una con uno de los lotes.

D.I.b: Concentración de PEG:

Para establecer el porcentaje ideal de CO_2 se realizó una fusión, en la que, la mitad de la población celular empleada fue tratada con el 40 % de PEG y la otra mitad con el 50%. Observamos que en ambos casos el número de pocillos con crecimiento positivo era similar, optando por lo tanto por el porcentaje superior, para disponer de una mezcla fusionante con alto poder de acción, ya que los efectos tóxicos esperados al emplear una concentración mayor no se produjeron.

D.I.c: Esterilización de la mezcla fusionante:

Los datos obtenidos en estas pruebas no pueden ser definitivos ya que fue realizada a la vez que la prueba del apartado anterior, no obstante nos decidimos por la filtración dado que su preparación es más corta, aunque más engorrosa, y a que la bibliografía existente aconsejaba la utilización de este método.

D.I.d: Relación y estado celular:

Se realizaron dos fusiones con dos relaciones distintas de mieloma:células de bazo (1:10 y 1:5). Estas relaciones fueron probadas las dos veces para así evitar los factores que influyen en cada fusión como ente aislado. No se encontraron diferencias en el número de híbridos obtenidos. En las dos fusiones se emplearon bazos de animales no inmunizados.

Otras dos fusiones fueron realizadas con células de mieloma en mal estado debido a un exceso de crecimiento, produciéndose una caída en el número de pocillos que osciló entre el 18 y el 37 % con respecto al rendimiento ideal obtenido en nuestro sistema.

Es importante el destacar que desde que empleamos el medio atemperado hasta 37°C en baño maría el rendimiento se elevó un 10-18 %, si bien hasta este momento la técnica no se dominaba por completo, con lo que podría deberse a un mejor manejo de la fusión.

Refiriéndonos a las células de mieloma, en uno de los casos, ya empleando células de bazo procedente de un ratón inmunizado con EEB, el no haber comprobado su sensibilidad a la Aminopterina, nos costó el desaprovechar toda la fusión ya que existían células HGPRT + que crecieron rápidamente eliminando los productos de la fusión. A partir de este momento se comprobó rutinariamente la sensibilidad de la línea de mieloma a este agente selectivo antes de proceder a la fusión.

D.I.e: Eliminación del medio selectivo:

En un principio, al reponer el medio tras ser analizado en ELISA el sobrenadante de los pocillos, se añadía DMEM-FCS, eliminando la Aminopterina, hipoxantina y Timidina de forma brusca. En estos casos (8 fusiones) morían el 100 % de los hibridomas, debido a la presencia intracelular de Aminopterina, optando por mantener en todos los casos la Hipoxantina y la Timidina como mínimo.

D.I.f: Empleo de macrófagos:

Al emplear una de las fusiones con y sin macrófagos, observamos que las diferencias eran mínimas en nuestro sistema, y a la concentración que empleábamos estas células (500 células de exudado peritoneal por pocillo). El aumento al utilizarlas no fue considerado como significativo (3'1 %).

D.I.g: Pruebas de clonación:

Estas pruebas se realizaron con células de mieloma o con células de bazo, comprobando que nuestro sistema nos permitía la multiplicación de las primeras desde un número de 1 célula por pocillo, y que las segundas permanecían con aspecto refringente a esa concentración celular durante un tiempo de 7 a 8 días, periodo que se puede considerar el normal para estas células.

D.I.h: Fusiones con bazo de ratona inmunizada:

Se realizaron un total de 20 fusiones con ratonas inmunizadas con las toxinas de este estudio (12 con EEB y 8 con EEA). De estas 20, la mitad se perdieron por contaminación fungica (5 de EEB y 5 de EEA), con lo que los anticuerpos de este estudio provienen de 7 fusiones en el caso de los obtenidos con EEB y de 3 en los de EEA.

Los anticuerpos empleados en este estudio aparecen

reflejados en la Tabla D.1, donde aparecen algunas de sus características.

Los monoclonales frente a EEB fueron obtenidos en las siguientes fusiones:

- | | |
|------------------------------------------|------------------|
| 1: B1, B2, B3 | 5: B8, B9 |
| 2: B5 | 6: B10, B11 |
| 3: B6, B7 | 7: B12, B13, B14 |
| 4: Ninguna (sobrecrecimiento de mieloma) | |

En cuanto a los obtenidos frente a EEA, la relación es la siguiente:

- | | | |
|-------------------|---------------|-------|
| 1: A1, A2, A3, A4 | 2: A5, A6, A7 | 3: A8 |
|-------------------|---------------|-------|

D.II. PRODUCCION DE ASCITIS

Los volúmenes de ascitis (totales y medios) que obtuvimos aparecen reflejados en la Tabla D.2. Podemos destacar que obtuvimos en nuestro estudio un total de 366 ml de ascitis producida en 181 ratones (tanto machos como hembras). lo que representa una media de 2'02 ml de ascitis por ratón. Si restamos el número de ratones de los que fue imposible extraer ascitis, ya que murieron durante la noche (28 ratones), la media se eleva hasta 2'27 ml por ratón; si además en estos datos incluimos el número de ratones empleados para producir ascitis inespecífica (con células Sp2/0) los resultados serían los siguientes: 187 ratones, 375 ml de líquido ascítico y 2'003 ml de ascitis por ratón. La máxima media obtenida fue de 2'5 ml (B2) y la mínima de 0'0 ml por ratón (B6 y A5). En todos los lotes, el número de ratones a los que no se les pudo extraer ascitis debido a que murieron durante la noche fue de 2 como máximo (B2, B7, B10, A3, A6 y A8) (Tabla D.2).

D.III. PURIFICACION

Los volúmenes de ascitis empleados para la purificación fueron bastante bajos (Tabla D.2), oscilando entre un máximo de 26 ml (B2) y un mínimo de 7 ml (B6 y A5).

Tabla D.1: Características de los anticuerpos monoclonales

AM	Subclase IgG	TÍTULO (IU/ml)			REACCIÓN		Capacidad Detección (ng/IC ⁵⁰)	Inhibición Unión EE (ng) (%)	Validez Tapizado	Validez Conjugado (%)
		A	B	C	ELISA	TRANSF.				
B1	2b	160	40960	-	B, C ₁	B, C ₁	0.1	5	NO	NO
B2	2b	320	20480	10 ⁶	B, C ₁	B, C ₁	0.1	5	NO	SI (87)
B3	1	640	40960	-	B, C ₁	B, C ₁	0.1	50	NO	NO
B4	1	160	20480	10 ⁷	B, C ₁	B, C ₁	0.1	5	SI	NO
B5	2b	160	10240	10 ⁴	B	B	0.1	0.5	NO	NO
B6	1	160	1280	-	B, C ₁	B	0.1	500	NO	NO
B7	2b	160	640	10 ⁷	B, C ₁	B, C ₁	0.1	50	SI	NO
B8	1	1280	10240	>10 ³	B, C ₁	B	0.1	50	NO	SI (87)
B9	1	640	2560	-	B, C ₁	B, C ₁	0.5	5	NO	SI (84)
B10	1	160	2560	-	B, C ₁	B	0.1	5	NO	SI (84, 87A)
B11	1	320	40960	10 ⁴	B, C ₁	B	0.1	5	NO	NO
B12	2b	40	640	-	B	B	0.1	>500	NO	SI (81A)
B13	1	120	1280	-	B, C ₁	B, C ₁	0.1	0.5	NO	NO
B14	2b	320	1280	10 ⁷	B	B	0.5	0.5	SI	NO
A1	1	320	2560	-	A	A	1	5	NO	NO
A2	2b	160	2560	-	A, E	A, E	0.1	0.5	NO	SI (A5)
A3	1	320	5120	-	A, E	A, E	0.1	>500	NO	SI (A7)
A4	1	640	20480	-	A, C ₁ , D, E	C ₁ , D, E	0.1	>500	NO	NO
A5	1	320	40960	-	A, B, C ₁ , D, E	A, B, C ₁ , D, E	0.1	500	SI	NO
A6	2b	1280	5120	-	A, E	A, E	0.1	50	NO	NO
A7	1	320	2560	-	A, B, C ₁ , D, E	A, B, C ₁ , D, E	0.1	>500	SI	SI (A5)
A8	1	1280	10240	-	A, E	A, E	0.1	50	SI	SI (A5, A7)

A: Titulo con tapizado de 0.1 µg EE/pocillo

B: Titulo con tapizado de 1 µg EE/pocillo

C: Titulo ascitis con tapizado de 0.1 µg EE/pocillo

(*) : En ELISA indirecto

(A5): Entre parentesis AM empleado para tapizado

(-): No analizado

Tabla D.2: Datos obtenidos en la producción de ascitis, con las variables que se dieron en la obtención.

MONOCLONAL	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	Sp2/0
NUMERO RATONES	6	9	6	10	10	8	11	8	6	8	7	7	10	6	7	9	9	7	8	9	10	10	6
SEXO	M	M	M	M	M	3M/5H	6M/5H	4M/4H	M	M	M	M	3M/7H	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
ASCITIS TOTAL (ml)	20	32	20	20	27	7	29	18	17	12	21	17	18	16	8	11	17	11	7	13	13	12	9
MEDIA (ml/ratón)	3.3	3.5	3.3	2	2.7	0.8	2.6	2.3	2.8	1.5	3	2.4	1.8	2.6	1.1	1.2	1.8	1.5	0.8	1.4	1.3	1.2	1.5
RATONES MUERTOS (*)	1	2	0	1	1	0	2	0	0	2	0	1	1	0	0	1	2	0	1	2	1	2	1
ASCITIS PRECIPITADA	20	26	20	18	25	7	25	17	13	12	19	17	18	15	8	11	17	11	7	13	13	12	9
PURIFICACION	P=C	P	P=C	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P=C
VOL. RESUSPENSION (ml PBS)	-	13	-	9	12.5	5	12.5	8.5	7	9	10	9	9	7.5	7	6	10	7	6	7	7	7	-

(*): Número de ratones de los que no se pudo obtener ascitis

Abreviaturas: P: precipitación con sulfato amónico, P=C: precipitación con sulfato amónico seguida de gel filtración. M: macho. H: hembra.

Normalmente, tras precipitar con sulfato amónico, se resuspendió el sedimento en PBS, de tal manera que el volumen final fuera aproximadamente la mitad del volumen de partida (Tabla D.2). No obstante, ello no fue realizado en todos los casos, en particular en aquellas ascitis cuyo volumen precipitado era escaso (destacando B5 y A1), que fueron resuspendidos en más volumen de PBS, ya que preferimos tener una cantidad que nos permitiera hacer un mayor número de alícuotas con volúmenes significativos. En estos casos los títulos entraron dentro de lo normal en este estudio (Tabla D.1), siendo destacable que el que poseía el título más bajo (B12) no fue resuspendido en un volumen significativamente mayor al que le correspondería por la regla preestablecida, y que ya hemos citado más arriba (9 ml de PBS para 17 ml de ascitis original). Aunque el título habría sido mayor en los casos en que la resuspensión se realizó en un volumen mayor al habitual (al diluir menos el anticuerpo), no parece que ello influya en gran manera en los títulos obtenidos dentro de los márgenes en que realizamos la resuspensión.

La gráfica que se obtuvo con las absorbancias de las diversas fracciones producidas al pasar los anticuerpos B1 y B3 por una columna de gel filtración, aparece reflejada en la Figura D.1. La actividad fue comprobada por el método ELISA indirecto, y ésta se encontró en ambos casos en el segundo pico (fracciones 35 a 45 en el anticuerpo B1 y fracciones 35 a 44 en el B3), lo que supuso 110 ml en el primer anticuerpo y 55 ml en el segundo.

D.IV. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES

D.IV.a: Subclases de IgG:

Los resultados obtenidos en esta prueba aparecen reflejados en la Tabla D.1 y la Figura D.2. Las lecturas obtenidas para cada subclase de IgG aparecen reflejadas en la Tabla D.3.

El 63'6% de los anticuerpos analizados por este sistema

Fig. D.1: PURIFICACION B1 y B3 Sephadex G-200

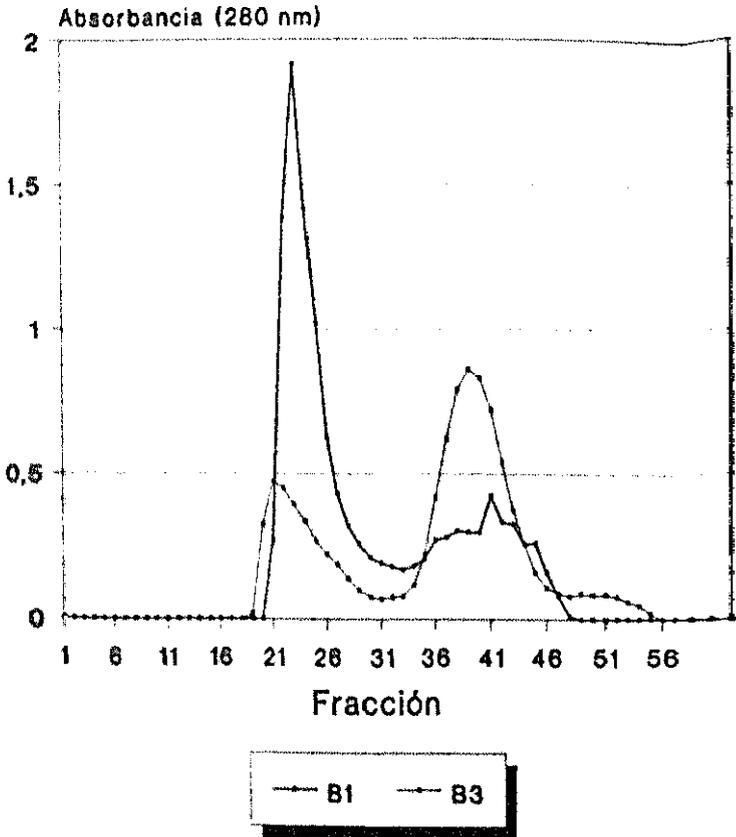


Fig. D.2: Subclases de IgG

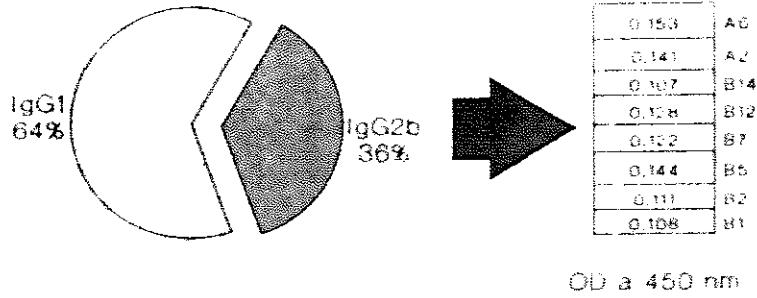


Tabla D.3: Lecturas a 450 nm para la determinación de subclase

AN	1g6 1	1g6 2a	1g6 2b	1g6 3
B1	0.072	0.087	0.108	0.024
B2	0.079	0.035	0.110	0.049
B3	0.135	0.033	0.055	0.031
B4	0.103	0.040	0.053	0.049
B5	0.035	0.025	0.144	0.035
B6	0.108	0.030	0.052	0.044
B7	0.075	0.026	0.122	0.047
B8	0.107	0.029	0.053	0.033
B9	0.100	0.043	0.039	0.037
B10	0.093	0.035	0.040	0.043
B11	0.130	0.030	0.076	0.076
B12	0.076	0.046	0.128	0.059
B13	0.100	0.034	0.048	0.054
B14	0.062	0.016	0.107	0.029
A1	0.127	0.020	0.046	0.015
A2	0.029	0.020	0.141	0.029
A3	0.116	0.010	0.033	0.034
A4	0.136	0.016	0.067	0.031
A5	0.126	0.016	0.061	0.023
A6	0.072	0.016	0.133	0.021
A7	0.094	0.011	0.035	0.021
A8	0.112	0.007	0.068	0.033

pertenecieron a la subclase IgG₁ (14 de los 22 anticuerpos), mientras que el resto (36'4%) pertenecieron a la subclase IgG_{2b}. Este tanto por ciento se ve modificada a favor de IgG_{2b} si solo analizamos los anticuerpos monoclonales frente a la enterotoxina B ya que 6 de los 14 anticuerpos pertenecieron a la subclase citada anteriormente (42'9%).

Las lecturas más altas a 450 nm estimadas como positivas (Tabla D.3) pertenecieron a los monoclonales B5, A2 y A6 para la subclase IgG_{2b} (0'144, 0'141 y 0'131 respectivamente), mientras que para IgG₁ las más elevadas fueron 0'135 (B3), 0'130 (B11) y 0'116 (A3). Los valores mínimos considerados como positivos fueron de 0'108 y 0'107 para B1 y B14 respectivamente en el caso de IgG_{2b} y 0'091 (B10) y 0'094 (A7) para la IgG₁.

D.IV.b: Titulo:

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla D.1. Como se puede observar en dicha tabla estos valores oscilaron entre un mínimo de 40 para el anticuerpo monoclonal B12 y un máximo de 1280 para los anticuerpos B4, A6 y A8. El título relativo de cada anticuerpo monoclonal fue determinado por ELISA indirecto, tapizando las placas con 0'1 µg/pocillo de EE homóloga. Se analizaron diluciones dobles a partir de una decimal previa. Este título fue arbitrariamente establecido como el recíproco de la dilución más alta que diera una absorbancia ≥ 0'1 a 450 nm.

También realizamos la titulación empleando 1 µg/pocillo de toxina. Como se puede observar en la Tabla D.1, los títulos aumentaron considerablemente. Los mínimos y los máximos obtenidos oscilaron entre 1:640 (anticuerpos B7 y B12) y 1:40.960 (B1, B3, B11 y A5).

Los resultados de la titulación de ascitis original centrifugada de siete de los anticuerpos frente a EEB (B2, B4, B5, B7, B8, B11 y B14), ya que del resto de los anticuerpos toda la ascitis había sido empleada en la purificación, aparecen reflejados en la Tabla D.1. Este análisis se

realizó con placas tapizadas con 0'1 μg /pocillo. Como se puede observar, y manteniendo el mismo criterio arbitrario que para los títulos descritos para los otros casos, los títulos fueron muchísimo más elevados, lo que nos obligó a realizar diluciones decimales en vez de $\frac{7}{3}$ dobles. Estos valores oscilaron entre 1: $>10^3$ (B8) y 1:10 (B4 y B7).

D.IV.c: Curvas de dilución:

La representación de estas curvas aparece en las Figuras D.3 a D.6 para los monoclonales anti-EEB con tapizado de 0'1 μg de EE por pocillo y las Figuras D.7 y D.8 para los monoclonales producidos frente a EEA con el mismo sistema de tapizado. Los resultados tapizando con 1 μg /pocillo aparecen en las Figuras D.9 a D.12 para los anticuerpos B y en las D.13 y D.14 para los producidos frente a EEA.

Las curvas de dilución obtenidas al representar en una gráfica las lecturas a 450 nm de diluciones decimales de la ascitis centrifugada de varios hibridomas aparecen representadas en las Figuras D.27 y D.28.

Todas estas curvas aparecen modificadas estableciendo un máximo de lectura, para de esta manera observar la caída en la absorbancia a 450 nm a altas diluciones, tal y como realizan otros autores (Figuras D.15 a D.26). Las curvas de dilución de ascitis también fueron modificadas para comprobar este efecto (Figuras D.29 y D.30).

D.IV.d: Capacidad de detección en ELISA indirecto:

Los resultados obtenidos en esta prueba aparecen reflejados en la Tabla D.1 y las Figuras D.31 a D.36. En resumen estos datos muestran la unión de una cantidad constante de cada anticuerpo monoclonal con varias concentraciones de EEs empleadas para tapizar los pocillos de microtitulación (100 μl de soluciones que oscilaban entre 0 y 1000 ng/ml). Por lo tanto las concentraciones de EE por pocillo serían 0, 0'1, 0'5, 1, 5, 10, 50 y 100 ng. Como se

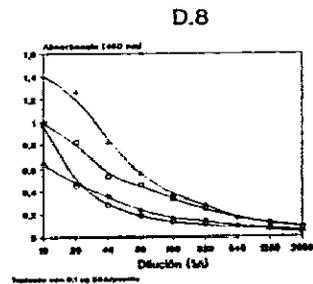
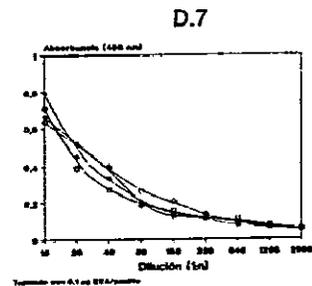
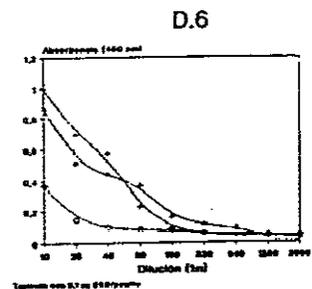
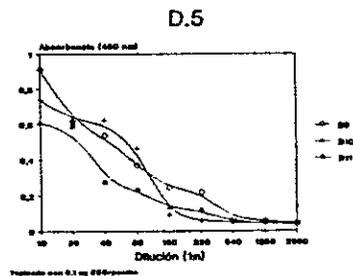
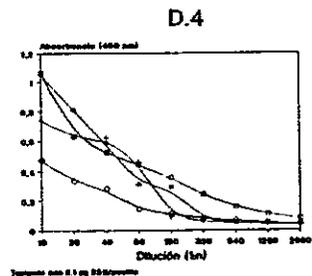
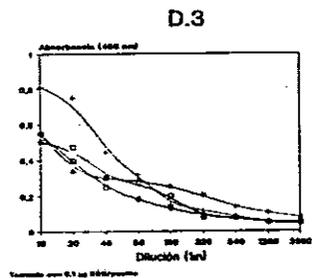


Fig. D.3 a D.8: curvas dilución con tapizado de 0.1 µg EE

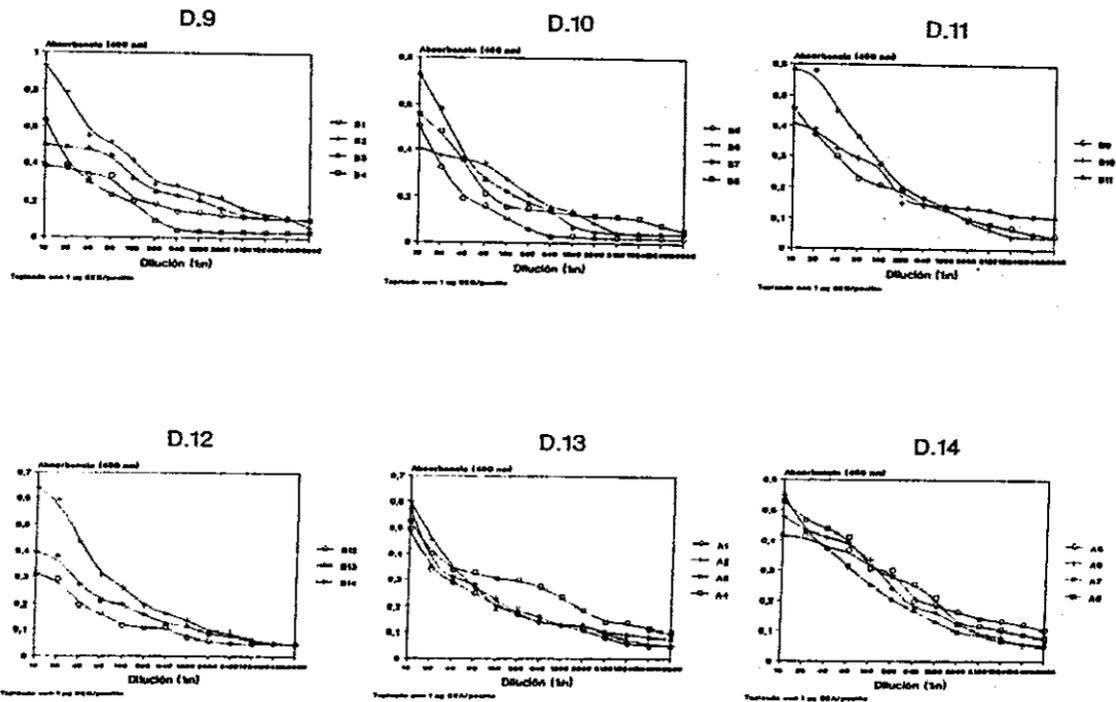
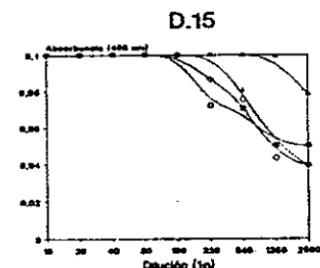
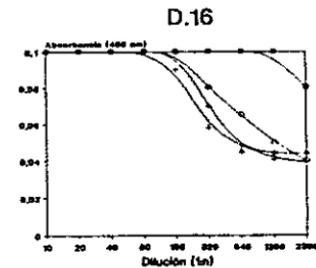


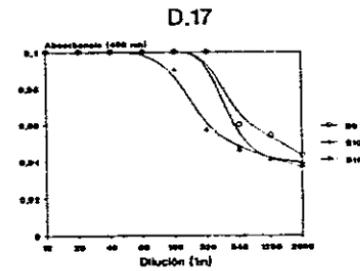
Fig. D.9 a D.14: curvas dilución con tapizado de 1 µg EE



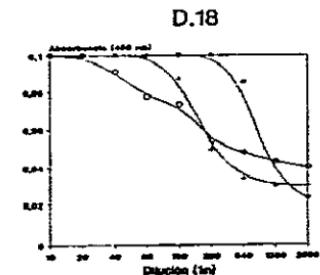
Tapizado con 0.1 µg EE/panel



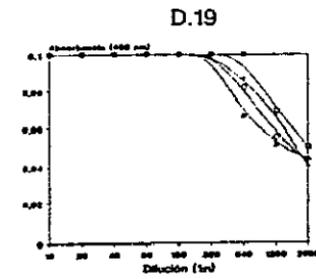
Tapizado con 0.1 µg EE/panel



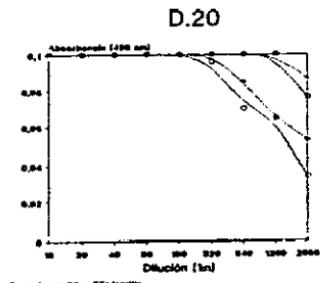
Tapizado con 0.1 µg EE/panel



Tapizado con 0.1 µg EE/panel



Tapizado con 0.1 µg EE/panel



Tapizado con 0.1 µg EE/panel

Fig. D.15 a D.20: curvas dilución con tapizado de 0.1 µg EE

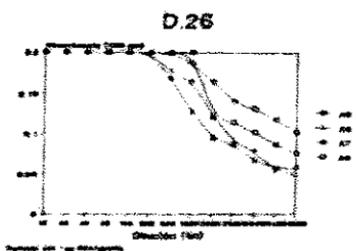
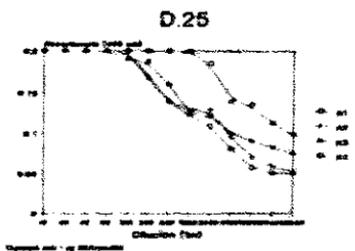
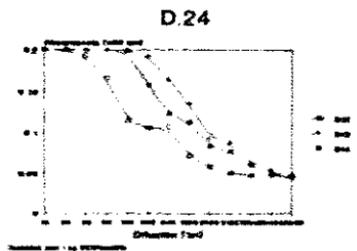
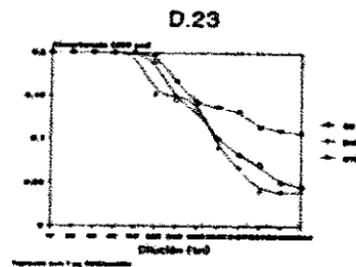
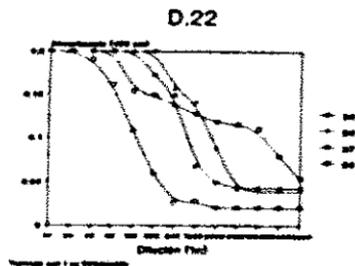
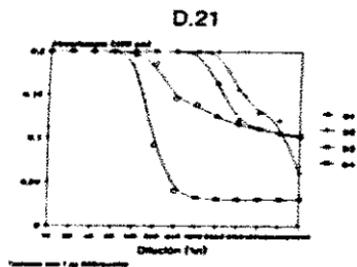


Fig. D.21 a D.26: curvas dilución con tapizado de 1 µg EE

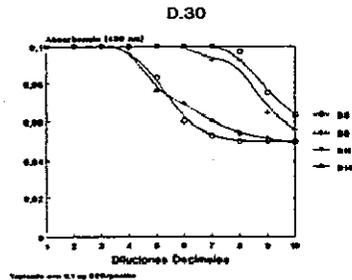
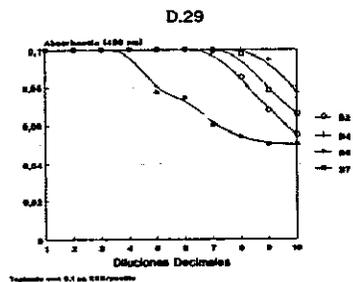
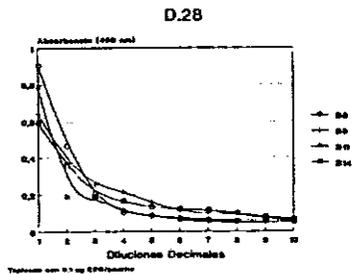
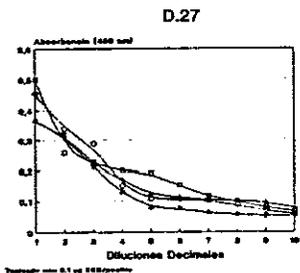


Fig. D.27 a D.30: curvas de dilución de ascitis

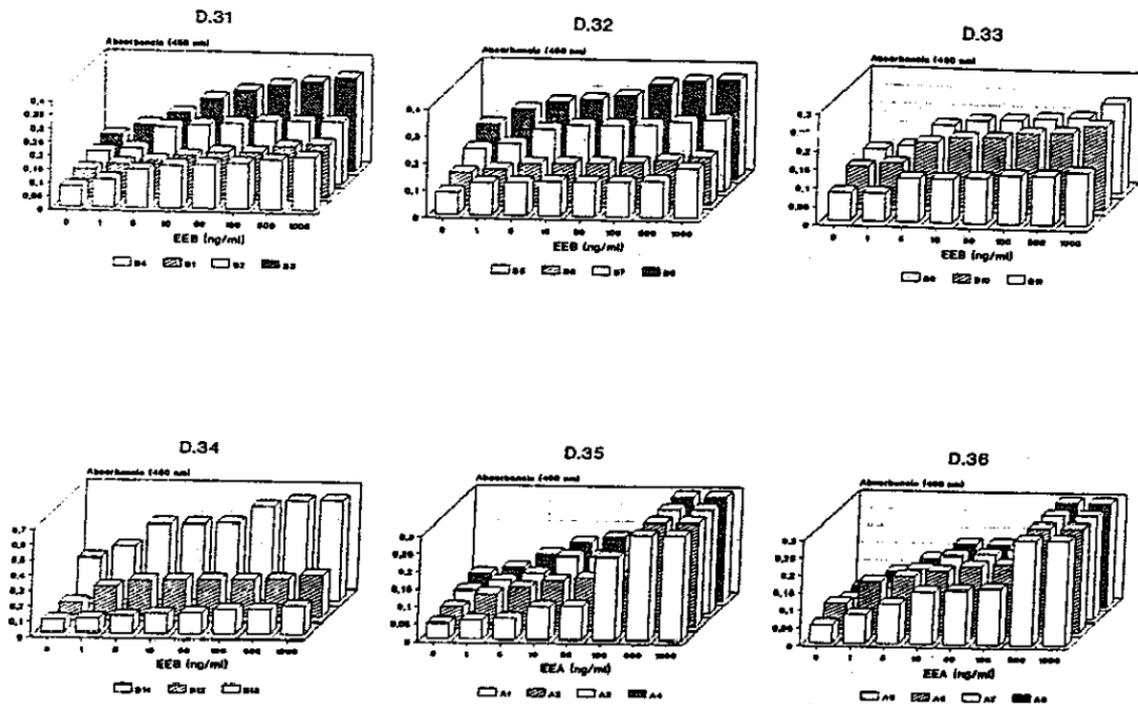


Fig. D.31 a D.36: capacidad de detección en ELISA indirecto

puede observar en las Figuras anteriormente citadas y en la Tabla D.1, en la mayoría de los anticuerpos monoclonales analizados existe una diferencia de lectura relativamente amplia entre 0 y la solución de 1 ng/ml. Dentro de los monoclonales anti-EEB tan sólo B9 y B14 son incapaces de diferenciar la solución de 1 ng/ml empleada para tapizar del blanco en este sistema de ELISA indirecto. Algo similar ocurre con los anticuerpos obtenidos frente a EEA, ya que la mayoría detectan la menor cantidad de toxina empleada en esta prueba.

D.IV.e: Estudios de inhibición:

D.IV.e.1: **Análisis de inhibición de unión a EE homóloga:** los resultados de este análisis se muestran en la Tabla D.1 y en la Figuras D.37 a D.42. Varios anticuerpos fueron inhibidos con 0'5 ng/ml (B5, B13, B14, y A2), si bien para un número elevado de anticuerpos se necesitó unas cantidades mayores (> 500 ng/ml) (B12, A3, A4 y A7).

D.IV.e.2: **Constante de disociación:** las constantes de disociación (K_D) de cada monoclonal aparecen reflejadas en la Tabla D.4, donde observamos que se trata de constantes relativamente bajas, sobre todo en el caso del monoclonal B12 ($0'32 \times 10^{-6}$ M).

D.IV.f: Reacciones cruzadas:

Para comprobar las posibles reacciones con otros serotipos de enterotoxinas empleamos dos metodologías: ELISA e inmunotransferencia. Los resultados obtenidos en ambas pruebas aparecen reflejados en la Tabla D.1. Absolutamente todos los anticuerpos monoclonales que se unían a la EEB reaccionaban con dos bandas relativamente cercanas (Figura D.43), una situada en el lugar correspondiente a la EEB (aproximadamente 28.000 daltons) (Figura D.44) y otra de peso molecular superior, con la que la reacción era ligeramente menor.

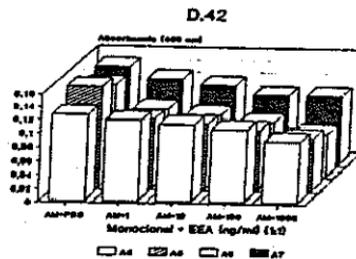
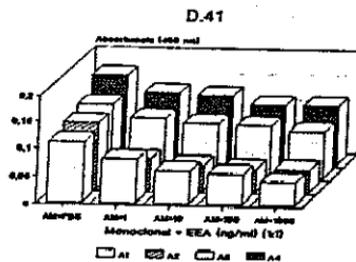
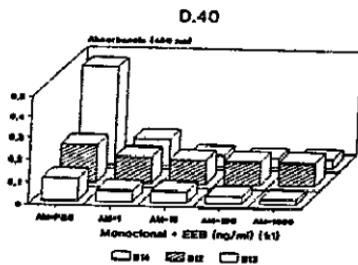
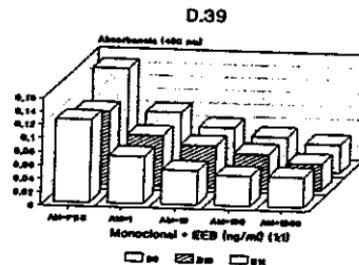
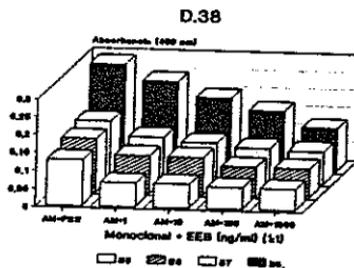
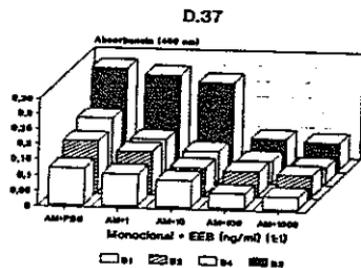
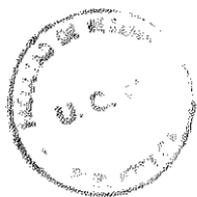


Fig. D.37 a D.42: inhibición de la unión a la EE homóloga

Таблица 2.3. Составление норм расхода
 на оплату труда рабочих по
 видам работ (включая монтаж) (1985)

Уровень квалификации	К	Q
01	0.18	7 М
02	0.22	7 М
03	0.33	8 М
04	0.25	7 М
05	0.26	7 М
06	0.17	7 М
07	0.39	8 М
08	0.11	7 М
09	0.5	8 М
010	0.58	7 М
011	0.17	7 М
012	0.12	6 М
013	0.95	8 М
014	0.58	8 М
А1	0.18	7 М
А2	0.83	8 М
А3	0.77	7 М
А4	0.3	7 М
А5	0.15	7 М
А6	0.13	7 М
А7	0.8	7 М
А8	0.85	8 М



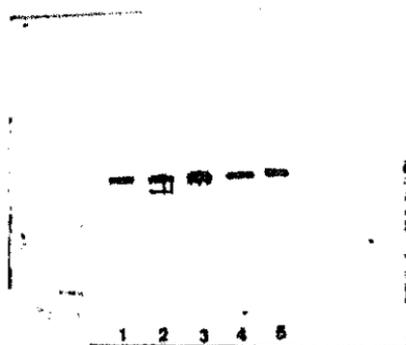


Figura B.43: Reacción en inmunotransferencia del anticuerpo A5 con las enterotoxinas crudas A (Calle 1), B (Calle 2), C₁ (Calle 3), D (Calle 4) y E (Calle 5).

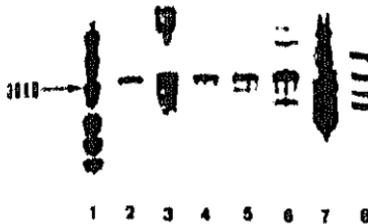


Figura D.44: Electroforesis SDS-Mercaptoetanol: Marcador de Bajo Peso Molecular (Calle 1), EEA pura (Calle 2), EEA cruda (Calle 3), EEB pura (Calle 4), EEB cruda (Calle 5), EEC cruda (Calle 6), EED cruda (Calle 7) y EEE cruda (Calle 8). El marcador de bajo peso molecular está formado por las siguientes sustancias nombradas de abajo a arriba: Fosforilasa b, Albúmina, Ovoalbúmina, Anhidrasa Carbónica, Inhibidor de la Tripsina y α -Lactoalbúmina, cuyos Pesos Moleculares son de 94.000, 67.000, 43.000, 30.000, 20.100 y 14.400 daltons respectivamente.



D.V. DETERMINACION DE ANTICUERPOS VALIDOS PARA TAPIZADO

Los anticuerpos monoclonales que funcionan adecuadamente como anticuerpo de tapizado, empleando un conjugado policlonal, aparecen reflejados en la Tabla D.1.

Come se puede observar no todos los anticuerpos monoclonales de este estudio realizan bien la función de anticuerpo de captura. Más bien ocurre todo lo contrario, ya que tan solo tres producidos frente a EEB (B4, B7 y B14) y otros tres frente a EEA (A5, A7 y A8) parecen adecuados si se observan las rectas de regresión (Figuras D.45 a D.50). Esta elección se realizó atendiendo a las gráficas obtenidas al trasladar los datos a un programa de gráficos para PC's ("Harvard Graphics"), dándonos la recta ideal atendiendo los datos introducidos en el programa, esto es calculaba la regresión lineal. Tras esto bastaba con observar en que monoclonales se producían lecturas próximas a esta recta ideal en todos los datos. En el apartado siguiente se siguieron pautas similares.

D.VI. DETERMINACION DE PAREJAS EFECTIVAS

Una vez elegidos aquellas anticuerpos monoclonales que servían como anticuerpo de captura, procedimos a la determinación de cuáles de los conjugados funcionaban bien con los anticuerpos monoclonales elegidos para tapizar.

Las parejas que funcionaron adecuadamente aparecen reflejadas en la Tabla D.1. La Figuras que nos indicaron que anticuerpos elegir reflejan de nuevo aquellos que reaccionaron de forma adecuada (Figuras D.51 a D.61). A partir de este momento, para referirnos a los monoclonales conjugados con la enzima peroxidasa, el nombre del anticuerpo irá seguido del símbolo *.

De nuevo solo funcionaron la minoría de los anticuerpos producidos: B1*, B2*, B9*, B10*, B12*, A2*, A3*, A7* y A8*. Dos de ellos formaron una pareja adecuada con dos anticuerpos de tapizado: B10* con B4 y B14 y A8* con A5 y

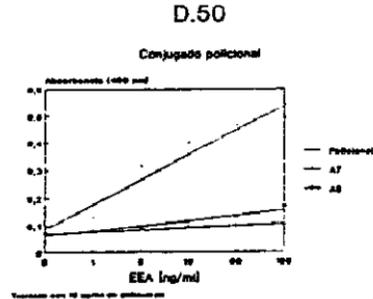
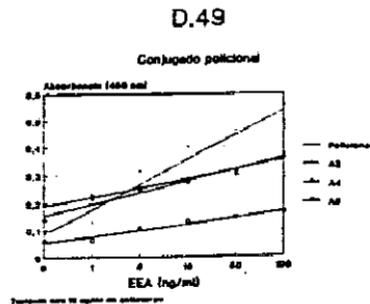
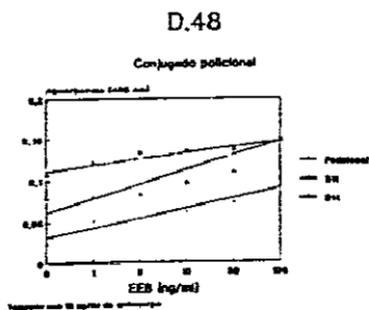
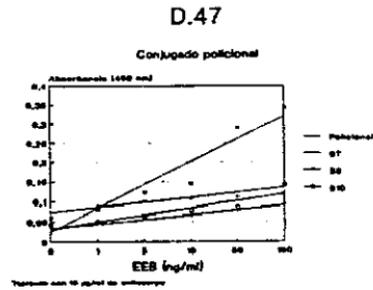
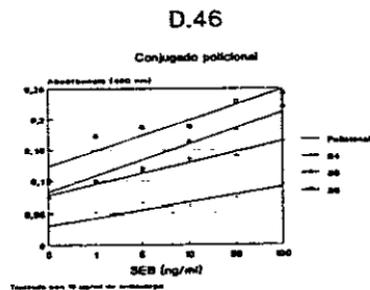
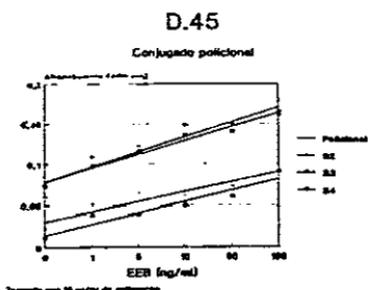
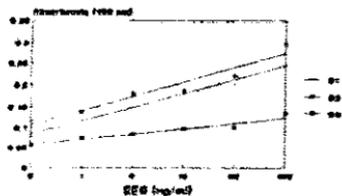


Fig. D.45 a D.50: prueba de tapizado

D.51

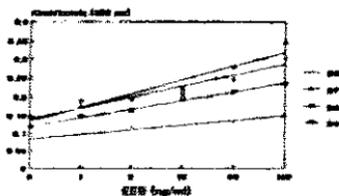
Tejido con 04



Tejido con 10 partes de anticuerpo 04

D.52

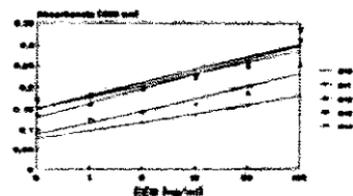
Tejido con 04



Tejido con 10 partes de anticuerpo 04

D.53

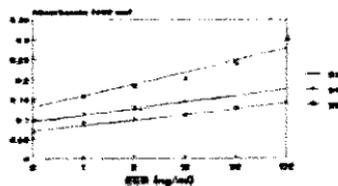
Tejido con 04



Tejido con 10 partes de anticuerpo 04

D.54

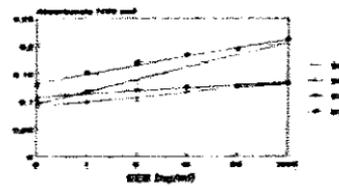
Tejido con 07



Tejido con 10 partes de anticuerpo 07

D.55

Tejido con 07a

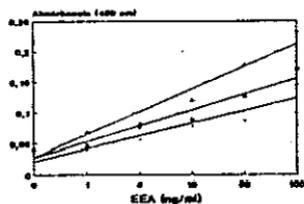


Tejido con 10 partes de anticuerpo 07a

Fig. D.51 a D.55: prueba de conjugado (anticuerpos anti EEB)

D.56

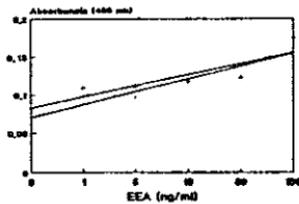
Tapizado con A8



Tapizado con 10 ng/ml de anticuerpo A8

D.57

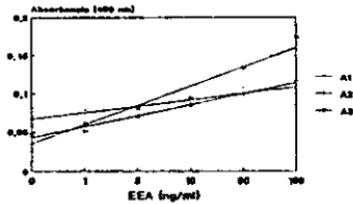
Tapizado con A8



Tapizado con 10 ng/ml de anticuerpo A8

D.58

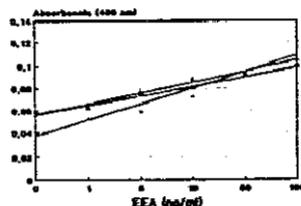
Tapizado con A5



Tapizado con 10 ng/ml de anticuerpo A5

D.59

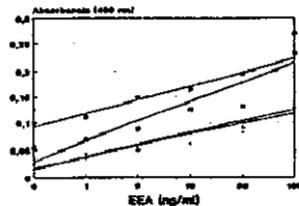
Tapizado con A5



Tapizado con 10 ng/ml de anticuerpo A5

D.60

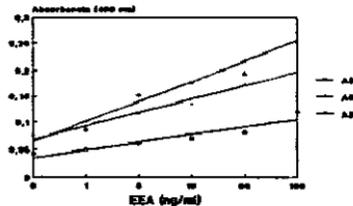
Tapizado con A7



Tapizado con 10 ng/ml de anticuerpo A7

D.61

Tapizado con A7



Tapizado con 10 ng/ml de anticuerpo A7

Fig. D.56 a D.61: prueba de conjugado (anticuerpos anti-EEA)

A7. De todas modos, esta prueba fue realizada con la toxina homóloga, debiéndose comprobar el comportamiento con las demás toxinas.

Por lo tanto las parejas posibles serian las siguientes:

# B4 [B9*	# B7 [B2*	# B14 [B10*
B10*	B8*	B12*
# A5 [A2*	# A7 [A3*	# A8 (ninguno)
A7*	A8*	
A8*		

D.VII. ELISA DAS

D.VIII.a: ELISA con parejas efectivas:

Las lecturas obtenidas empleando las parejas efectivas descritas en el apartado anterior aparecen reflejadas en la Tabla D.5. En esa misma Tabla se muestran las correlaciones de esas lecturas.

D.VII.b: Otras combinaciones:

Debido a que tan sólo intentamos formar combinaciones entre anticuerpos obtenidos frente a la misma EE, optamos por realizarlas también entre aquellos obtenidos frente a EEB y los producidos frente a EEA que reaccionaban con todas las enterotoxinas. Sólo probamos aquellos que se comportaron correctamente bien en el tapizado o bien como anticuerpo marcado, teniendo en cuenta que los anticuerpos frente a EEB nos limitaron la detección posible a EEB y/o EEC. Las lecturas obtenidas en esta prueba aparecen reflejadas en la Tabla D.6.

D.VIII. DETECCION DE EES EN ALIMENTOS

Los resultados de este análisis aparecen reflejados en la Tabla D.7, donde se muestran las lecturas obtenidas por el patrón realizado, con la correlación correspondiente. Este estudio fue restringido a la enterotoxina B, dado que

Tabla B.5. Lecturas a 400 nm de las parejas espectrales de los tipos espectrales de estrellas con un índice de color de 11

COMBINACION FORMA (mag/mi)	B-09*		B4-010*		B7-02*		A7-03*		A4-010*		B4-012*		A5-A2*		A5-A7*		A1-A8*		A7-A3*		A7-A8*			
	ES9	ESC	ES9	ESC	ES9	ESC	ES9	ESC	ES9	ESC	ES9	ESC	ES9	ESC	ES9	ESC	ES9	ESC	ES9	ESC	ES9	ESC		
B	0.075	0.081	0.089	0.071	0.154	0.130	0.193	0.162	0.109	0.052	0.074	0.079	0.062	0.076	0.049	0.049	0.058	0.062	0.106	0.159	0.095	0.091	0.072	0.062
0-0.25	0.102	0.084	0.090	0.089	0.161	0.143	0.220	0.183	0.116	0.075	0.111	0.095	0.100	0.081	0.077	0.060	0.075	0.062	0.115	0.177	0.100	0.091	0.082	0.083
1-2.5	0.155	0.087	0.126	0.099	0.185	0.161	0.229	0.190	0.132	0.104	0.125	0.104	0.109	0.091	0.093	0.085	0.091	0.117	0.139	0.197	0.125	0.112	0.106	0.112
2-5	0.185	0.100	0.143	0.135	0.199	0.174	0.241	0.195	0.143	0.120	0.149	0.122	0.121	0.115	0.100	0.102	0.100	0.132	0.149	0.223	0.131	0.132	0.111	0.129
5	0.173	0.163	0.164	0.183	0.251	0.197	0.262	0.218	0.154	0.137	0.160	0.159	0.159	0.139	0.122	0.111	0.110	0.140	0.179	0.297	0.153	0.164	0.130	0.167
10	0.200	0.205	0.205	0.275	0.260	0.299	0.294	0.282	0.186	0.200	0.200	0.210	0.253	0.184	0.184	0.175	0.222	0.221	0.291	0.334	0.201	0.210	0.168	0.231
COMBINACION	0.950	0.994	0.980	0.999	0.944	0.995	0.958	0.980	0.950	0.980	0.926	0.960	0.980	0.980	0.970	0.974	0.990	0.987	0.986	0.950	0.980	0.983	0.980	0.995

EEI 84-080



EEI 84-080

Tabla D.6: Lecturas a 450 nm de parejas de anticuerpos monoclonales con diversas concentraciones de EEB y EEC.

CONCENTRACION TOXINA (ng/ml)	A5-B2*		A5-B8*		A5-B9*		A5-B10*		A5-B12*	A7-B2*		A7-B3*		A7-B9*	
	FEB	EEC	EEB	EEC	FEB	EEC	EEB	EEC	EEB	EEB	EEC	EEB	EEC	EEB	EEC
0	0'056	0'072	0'080	0'113	0'061	0'085	0'176	0'142	0'251	0'108	0'108	0'137	0'167	0'201	0'158
0'625	0'100	0'137	0'093	0'171	0'174	0'138	0'243	0'237	0'300	0'201	0'236	0'291	0'323	0'382	0'272
1'25	0'132	0'165	0'153	0'234	0'187	0'148	0'257	0'294	0'372	0'281	0'312	0'304	0'388	0'388	0'334
2'5	0'164	0'216	0'185	0'237	0'209	0'216	0'271	0'315	0'425	0'224	0'363	0'304	0'388	0'357	0'352
5	0'150	0'240	0'193	0'281	0'212	0'229	0'288	0'367	0'468	0'248	0'373	0'333	0'463	0'367	0'376
10	0'253	0'303	0'273	0'382	0'253	0'301	0'373	0'441	0'536	0'462	0'468	0'452	0'576	0'488	0'489
CONCENTRACION	0'944	0'936	0'935	0'959	0'740	0'935	0'931	0'897	0'956	0'976	0'861	0'823	0'870	0'799	0'887

Tabla D.6: Continuación

CONCENTRACION TOXINA (ng/ml)	A7-B10*		A7-B12*	B4-A5*		B4-A7*		B7-A5*		B7-A7*		B14-A5*		B14-A7*	
	EEB	EEC	EEB	EEB	EEC	EEB	EEC	EEB	EEC	EEB	EEC	EEB	EEC	EEB	EEC
0	0'078	0'167	0'275	0'113	0'132	0'099	0'106	0'148	0'138	0'142	0'150	0'134	0'132	0'113	0'109
0'625	0'109	0'167	0'279	0'129	0'136	0'150	0'161	0'195	0'192	0'157	0'178	0'228	0'164	0'183	0'191
1'25	0'190	0'232	0'443	0'192	0'214	0'198	0'185	0'220	0'203	0'210	0'200	0'232	0'232	0'189	0'240
2'5	0'219	0'306	0'455	0'223	0'215	0'204	0'199	0'235	0'240	0'246	0'210	0'269	0'280	0'210	0'242
5	0'239	0'367	0'470	0'247	0'219	0'258	0'225	0'289	0'249	0'250	0'237	0'286	0'296	0'230	0'256
10	0'451	0'576	0'561	0'311	0'295	0'343	0'321	0'296	0'289	0'332	0'281	0'370	0'323	0'272	0'333
CORRELACION	0'970	0'981	0'844	0'929	0'896	0'957	0'961	0'871	0'890	0'958	0'958	0'909	0'833	0'880	0'863

Tabla 0.7: lecturas a 450 nm de parejas de anticuerpos monoclonales con diversas concentraciones de EE y lecturas en extractos de alimentos contaminados con EEB.

CONCENTRACION LECTURA (µg/ml)	B4-B0*	B4-B10*	A5-A7*	A5/A7-A5*/A7*				
	EEB	EEB	EEB	EEA	EEB	EEC	EED	EEE
0	0'070	0'033	0'081	0'052	0'031	0'070	0'091	0'097
0'625	0'095	0'074	0'091	0'089	0'116	0'100	0'103	0'099
1'25	0'103	0'110	0'115	0'103	0'141	0'137	0'115	0'135
2'5	0'118	0'153	0'135	0'139	0'179	0'183	0'125	0'167
5	0'142	0'190	0'157	0'199	0'200	0'210	0'187	0'225
10	0'177	0'250	0'232	0'259	0'272	0'277	0'250	0'295
CONCENTRACION	0'960	0'930	0'900	0'972	0'961	0'940	0'990	0'970
LECHE (*)	0'077 (-1'06)	0'030 (-2'25)	0'019 (-4'70)	0'105 (-0'22)				
LECHE+EEB	0'174 (9'43)	0'208 (9'80)	0'229 (9'70)	0'272 (9'42)				
YOGUR	0'089 (0'23)	0'097 (0'07)	0'088 (-0'57)	0'126 (0'90)				
YOGUR+EEB	0'186 (10'75)	0'312 (10'92)	0'234 (10'04)	0'283 (10'05)				
SALCHICHA	0'033 (-5'02)	0'052 (-1'22)	0'055 (-2'29)	0'090 (-1'09)				
SALCHICHA+EEB	0'104 (1'05)	0'110 (1'48)	0'111 (1'56)	0'130 (1'21)				

(*): ng de EEB (en 100 µl de muestra) correspondientes a la lectura obtenida a 450 nm.

es la única que puede ser detectada con parejas de monoclonales obtenidos frente a EEA y EEB. Se escogieron tres parejas (B4-B9*, B4-B10*, A5-A7*), probándose también una mezcla de los anticuerpos A5 y A7 empleada tanto como tapizado como en el paso de conjugado.

E. DISCUSION



E.I. ELECCION DE LA LINEA DE MIELOMA

La línea empleada en nuestro laboratorio (Sp2/O) fue producida por Shulman et al. en 1978 [241]. Se trata de una línea muy bien estudiada y ampliamente empleada. Posee las características comunes a la mayoría de las líneas celulares empleadas en la producción de anticuerpos monoclonales, esto es, carece de la enzima HGPRT y no produce inmunoglobulinas propias, ni cadenas ligeras ni pesadas.

Para Zola y Brooks [296], si se compara esta línea con la NP-3, posee la desventaja de que produce muchos menos híbridos tras realizar la fusión. Fazekas [88] opina que tras ser fusionada, pierde con facilidad los cromosomas necesarios para producir inmunoglobulinas, además crece más lentamente que las demás y la concentración límite que soporta es menor que otras, por lo que no la considera recomendable. Bartal y Hirshaut [13] dicen que es una de las líneas de mieloma más difíciles de manejar. Goding [111] la describe como una línea especialmente sensible a las altas diluciones y al pH excesivamente alcalino, y en general a todas las condiciones ambientales.

Sin embargo y pese a estas premisas desfavorables, en nuestras manos se comportó como una línea de fácil manejo, resistente a elevadas diluciones, que conservaba en cultivo continuo durante mucho tiempo su sensibilidad a la aminoptericina sin necesidad de dar un pase con 8-azaguanina y que producía híbridos estables y en gran número. Reading [216] también coincide en que se trata de una línea muy estable. Quizá todo esto sea debido a que con el tiempo hayamos modificado la línea celular obteniendo una sub-línea que se adapta perfectamente a las condiciones de nuestro laboratorio.

E.II. CONDICIONES DE CULTIVO Y CONSERVACION CELULAR

Normalmente, mientras no se necesitaba utilizar las células de mieloma, éstas eran mantenidas en un arcón congelador a -80°C . Este sistema de congelación es bastante

más económico y cómodo que el de almacenamiento en nitrógeno líquido, ya que en este último caso hay que estar muy pendiente para que el nivel del nitrógeno no disminuya demasiado, ya que así no se producen variaciones de temperatura que afectarían a la viabilidad celular. Por otro lado el sistema de almacenamiento en congelador es muy sencillo, ya que disponemos de mucho más espacio, con lo que se pueden utilizar más apiladores de gradillas, siendo además el acceso a los viales mucho más rápido.

Aunque con este sistema podemos encontrarnos lotes de células con una viabilidad un tanto baja, nosotros hemos descongelado líneas con más de un año de almacenamiento a -80°C y con una viabilidad óptima (90-95 %), mientras que algunos hibridomas congelados durante poco más de un mes poseían una viabilidad ligeramente más baja (65-70 %). Estos resultados nos conducen a pensar que más que el sistema de almacenamiento influye el proceso de congelación, donde coexisten varios factores, muchas veces difíciles, si no imposibles, de estandarizar (estado de la línea celular en el momento de la congelación, velocidad de adición de la mezcla congelante, tiempo de exposición a la misma sin introducir la muestra en el congelador, etc.).

A todo esto hay que añadir que en nuestro laboratorio el congelador era empleado para otros usos, no exclusivamente como almacén de líneas celulares, por lo que era abierto con frecuencia y muchas veces durante un tiempo excesivamente prolongado, con lo cual la temperatura subía más de lo deseable, con el consiguiente perjuicio para las células congeladas.

Pese a todo ello hemos comprobado que dada su sencillez, este sistema es el de elección para aquellos laboratorios que no dispongan de una infraestructura adecuada para el mantenimiento de depósitos de nitrógeno líquido. Cuando se tienen que utilizar recipientes grandes que admitan una distribución de los viales de congelación, se debe proceder a un rellenado frecuente del nitrógeno, puesto que se trata de depósitos con boca muy ancha, lo que

ocasiona que la tasa de evaporación diaria sea muy elevada, aún sin abrir la tapa muy frecuentemente.

E.III. CONDICIONES DE TRABAJO Y CULTIVO

E.III.a: Contaminación microbiana:

E.III.a.1: Contaminación fúngica: debemos señalar que las condiciones de trabajo en nuestro laboratorio eran extremas. En nuestro departamento existe una línea de investigación en hongos y sus micotoxinas, lo que hace que el ambiente tenga una carga elevadísima de esporas, por lo que las medidas preventivas debían ser máximas. Estas medidas eran tomadas en el sentido de una limpieza y esterilización frecuente de la zona de trabajo y del laboratorio anejo en el cual teníamos la zona de centrifugación y almacén de materiales, y al cual no podía pasar nadie que no trabajara con cultivos tisulares. No obstante, y debido a la mala calidad microbiológica del aire, todo trabajador de esta zona restringida, debía ponerse cubrezapatos desechables, mascarilla desechable, bata limpia que no podía salir del laboratorio de cultivo tisular y gorro desechable. Para intentar disminuir un poco la carga microbiana, se encendían lámparas ultravioleta una vez terminado el trabajo, aunque su eficiencia es nula en zonas un poco alejadas del punto de emisión.

El momento crítico para la contaminación, era el periodo post-fusión hasta realizar la primera clonación y en general en todos los momentos en que los hibridomas o los clones se encontraban un periodo largo en microplaca, siempre más accesibles a una posible contaminación fúngica que cuando están en botella (el diseño de estas dificulta en gran manera cualquier tipo de contaminación ambiental).

Optamos por descartar la adición de cualquier sustancia fungicida o fungistática al medio de cultivo, tras comprobar que no impedía la contaminación en comparación con placas que no llevaban aditivo alguno con este fin.

E.III.a.2: Contaminación bacteriana: en nuestro caso no tuvimos nunca un problema de contaminación bacteriana, bien sea porque la rutina de trabajo lo evitaba, o porque la gentamicina añadida al medio eliminaba dicha contaminación.

E.III.a.3: Contaminación por micoplasmas: se debería comprobar de forma periódica la presencia/ausencia de micoplasmas. No obstante los métodos de cultivo clásico empleados por nosotros no parecen ser los idóneos, no encontrando nunca contaminación por estos microorganismos. Parece que la simple adición de un agente anti-PPLO al medio era suficiente, ya que en ningún momento tuvimos problemas con caídas de viabilidad de cultivos.

E.III.b: Porcentaje de CO₂ :

Hemos probado dos concentraciones distintas de CO₂, 5 y 6%. Ambas permitían el desarrollo celular con absoluta normalidad, pero con el 6% se producía una mayor acidificación del medio de cultivo cuando las células estaban lo suficientemente crecidas como para realizar un pase, con lo cual el color del medio nos indicaba que botellas debían ser observadas al microscopio y cuales no. En el caso del 5% de CO₂ el cambio de color era más suave y menos indicativo del crecimiento celular, resaltando de nuevo que ambas concentraciones permitían un buen desarrollo celular.

E.III.c: Porcentaje de FCS:

Como se describe en el apartado de material y métodos, normalmente se empleaba el FCS al 15% y en determinados casos al 20%. Sin embargo algunos lotes de FCS de peor calidad exigían su aporte a una concentración mayor (20% como mínimo). Este problema se resolvería testando muestras de FCS previamente a su adquisición, para así elegir un lote determinado de una determinada marca en grandes cantidades. Esto, por desgracia, sólo es posible en laboratorios con un gasto elevado de FCS y con grandes disponibilidades económi-

cas, no siendo este nuestro caso. Esto nos sirve para recalcar el que por mucho que determinado lote de FCS sea analizado en varios laboratorios de prestigio en cuanto a su capacidad de soportar crecimiento celular a altas diluciones, este FCS puede que no sirva en las condiciones de trabajo de otros laboratorios con las mismas garantías que en los que fue probado. Su eficacia puede verse mermada si, por ejemplo, el medio de cultivo es un poco peor.

E.IV. PROTOCOLO DE INMUNIZACION

Como se puede observar en la Tabla E.1, que resume las pautas de inmunización empleadas por los diversos autores, éstas son muy variadas, y por lo que puede deducirse obtenidas de una forma empírica (aunque se haya hecho en algunos casos estudios previos analizando los títulos séricos de ratones inmunizados con distintas pautas), ya que si no no serían tan diferentes.

E.IV.a: Concentraciones de toxina:

En nuestro esquema de inmunización, el aumento de la dosis es paulatino, aplicando concentraciones bastante bajas de inmunógeno en las tres primeras inoculaciones intraperitoneales (ip.) (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{ratón}$), mientras que producimos un salto cuantitativo importante en la cuarta inmunización ip. (100 $\mu\text{g}/\text{ratón}$). El protocolo que más se asemeja al nuestro es el de Thompson *et al.* [269], aunque estos autores no producen este aumento tan brusco de enterotoxina, con el que nosotros intentamos provocar un aumento de los linfocitos productores de anticuerpos frente a la enterotoxina, en las fases finales de la inmunización, en espera de la última dosis intravenosa (iv.).

Por un lado encontramos autores que utilizan concentraciones bajísimas de enterotoxina (1 $\mu\text{g}/\text{ratón}$) y de forma constante en todas las inoculaciones y en cada tipo de enterotoxina [156] y otros aumentan progresivamente la concentración aplicada a cada animal hasta un cierto nivel

Tabla E.1: Resumen de protocolos de inmunización para la producción de AAs frente a EEs

	INOCULACION															
	1° / 2° / 3° / 4° / 5°	1° / 2° / 3° / 4° / 5° / 6°	1° / 2° / 3° / 4° / 5°													
ENTEROTOXINA	C	C	C	C	C	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	
VIA DE INOCULACION	ip	ip	ip	ip	iv	ip	ip	ip	ip	iv	ip	ip	iv	iv	iv	
MEDIO PARA LA MENSURACION DE LA TOXINA	FCA	FCA	FCA	FCA	(-)	FCA	FCA	FCA	FCA	FCA	(-)	FCA + PBS	FIA + PBS	PBS	PBS	PBS
DIA DE INOCULACION	0	10	20	50	3 af	0	10	20	30	60	3 af	0	20	3 af	2 af	1 af
CONCENTRACION DE ENTEROTOXINA (µg)	5	10	20	20	40	1	5	10	20	20	40	50	150	150	150	150
	Thompson et al., (269)					Thompson et al., (269)					Edwin et al., (83)					

Tabla E.1 (continuación)

	INOCULACION																
	1° / 2° / 3°	1° / 2° / 3° / 4°	1° / 2° / 3° / 4°	1° / 2° / 3° / 4°	1° / 2° / 3° / 4°	1° / 2° / 3°	1° / 2° / 3° / 4° / 5° / 6° / 7° / 8° / 9° / 10° / 11° / 12°										
ENTEROTOXINA	D	A	A	(*)	(*)	(*)	(*)	B	B	B	B	A	A	A	ET	ET	ET
VIA DE INOCULACION	ip	ip	ip/iv	pp	pp	pp	iv/ie	ip	ip	ip	iv	ip	ip	iv	ip	ip	ip
MEDIO PARA LA MENSURACION DE LA TOXINA	FCA	FIA	(-)	FCA	FIA	FIA	PBS	FCA	FIA	FIA	(-)	(#)	PBS	(-)	FCA	FIA	(-)
DIA DE INOCULACION	0	31	132/2af	0	14	20	3 af	0	20/35	56/70	4 af	0	14	35 ó 3 af	0	5, 12, 19	(*).. 2af
CONCENTRACION DE ENTEROTOXINA (µg)	175	100	200	1	1	1	1	10*6	25	10*6	25 + 1 151P8	100	50	100	25	25	25
	Meyer et al., (173)			Lapeyre et al., (157)				Lin et al., (103)			Schmidler et al., (290)			Bosch et al., (85)			

- (*) Inmunizan con EEA, EEB, EEC y EED
- (#) EEA en forma de precipitado de alúmina
- (+) duración de la inmunización 6 semanas
- (*) 2 veces semanales hasta 2 días antes de la fusión
- (-): No se define

6
 7
 8
 9
 10
 11
 12

[83, 163, 269]. Bohach et al. [35] emplean una concentración fija en todas las inmunizaciones, pero bastante mayor que en el caso de Lapeyre et al. [156] (25 μ g).

En este aspecto de las concentraciones aplicadas, debería influir la toxicidad de cada una de la enterotoxinas y su inmunogenicidad, ya que en general la inmunización con enterotoxinas estafilocócicas es difícil debido a su elevada toxicidad [183]. Nosotros comenzamos con una dosis de 5 μ g de EEB por animal, no encontrando problema alguno debido al posible efecto tóxico. Para la EEA, empleamos un esquema idéntico, y tampoco encontramos ningún tipo de efecto tóxico aparente a la dosis anteriormente descrita, aunque esta enterotoxina parece ser un poco menos tóxica [173] y tal vez podríamos haber aumentado ligeramente las dosis administradas sin problema alguno, pero probablemente sin obtener grandes mejoras en la inmunización de los animales. Thompson et al. [268], encontraron que la EEB era tóxica a la concentración de 5 μ g, por lo que primero realizaron una primera inoculación con 1 μ g, tal vez para que el animal adopte una cierta resistencia al efecto tóxico de dicha toxina.

Lín et al. [163], utilizan unas dosis un tanto extrañas, ya que en la primera y tercera inoculaciones aplican 16'6 μ g de EEB por ratón y en la segunda 25 μ g.

Todo lo anteriormente dicho se refiere solamente a aquellos autores que inmunizan solamente con un tipo de enterotoxina y para las inoculaciones no endovenosas, de las cuales hablaremos más tarde.

En el caso de querer primar la obtención de anticuerpos monoclonales que reaccionen con más de una enterotoxina [173, 268], las inoculaciones varían, ya que se debe producir una alternancia en la aplicación de enterotoxinas. Meyer et al. [173], para obtener un anticuerpo monoclonal que reaccionara con todos los serotipos conocidos de enterotoxina, establecieron un protocolo en el que inoculaban 100 a 200 μ g de EEA y EED (son enterotoxinas poco tóxicas) alternativas en tres dosis y con intervalos entre 1 y 4

semanas. En esta pauta si se comenzaba con EED, la siguiente inoculación se realizaba con EEA y la ultima tambien con EEA. Lo contrario ocurría si empezaba con EEA. De esta manera se trataba de enriquecer los linfocitos productores de anticuerpos capaces de reconocer los determinantes comunes [173].

Thompson et al. [268] describen otro protocolo. Tras la primera inoculación con EE, se dejaba descansar al ratón durante 1 mes, luego se inoculaban 20 µg de una enterotoxina heteróloga en Adyuvante Incompleto de Freund. Tras un mes adicional se inoculaban 40 µg por via iv. de la primera toxina, matando al animal 3 dias después.

El punto que si es común a casi todos los protocolos es la administración de enterotoxina, una o varias veces, por via iv. (no siempre de forma exclusiva). Aunque aqui también existen grandes variaciones en las concentraciones, oscilando entre 1 µg [156] y 200 µg [173]. Esta última(s) dosis por via iv. pretenden una aumento rapido de los linfocitos de interés con vistas a la fusión ya cercana en esos momentos (entre 2 y 4 dias después). Bohach et al. [35] realizan la ultima inoculación por via intraperitoneal.

Lapeyre et al. [156] en ciertos casos sustituye la via iv. por la intraesplénica (ie.).

E.IV.b: Vía de inoculación:

Nosotros empleamos la via intraperitoneal, con una ultima inyección del antígeno por via intravenosa.

En la mayoría de los casos la via de inoculación es la intraperitoneal, salvo en la ultima dosis que es aplicada intravenosamente. En este apartado también debemos destacar a Lapeyre et al. [156], ya que la via intraperitoneal es sustituida por la aplicación del antígeno en la planta del pie.

Como ya hemos citado antes, Lapeyre et al. [156], realizan la ultima inoculación por via iv. o ie., siendo esta

última más novedosa, aunque está descrita en principio como un tipo de inmunización de dosis única [106, 250, 251].

E.IV.c: Medio para la vehiculación de la toxina:

Nosotros utilizamos un sistema similar al de Edwin et al. [83] quienes emplean FCA o FIA a partes iguales con PBS, pero añadiendo una cantidad ligeramente mayor de FCA o FIA, con el fin de que el efecto adyuvante se vea aumentado. La posible desventaja de añadir PBS (debe realizarse la suspensión con mucho cuidado para que esta esté adecuadamente hecha), se ve compensada con una más fácil aplicación al animal, ya que la mezcla es un poco más fluida que si se aplica la toxina en adyuvante solamente.

Normalmente se emplean los Adyuvantes Completo e Incompleto de Freund para la vía intraperitoneal y plantar. Casi todos los grupos de investigación utilizan FCA en la primera inoculación y FIA en las restantes, salvo en la inoculación por vena. Nosotros seguimos esta pauta. Por contra, Thompson et al. [269] utilizan en todas las inoculaciones intraperitoneales FCA. Bohach et al. [35] eliminan el adyuvante a partir de la quinta inoculación, sin especificar el medio en que va disuelta la EEC. Schönwälder et al. [236] realizan la primera inoculación aplicando la EEA en forma de precipitado de alúmina, mientras que en la segunda inoculación por vía intraperitoneal la toxina está resuspendida en PBS.

Para las inoculaciones iv., es de suponer que la EE estará resuspendida en PBS, aunque no todos los autores lo indican. Tampoco se indica en todos los casos el volumen inoculado, hecho que también sucede en las inoculaciones ip..

Lin et al. [163] además de aplicar 25 μg de enterotoxina por vía iv., inyectan 15 μg de lipopolisacárido, tal vez con la intención de potenciar la producción de interleuquina 2 y con ello la proliferación de linfocitos y del sistema inmune en general.

E.IV.d: Intervalos entre inoculaciones:

Los periodos de descanso entre inyección e inyección son bastante variables. Schonwalder et al. [236] dejan los intervalos más cortos, ya que llegan a inocular 2 veces semanales durante 4 semanas. Aparte del caso anteriormente citado, los 7 días que dejamos nosotros entre la primera y la segunda inoculación y entre ésta y la tercera parece ser el tiempo más corto, ya que Thompson et al. [269] dejan intervalos de 10 días, aunque al referirse en un trabajo posterior [268] a dicho protocolo, cita intervalos de una semana. El periodo de reposo más largo lo dejan Meyer et al. [173] al separar la segunda de la última inoculación 106 días.

Desde la última inoculación hasta la fusión, se deja un periodo que oscila entre los 2 y los 4 días como límites inferior y superior, periodo en el cual la división de linfocitos específicos es máxima, con lo que la fusión se ve favorecida.

E.V. FUSION

Nuestro principal objetivo desde el principio fue el de establecer un protocolo de fusión lo más sencillo posible y con un elevado rendimiento, entendiéndose por esto el obtener un gran número de híbridomas. Por todo ello desechamos desde el principio técnicas sofisticadas como la electrofusión o la clonación por FACS. En ambos casos se presentaban otra serie de dificultades como eran el elevado coste del aparato para clonar o la necesidad de construir un aparato para la electrofusión, aunque existan comercializados.

Con estas premisas, nos decidimos por el empleo de técnicas clásicas, que fueron adaptadas poco a poco a nuestras condiciones de trabajo. Por desgracia, como en casi todos los laboratorios, este proceso se realiza por medio del típico método del "ensayo y error". La adaptación de la técnica de híbridomas a las peculiaridades de un grupo de investigación y su entorno de trabajo son por lo tanto

largas y costosas, no exentas de disgustos. Además, muchas decisiones pueden conllevar retrasos en la puesta a punto de la técnica, sin poder en muchos momentos encontrar los fallos cometidos. A todo ello se une el que los resultados dependen de la calidad de los productos empleados, e incluso en muchos casos (PEG, DMSO, etc.) del lote empleado. En definitiva, la técnica de hibridación tiene una dosis elevadísima de empirismo que hace que ningún laboratorio emplee una pauta igual a la de otro, por lo que en muchos casos los resultados no son comparables. Sin duda se deberían estudiar seriamente todos los factores que influyen en el proceso de obtención de hibridomas, eliminando ciertos tópicos que se arrastran desde su creación, universalizando la técnica los más posible.

E.V.a: Preparación de las células para la fusión:

En primer lugar hay que destacar la necesidad de disponer de células de mieloma en estado de crecimiento activo y con aspecto normal, es decir refringentes al ser observadas al microscopio invertido, con una morfología constante y adheridas al fondo de la botella. Las células no deben formar un tapiz muy uniforme, ya que en este momento empiezan a desprenderse. Por lo tanto es preferible utilizar más botellas, que dejar que las células se multipliquen más para así disponer de un número suficiente. El utilizar lotes de mieloma en estado no óptimo, es decir en fase estacionaria, supone en nuestro caso una caída en el número de pocillos con crecimiento positivo tras la fusión entre un 18 y un 37%. No obstante, teniendo en cuenta que cada fusión representa un ente aislado, es muy difícil achacar al estado celular todo el efecto negativo en el resultado final de una fusión. De las dos fusiones de prueba realizadas con un sobrecrecimiento de las células de mieloma, en una de ellas obtuvimos 186 pocillos positivos al crecimiento (de un total de 384) (48'4%) y en la segunda 448 de un total de 672 (66'6%). Esto representa una disminución considerable si tenemos en cuenta que la media habitual oscila entre el 85-90% de pocillos con crecimiento positivo.

E.V.a.1: Lavado celular: con este proceso tratamos de eliminar sustancias que pudieran entorpecer o dificultar el desarrollo normal de la fusión. El lavado de las células de mieloma pretendía eliminar la presencia de FCS, ya que se asume que la presencia de suero en la mezcla celular que va a ser fusionada provoca la precipitación proteica cuando se añade PEG, aunque para Zola y Brooks [296], esto no representa problema alguno. El lavado de las células de bazo tenía como objeto el eliminar la solución de lisado de células rojas que nosotros empleamos (ver más adelante), así como restos de grasa y otras sustancias que podrían impedir una acción correcta sobre las células.

E.V.a.2: Temperatura: en nuestras primeras fusiones para puesta a punto de la técnica de fusión no realizábamos control de temperatura, en tanto que tampoco atemperábamos el medio de cultivo para los pases normales de las células de mieloma. No obstante, al disminuir la temperatura ambiente en invierno, la viabilidad de los pases empeoró bastante, teniendo en cuenta el aspecto que mostraban los cultivos al observarlos al microscopio. Tras proceder a calentar los frascos con medio a 37°C en un baño maría y observar la vuelta a la normalidad de los cultivos, procedimos a aplicar este cambio a la técnica de fusión observando un aumento en el número de pocillos con crecimiento positivo (10-15% de aumento).

Aunque muchos autores describen el mantenimiento de todas las sustancias y células que van a ser empleadas en la fusión en hielo [101], parece más lógico el situar todo ello a una temperatura que asegure la máxima viabilidad celular (37°C). Fazekas y Scheidegger [91] describieron el efecto perjudicial del mantenimiento de las células bajo la acción del hielo hasta que éstas fueran empleadas.

Otros autores realizan la fusión a temperatura ambiente [91, 296] con el fin de evitar los problemas con respecto a la esterilidad que ocasiona el manejar un baño termostático que mantenga células y medio de cultivo a la temperatura de 37°C. Nosotros no tuvimos problema alguno respecto a este

punto. No obstante Zola y Brooks [296] no encontraron una mejoría importante con el empleo de medio atemperado a 37°C, aunque nosotros creemos que de esta manera se evitan las fluctuaciones de temperatura que ocurren estacionalmente, con lo que logramos estandarizar la técnica. Esto es imposible si el proceso se realiza a temperatura ambiente, aunque en nuestro caso existían momentos en que rompíamos esta constante al centrifugar a temperatura ambiente.

E.V.a.3: Lisis de eritrocitos: la lisis de eritrocitos no intentaba sino disminuir el número de células contaminantes, entendiéndose por ellas a aquellas que no nos interesan para la fusión, para de esta manera aumentar la frecuencia de contacto entre linfocitos y mieloma por una simple disminución del número de células de bazo no deseadas. Naturalmente, no podemos pensar que los eritrocitos iban a desaparecer totalmente, pero sí en gran número. Aunque Fazekas [88] se opone a introducir un proceso de este tipo por aumentar el riesgo de contaminación, el tratamiento es muy sencillo y jamás hubo contaminación por este paso. Nosotros no tratamos de eliminar otros tipos celulares ya que para ello debíamos recurrir a técnicas más complejas, que irían en contra de la sencillez y rapidez de la técnica que buscábamos desde el principio, ya que podíamos haber recurrido a otros métodos para eliminar los eritrocitos [187, 188]. Goding [111] considera este paso innecesario.

E.V.b: Agente fusionante:

La gran mayoría de los investigadores que emplean la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales utiliza como agente fusionante el PEG. En principio el peso molecular de esta sustancia parece irrelevante [111] aunque éste dependa tal vez del protocolo empleado [284]. Para nosotros influye más el lote de PEG empleado, ya que la toxicidad de esta sustancia varía mucho de un lote a otro [111]. De hecho, en nuestro laboratorio dos lotes distintos de PEG de la misma marca (SIGMA) y peso molecular dieron rendimientos muy distintos a la hora de producir hibridomas. La ventaja

de encontrar un buen lote reside en que si este se almacena correctamente puede durar mucho tiempo en condiciones óptimas en cuanto a la efectividad en la fusión, ya que el gasto de PEG por fusión es muy bajo. Nosotros también encontramos diferencias entre dos marcas (FLUKA y SIGMA), ya que a similar peso molecular, la primera daba un rendimiento de hibridación nulo, debido sin duda a la elevada toxicidad del mismo ya que la técnica empleada era la misma. Realizamos estas comparaciones de PEG (marca y lote) fusionando exclusivamente células de mieloma (Sp2/O) entre sí y comprobando más adelante su viabilidad por una simple observación microscópica en placas de microcultivo. Con la marca luego desechada (FLUKA, PEG 1.000) todas las células aparecían muertas al día siguiente. Con el de la marca SIGMA en todos los pocillos existían células vivas y multiplicándose activamente aún en el peor de los lotes. En dicho lote el aspecto de los pocillos bajo el microscopio presentaba mayor cantidad de detritus, debido sin duda a una mayor mortalidad celular, aunque hemos de remarcar que aparecía crecimiento en todos los pocillos. No procedimos al recuento celular de los pocillos por lo que no podemos dar datos, aunque para nosotros pareció suficiente el mero análisis visual. Al no haber analizado otro lote de la marca FLUKA, no podemos asegurar que se trate de un PEG inadecuado para la fusión, ya que podía tratarse de un lote en mal estado.

Los pesos moleculares empleados en los diversos trabajos publicados oscilan entre 400 y 4.000 [91, 101, 111, 208, 284]. Aunque como ya hemos citado antes el peso molecular en principio es irrelevante por sí mismo, los de peso molecular más bajo son más tóxicos e impuros [88, 91]. No obstante el rango de peso molecular más empleado es el que oscila entre 1.500 y 4.000 [208].

Aunque muchos autores preparan con antelación y en grandes cantidades la mezcla fusiónante, nosotros preferimos prepararla justo el día que iba a ser utilizada, ya que suponía poco trabajo extra.

E.V.b.1: Porcentaje de PEG: la concentración típica de PEG oscila entre el 10 y el 50 % (P/V) [50, 111], aunque usualmente se emplea el 50% [50, 203]. Este porcentaje se consigue pesando una determinada cantidad de PEG y disolviendo esta con un volumen igual al peso de DMEM u otro medio de cultivo o tampón, siendo necesario calentarlo para poder homogeneizar la muestra. Por lo tanto, nosotros trabajamos en la que se considera máxima concentración de PEG que soportan las células, ya que por encima la toxicidad es muy elevada [111].

E.V.b.2: Esterilización de la mezcla fusionante: nos decidimos por una esterilización por filtración como hacen otros autores [76, 130, 150], ya que la esterilización por autoclave puede aumentar la cantidad de aldehídos en el PEG [130], lo que limita la efectividad del mismo como agente fusionante. El único problema que supone el esterilizar la mezcla fusionante por filtración es que la mezcla de PEG con DMEM debe estar caliente (unos 45-50°C) en el momento de la filtración, ya que si dejáramos que se enfriara, el filtro podría romperse al ser la mezcla demasiado viscosa como para ser esterilizada por este método. Por lo tanto, una vez calentada la mezcla debe ser esterilizada rápidamente para evitar el problema anteriormente mencionado, lo que nos obliga a tener el material preparado para no dilatar la operación. Esto no sucedería si se utilizara la esterilización en autoclave.

E.V.b.3: Tiempo de exposición a la mezcla fusionante: el tiempo de exposición celular frente al PEG parece ser crítico [296], exposiciones mayores a 2'5 minutos reducen drásticamente la eficacia de la fusión [150]. Esto puede deberse a ciertas características de las soluciones de PEG al 50%, ya que se trata de una solución hipotónica ante la que las proteínas precipitan, dañando las células [202]. Por lo tanto, la exposición frente al PEG debe ser corta, determinándose este periodo por un compromiso entre la máxima eficiencia en la fusión con un grado de daño aceptable [296]. El periodo de acción del PEG suele establecerse en 1 minuto, añadiendo en este tiempo 1 mililitro de este pro-

ducto gota a gota y girando suavemente el tubo donde se encuentra la mezcla celular. No obstante esta adición suave y en poco tiempo del PEG no parece ser tan importante como la rehidratación posterior en la cual diluimos poco a poco la sustancia favorecedora de la fusión celular, deteniendo así su acción [150, 152]. Para Fazekas y Scheidegger [91] y Lane [150] el periodo óptimo de acción del PEG es de 90 segundos, ya que con este intervalo se obtienen un número mayor de híbridomas. Ninguno de ellos trabajó con un periodo de exposición menor como nosotros hacemos.

El proceso de dilución anteriormente citado es crítico, ya que una adición demasiado rápida del medio rehidratante es dañina. En este momento es muy probable que las células agregadas que tal vez se fusionaría sean disociadas por un tratamiento excesivamente vigoroso [296]. Si por cualquier razón se quisiera disminuir el rendimiento de la fusión, es decir obtener un menor número de híbridomas, basta con realizar una rehidratación más rápida de lo normal. Cuanto más rápida sea, menor será el número de híbridos obtenidos, hecho que a veces es útil, pues manejar un elevado número de híbridomas es muchas veces difícil si la infraestructura del laboratorio es pequeña.

E.V.c: Manejo de las células tras la fusión:

No debemos olvidar que en este momento los híbridos recién formados son una población celular muy sensible y delicada, por lo que debe ser manejada con suavidad [296], evitando movimientos bruscos del tubo en donde se encuentran las células. Tras la fusión dejamos en reposo el tubo durante unos 10 minutos a temperatura ambiente, con el fin de favorecer la formación de heterocariones, proceso más lento que el de aglutinación celular y fusión de membranas que provoca el PEG. Tras este tiempo podemos proceder a la centrifugación de las células.

Zola y Brooks [296] aconsejan retardar un poco el proceso de centrifugación y posterior resuspensión de las células. Sin embargo, estos autores realizan un simple

cambio de medio para eliminar PEG y DMSO (disminuyendo de esta forma su efecto tóxico) y luego sitúan las células en una placa de petri en la estufa durante 1 a 3 horas. Nosotros entendemos que nuestro sistema es equiparable a este, pues este periodo lo pasan las células en las placas de microcultivo, en las cuales van a permanecer 15 días aproximadamente y creemos que tras los 10 minutos de incubación las células pueden ser sometidas a una centrifugación sin problema alguno. Incubaciones largas prolongan excesivamente el tiempo empleado en la fusión de forma innecesaria.

E.V.d: Relación celular:

Parece ser que el éxito de la producción de hibridomas depende exclusivamente del número de células de bazo empleadas, mientras que el número de células de mieloma utilizadas es irrelevante [287]. Muchos autores proponen una relación mieloma-bazo 1:10 [14, 101, 296], mientras que otros emplean una relación equitativa (1:1) [76, 91, 202]. Nosotros empleamos una relación distinta (1:5) que, como comprobaron Westerwoudt et al. [287], produce resultados equiparables a los obtenidos con la relación 1:10. Para nosotros la utilización de 1 célula de mieloma por cada 5 de bazo, conlleva la ventaja de que así disminuimos la frecuencia de fusiones no deseadas al aumentar el contacto entre células de mieloma y bazo, en tanto en cuanto hemos aumentado el número de células de mieloma. No obstante, con ambas relaciones encontramos un rendimiento de fusión idéntico (85-90%).

Aunque como hemos citado antes, lo importante es el número de células de bazo presentes en la mezcla celular que vamos a fusionar, Fazekas [88] cree que cualquier variación en la relación 1:10 hace que el experimento fracase, aunque deja bien claro que esta relación es debida tan sólo a que una botella de cultivo proporciona aproximadamente 10^7 células de mieloma, mientras que de un bazo podemos obtener unos 10^8 leucocitos.

En cuanto al recuento celular, nosotros determinábamos el número de células viables mediante el empleo de Tripán

Azul que, aunque no es el método más exacto [111], sirve, aunque solo sea de forma aproximada.

E.VI. SELECCION CELULAR Y CULTIVO POST-FUSION

Este es el período más complejo y difícil dentro de la producción de anticuerpos monoclonales [296]. Los productos resultantes de la fusión son genéticamente inestables, y por lo tanto en los primeros días se pueden perder varios cromosomas.

E.VI.a: Cultivo:

Existen principalmente dos formas para el cultivo de los productos de la fusión: placas de 24 pocillos con una capacidad de unos 2 mililitros de medio de cultivo en cada uno de ellos [191, 156] o en placas de microcultivo de 96 pocillos con unos 0.2 mililitros de capacidad [76, 83, 161, 202]. Los pocillos más pequeños poseen la ventaja de que la mayoría de los que poseen crecimiento tendrán una única colonia (a menudo equivalente a un clon), pero con la desventaja de que el volumen de sobrenadante disponible para detección es muy pequeño [14, 111].

En nuestro caso, distribuimos las células en un número aproximado de 2×10^5 por pocillo (en placas de 96 pocillos) en 200 μ l de medio selectivo, valores similares a los utilizados por otros autores como Edwin *et al.* [83] (2×10^5) y Lin *et al.* [163] (10^5), aunque también se pueden añadir más como hacen Oi y Herzenberg [202] (10^6). Otros autores emplean un número menor de células si tenemos en cuenta que lo hacen en pocillos de 2 ml de capacidad con lo cual en respecto al volumen empleado la relación es desfavorable. Lapeyre *et al.* [156] distribuyen 1.5×10^6 células en cada uno de los 24 pocillos.

Con nuestro sistema entre el 85 y el 90% de los pocillos presentaban como media crecimiento positivo tras la observación al microscopio invertido (80 a 90 pocillos por placa), aunque no era muy extraño observar crecimiento en la

totalidad de los pocillos de una placa.

E.VI.b: Medio selectivo:

Debido a la deficiencia enzimática que presenta nuestra línea de mieloma, la eliminación de células de mieloma no fusionadas o los híbridos mieloma-mieloma, se debía realizar por el sistema descrito por Littlefield [164, 165] que incorpora como agente selectivo Aminopterina, mientras que Hipoxantina y Timidina permiten la creación por vía exógena de ácidos nucleicos.

La aminopterina puede sustituirse por el metotrexato, compuesto afín a ella, que posee las ventajas de no ser fotosensible y ser menos tóxico [123]. En las pruebas realizadas en nuestro laboratorio, el rendimiento en la producción de híbridomas fue igual utilizando un compuesto u otro, siendo por lo tanto la fotosensibilidad la única ventaja con respecto al metotrexato, problema fácilmente solucionable y que no supone otro engorro que el de utilizar recipientes opacos o envolver los que no lo sean en papel de aluminio u otro recubrimiento que asegure la oscuridad. Nosotros nos decidimos por la Aminopterina debido a que, de los dos compuestos, es el único analizado por la casa SIGMA para su empleo en cultivos tisulares.

Los híbridomas crecían inicialmente en HAT y se realizaba la primera clonación en este medio. Nosotros probamos a realizar eliminaciones bruscas de HAT, comprobando que el 100% de los híbridomas sometidos a este proceso morían, por lo que decidimos omitir la Aminopterina y mantener la Hipoxantina y Timidina, lo cual no supone más trabajo ya que estas sustancias se añaden al fabricar el medio de cultivo y evitamos de este modo la pérdida de alguno de ellos, y eliminamos además el engorroso proceso de disminución paulatina de Hipoxantina y Timidina del medio de cultivo. Si tras realizar la completa eliminación de las células de mieloma retirábamos todos los componentes del medio selectivo (Hipoxantina, Aminopterina y Timidina) los híbridos morían rápidamente debido a que la Hipoxantina y la Timidina son utili-

zadas de una forma más rápida que la Aminopterina, con lo cual al quedar restos de esta intracelularmente y carecer las células de Hipoxantina y Timidina, no pueden emplear ni la vía principal ni la de salvamento para la síntesis de ácidos nucleicos [296]. Por lo tanto las células deben mantenerse en HT. Tras renovar el medio de cultivo varias veces, la concentración de Aminopterina ha disminuido lo suficiente como para que la vía principal de síntesis pueda entrar en funcionamiento, con lo que la Hipoxantina y la Timidina pueden ser eliminadas del medio de cultivo. Esto debe realizarse poco a poco, y aun así muchos de los híbridos no se acostumbran a la ausencia de estos componentes con lo cual mueren, por lo que es aconsejable mantener los cultivos en medio HT [296].

En estos estadios tempranos no debe procederse a la renovación frecuente del medio de cultivo, ya que el FCS no sólo no estimula la proliferación celular sino que al contrario, la inhibe [284]. Nosotros no realizábamos cambio alguno de medio hasta los 15-20 días tras la fusión, en que realizábamos el primer análisis de las placas. Esta ausencia de cambio de medio en los primeros días, junto con una mínima manipulación de las placas, evita que se separen células de la colonia original y así observarlas al microscopio podemos hacernos una idea del número de colonias que existen desde el principio. Si observamos una sola colonia, seguramente se tratará de un clon, hecho que no evita el realizar las pertinentes, y por otro lado necesarias clonaciones. Por el contrario, si se observan 2 ó más colonias (de muy diferente tamaño la mayoría de las veces) no quiere decir que no procedan de la misma célula.

Algunos autores posponen la adición de Aminopterina al siguiente día tras la fusión [14, 101, 156, 173, 202]. Oi y Herzenberg [202] realizan un aumento progresivo de la concentración de Aminopterina a partir del día siguiente a la fusión. La adición directa de la máxima concentración de Aminopterina da mejores resultados, ya que no sólo el número de híbridos supervivientes es mayor, sino que las colonias aparecen antes [31].

S. Sandoz

En nuestro protocolo siempre se contempló la adición de la máxima concentración de aminopterina el día de la fusión. Nosotros siempre pensamos que de esta manera actuábamos rápidamente sobre la población más importante a eliminar, el mieloma, que posee una multiplicación rápida. Así mismo, podría actuar de forma negativa sobre los híbridos en desarrollo consumiendo nutrientes de forma significativa si esta población fuera muy grande en origen, debido a una fusión deficiente.

Si a los pocos días (1 ó 4) aparecen todos los pocillos con un color amarillo intenso, y al observarlo al microscopio se ve toda la superficie de los mismos con un tapiz denso de células, quiere decir que la selección ha fallado con lo que las células de mieloma se han multiplicado sobreponiéndose a los híbridos. Este problema se nos presentó una sola vez y fue debido a la no comprobación de forma previa de la sensibilidad del mieloma a la Aminopterina. En estos casos no queda otro remedio que desechar toda la fusión. Este fallo es debido bien a que se haya estropeado la Aminopterina o bien a que la línea de mieloma haya sufrido una reversión por no haber dado un paso previo en medio de cultivo con 8-Azaguanina.

E.VI.c: Empleo de células "Feeder-Layer":

Nosotros siempre añadimos estas células tras la fusión y en las posteriores clonaciones, debido a que en esas fases las células se encuentran en momentos críticos ya que están muy diluidas. Las células utilizadas en todos los experimentos fueron macrófagos procedentes de lavado peritoneal, a una concentración de 500 células por pocillo. Aunque la inclusión de estas células o de sustitutos en forma de factores solubles es considerada muchas veces innecesaria [291, 296] está claro que cuando las condiciones del experimento no son las ideales, estas células o factores son imprescindibles. Nosotros optamos por añadirlas, debido a que creemos que es muy difícil controlar todos los factores que influyen en el desarrollo celular y que son determi-

antes en estas fases. Por ejemplo, si el FCS que vamos a emplear en la fusión no ha sido estudiado en las condiciones post-fusión que se dan en el laboratorio en cuestión, puede ser que no sea capaz de soportar el crecimiento celular a altas diluciones. Por lo tanto siempre es aconsejable añadir este tipo de células, que ayudan con la producción de factores solubles al crecimiento de los híbridos. Fazekas y Scheidegger [91] están a favor de la utilización de estas células debido a que sin ellas los resultados son muy variables de una fusión a otra, mientras que si se emplean los resultados son constantes.

Nosotros tan solo hicimos una comprobación del efecto de nuestras células de macrófago sobre los híbridos en desarrollo. Esto se realizó empleando la mitad de una fusión con la presencia de dichos macrófagos, y la otra mitad sin ellos. Los resultados en este caso indican que no son necesarios para el correcto desarrollo de los resultados de la fusión, ya que aunque en esta prueba obtuvimos más híbridomas por placa en las que utilizamos macrófagos, la diferencia no fue considerable (3'15 ± más), ya que obtuvimos una media de 90 pocillos por placa empleando macrófagos (93'75 ±), mientras que la media al ser omitidos disminuyó hasta 87 (90'6 ±). No obstante, optamos por seguir añadiendo este tipo de células ya que no estábamos seguros de que si por cualquier causa alguno de los factores concurrentes en la fusión fallara, los macrófagos pudieran ayudar a solventar dicha situación mediante el aporte de factores solubles.

De entre los muchos tipos de células empleadas a tal fin destacan los timocitos [5, 74, 161, 202], células de bazo procedentes de ratón no inmunizado [14, 296] y macrófagos peritoneales [91]. Nosotros nos decidimos por estos últimos debido a su fácil obtención en comparación con los primeros y a que si se emplean los segundos se aumenta la concentración de inmunoglobulinas inespecíficas al estar presentes muchos linfocitos B. Esto podría crear falsos positivos a la hora de la detección de híbridomas productores de anticuerpos específicos.

Hoy en día se conocen una serie de factores solubles que permiten la sustitución de estas células. Estos factores son muy útiles y efectivos, mostrándonos que la función de las células "feeder" no se debe tan sólo a su mera presencia numérica y a la eliminación de detritus. Sin embargo, esta última función desaparece si empleamos factores solubles como promotores del crecimiento celular. Otra de las ventajas, a veces muy importante, de la utilización de macrófagos peritoneales es su economía en comparación con cualquier factor de crecimiento comercial.

El mayor riesgo que corrimos al emplear macrófagos peritoneales, era que al obtenerlos y prepararlos el mismo día de la fusión, era imposible saber si los añadíamos contaminados o no. Este riesgo es mínimo si se emplea un ratón sano y toda la manipulación se realiza con cuidado. En nuestro caso nunca tuvimos como fuente de contaminación los macrófagos, por lo que se puede decir que el empleo de estas células es un buen sistema para promover el desarrollo celular. Sin embargo, no cabe duda que añadimos a la fusión células "contaminantes", hecho no muy deseable, pero poco importante ya que poco a poco, con los sucesivos pases, una vez estabilizado el crecimiento del híbrido, estas células desaparecen.

E.VII. ENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS

Elegimos como método para la detección de híbridos productores de anticuerpos el sistema ELISA, como realizan la mayoría de los grupos que han producido anticuerpos monoclonales contra las enterotoxinas estafilocócicas [83, 156, 163, 173]. La única excepción es la de Thompson et al. [269] quienes emplean el método RIA, que parece tener la ventaja de detectar híbridos productores de anticuerpos con gran afinidad por la enterotoxina, hecho que no parece ocurrir si se emplea el método ELISA [268]. No obstante, el radioinmunoanálisis tiene la desventaja de tener que manejar productos radiactivos.

E.VII.a: Tapizado del antígeno:

Nosotros sensibilizamos nuestras placas de microtitulación con 100 μ l de una solución de 1 μ g/ml de EE. Este proceso se realiza de forma diferente por cada autor. Las soluciones de tapizado son muy variables oscilando desde los 0'5 μ g/ml que utilizan Lapayre et al. [156] hasta los 2 μ g/ml de Meyer et al. [173], pasando por 1 μ g/ml de Lin et al. [163]. Edwin et al. [83] no definen su solución de partida.

La concentración final de enterotoxina en el pocillo varia, puesto que cada autor añade volúmenes diferentes de estas soluciones de tapizado. Por lo tanto, las concentraciones finales en cada pocillo son las siguientes, ordenadas de menor a mayor:

- * 0'02 μ g/pocillo [156]
- * 0'05 μ g/pocillo [163]
- * 0'2 μ g/pocillo [173]
- * 1'0 μ g/pocillo [83]

Finalmente, nosotros tapizábamos nuestras placas a una concentración de 0'1 μ g por pocillo, ya que llenábamos cada uno de ellos con 100 μ l de la solución de partida, con lo que nos situamos en un punto intermedio en relación a los demás autores.

Nuestro tampón para la dilución de las EEs era PBS 0'01 M pH 7'2. El tampón en el que se diluían las enterotoxinas también es muy variable: PBS pH 8'0 [173], PBS con pH sin determinar [156] y tampón carbonato-bicarbonato 0'1 M pH 9'6 [163]. Edwin et al. [83] no indica el medio en el que realiza la dilución de la toxina. Como se puede observar fácilmente, aquellos autores que indican el pH de la solución emplean un medio más alcalino que el nuestro. Este factor no creemos que afecte a la unión de la toxina al plástico, y 7'2, si es un pH más adecuado para la estabilidad de las toxinas.

El punto es que si se diferencia claramente nuestro

sistema de análisis es en el periodo de incubación y la temperatura a la que se realiza. Todos los autores realizan este paso a 4°C durante 18 horas, mientras que nosotros lo realizamos a 37°C durante el mismo tiempo. Para evitar las posibles desecaciones, introducíamos las placas en una cámara húmeda y la situábamos a la temperatura adecuada. En las pruebas que realizamos para comprobar si existían diferencias entre una y otra temperatura, observamos que ambos sistemas eran completamente equiparables, siendo para nosotros mucho más cómodo la incubación en estufa que en nevera, debido a que disponemos de más espacio en la primera.

E.VII.b: Bloqueo:

Nosotros lo realizamos añadiendo 100 µl de BSA al 3% en PBS, incubando las placas durante 1 hora a 37°C. Sólo Lin et al. [163] señala la cantidad de la solución de bloqueo que añade a cada pocillo (200 µl). No encontramos reacción alguna con el BSA que nos pudiera dar falsos positivos, comprobación realizada tras emplear dicha sustancia como antígeno de tapizado. El problema de reacciones inespecíficas con el BSA es posible cuando se emplean sistemas ELISA cuya fuente de anticuerpos sea policlonal (caso que nos atañe al emplear RAM) [235], ya podrían estar presentes anticuerpos frente a esta sustancia (albúmina sérica). En el caso que se nos hubiese presentado el problema, la solución habría sido sencilla pues habría bastado con añadir BSA al tampón de dilución del RAM [235].

Tras el periodo de incubación todos los autores realizan un bloqueo, para intentar tapar los huecos que deje libres la solución de tapizado. La mayoría de ellos lo hacen con BSA [83, 163, 173] bien al 1% [83] o al 3% [163], bien sólo [163, 173] o con Tween-20 al 0'05% [83]. Se suele dejar bloquear durante un periodo de 1 hora, en la más corta de las incubaciones [173] ó 2 horas [83, 163], aunque Lin et al. [163] también realiza este bloqueo a 4°C durante una noche. Salvo esta excepción, todos los autores hasta ahora

citados en este punto realizan el bloqueo a 37°C.

Lapeyre et al. [156] realizan el bloqueo con una solución al 0'25% de gelatina con el 0'1% de Tween-20 en PBS, incubando las placas durante 1 hora a temperatura ambiente, siendo por lo tanto los únicos autores que no emplean BSA como agente de bloqueo. Tan sólo Lin et al. [163] procede al lavado de las placas previamente a la adición de la solución de bloqueo.

Nosotros realizamos los lavados posteriores con PBS con el 0'01% de Tween-20. En los demás pasos todos los grupos realizan los correspondientes lavados, la mayoría de ellos con PBS con Tween-20, como realizamos nosotros [83, 163, 173], aunque empleando este a diferentes proporciones: 0'02% [173] y 0'05% [83, 163]. Lapeyre et al. [156], realizan los lavados con la misma solución empleada en el bloqueo.

En los pasos de lavado no es necesario aumentar la concentración de Tween-20 ya que no se necesita realizar una función de bloqueo sino que se quiere actuar como detergente, por lo tanto con la cantidad añadida por nosotros es más que suficiente, sobre todo si se tiene en cuenta que algunos autores realizan el lavado con agua corriente [8], sin encontrar diferencias con un lavado con PBS-0'5% Tween 20.

E.VII.c: Sobrenadante de cultivo:

Posteriormente se procede a añadir el sobrenadante de los cultivos a analizar. Nosotros añadimos 100 µl por pocillo. El volumen que depositan otros autores es de 100 µl como máximo [156] y 50 µl como mínimo [83, 163]. Meyer et al. [173] añaden entre 50 y 100 µl, sin especificar exactamente el volumen de cultivo analizado.

El tiempo de incubación es menor que el nuestro (2'5 h) en todos los casos salvo en el de Edwin et al. [83] quienes incuban las placas durante 3 horas, por las 2 horas de incubación que desarrollan Meyer et al. [173] y Lin et al. [163]. De nuevo Lapeyre et al. [156] realizan este proceso de manera totalmente diferente a la de los demás, ya que

mantienen el sobrenadante en las placas de microtitulación solamente durante 1 hora y lo hacen a temperatura ambiente. En cualquier caso, parecen suficientes incubaciones que oscilen entre 2 y 3 horas para una reacción correcta. Nosotros en un principio realizamos incubaciones de 2 horas y 2'5 horas (añadiendo 50 μ l por pocillo en dos placas distintas) para comparar la validez de cada uno de los periodos, encontrando una mayor diferencia entre positivos y negativos con la incubación más larga.

E.VII.d: Conjugado:

El siguiente paso es el de añadir anticuerpos anti-especie marcados en todos los casos con peroxidasa. Nosotros empleamos exclusivamente anticuerpos anti-IgG, como realizan más investigadores [83, 173], mientras que Lapeyre *et al.* [156] parecen emplear anticuerpos frente a todas las inmunoglobulinas del ratón, aunque sin especificarlo claramente. Lin *et al.* [163] son un poco más restrictivos, y su RAM sólo reconoce las clases A, G y M. Estos dos últimos grupos tienen la ventaja sobre los demás, incluidos nosotros, de no desechar desde el principio ciertos tipos de inmunoglobulinas que podrían ser útiles en su utilización práctica para la detección y estudio de las enterotoxinas estafilocócicas. Esto puede ser útil en el caso de las IgM, ya que los híbrdomas productores de IgA e IgE son raros, incluso si se buscan premeditadamente.

La mayoría de los autores utilizan RAM, salvo Meyer *et al.* [173] quienes emplean anticuerpos anti-IgG de ratón obtenidas en cabra en vez de en conejo (GAM).

El buscar varios tipos de inmunoglobulinas complica y encarece la posterior tipificación de las mismas, ya que necesitaremos más anti-inmunoglobulinas específicas para cada clase y subclase, mientras que si sólo detectamos IgG, sólo necesitaremos determinar la subclase de IgG a la que pertenece cada anticuerpo monoclonal. Sin duda el abaratamiento de los costes es notable, dado el elevado precio de estos reactivos comerciales. En este punto se debe

decidir entre el coste y la posible rentabilidad de hibridomas productores de otras clases de inmunoglobulinas.

La concentración del conjugado es variable según la marca comercial y el lote, aunque normalmente se emplea a una dilución 1:1.000, si bien Meyer et al. [173] no lo especifica y Lin et al. [163] lo emplea 10 veces más concentrado (1:100), lo que parece excesivo.

La cantidad añadida a cada pocillo oscila entre 50 μ l [163, 173], como hacemos nosotros, y 100 μ l [83], mientras que Lapayre et al. [156] no citan el volumen añadido.

Consideramos que media hora es un tiempo más que suficiente para que se produzca una unión tan específica como esta. El periodo de incubación es en todos los casos superior al nuestro. Este tiempo oscila entre 1 hora [83, 156, 173] y 1'5 horas [163]. Todos son a nuestro parecer tiempos excesivos, que pueden dar lugar a uniones inespecíficas que falseen los resultados. Este caso es extremo en el método de Lin et al. [163] quienes a parte de emplear el RAM 10 veces más concentrado que nosotros, incuban las placas media hora más que los demás investigadores y 1 hora más que nosotros. Naturalmente de este modo se pueden conseguir valores positivos muy elevados por uniones específicas y/o inespecíficas, pero también negativos muy elevados.

E.VII.e: Substrato:

Refiriéndonos al substrato, solamente Edwin et al. [83] emplea OPD como nosotros, diluyéndolo en tampón citrato pH 4'5, como realizamos nosotros, aunque en nuestro caso el OPD se encuentra a una concentración del 0'05%, mientras que estos autores lo emplean al 0'1%, con lo que existe una gran cantidad de substrato sobre el que la peroxidasa puede actuar, a través de su efecto sobre el peróxido de hidrógeno. Aunque no lo aclaran suficientemente, parece que añaden 40 μ l de peróxido de hidrógeno (al 30% p/v en origen) por cada 100 ml de tampón, por lo que está ligeramente más diluido que el empleado por nosotros (40 μ l en 80 ml de

tampón citrato). Por el contrario estos investigadores dejan reaccionar las placas durante media hora a 37°C, y detienen posteriormente la reacción, mientras que nosotros dejamos que se desarrolle a temperatura ambiente, no deteniéndola, realizando la lectura de forma inmediata a 450 nm, mientras que ellos la realizan a 405 nm.

Lapeyre et al. [156] y Lin et al. [183] emplean ABTS, realizando la lectura a 405 nm los primeros y a 410 y 490 nm los segundos. Edwin et al. [83] no indican el sustrato empleado.

Nosotros dejábamos que se desarrollara el color y una vez que considerábamos que la reacción estaba completa (tras 15-20 minutos) realizábamos la lectura a 450 nm como ya hemos indicado anteriormente. Una vez analizados los datos, prácticamente el 90% de los pocillos eran positivos bien de forma clara o débilmente. Elegíamos como positivos claros aquellos que tenían como mínimo una lectura cinco veces mayor a la media de los blancos. Estos blancos se realizaban de tres formas, en uno de ellos sustituíamos el sobrenadante del cultivo de híbridomas por medio de cultivo de células de mieloma, para así eliminar el posible efecto del medio. Otro blanco se realizaba sustituyendo el medio de cultivo por BSA al 3% y en el tercero la toxina de tapizado por BSA al 3% y el sobrenadante por cultivo de mieloma. Con estos dos últimos queríamos comprobar si el RAM se unía inespecíficamente al BSA, comprobando que esta unión no existía.

E.VII.f: Comentarios generales:

Como podemos comprobar existen muchas diferencias entre los diversos autores a la hora de analizar los cultivos de híbridomas. Sin embargo, estas diferencias parecen ser debidas más a una adaptación de la técnica a las condiciones del laboratorio que a causas más importantes, ya que se trata de diferencias en puntos no vitales. Tal vez Lapeyre et al. [156] realice el ELISA con diferencias más notables con respecto a los demás incluidos nosotros, factor que se repite en otros puntos de su técnica de producción de anti-

cuerpos monoclonales, como ya comprobamos en el apartado de inmunización, y como veremos en apartados siguientes.

Es conveniente destacar que casi todos los autores dejan de describir pasos de la técnica, bien por omitir composición de los tampones empleados o la concentración de los reactivos o los tiempos y temperaturas de incubación. Otro punto a resaltar es la coincidencia de todos los autores en aumentar bien concentraciones o tiempos de incubación en el apartado del conjugado, fomentando de esta forma las reacciones inespecíficas en el apartado más delicado (junto con el tapizado) de la técnica de detección. De esta forma aparentemente lo más importante es conseguir lecturas altas, sin importar los falsos positivos que pudieran aparecer de esta forma.

Nosotros, una vez que realizábamos este primer análisis de los cultivos, nos centrábamos en una serie de pocillos sobre los que trabajar. Tras 5-7 días, realizábamos una segunda prueba sobre los pocillos elegidos obteniendo una serie de valores (más bajos en general), decidiéndonos sobre aquellos hibridomas cuyo medio de cultivo diera una reacción más fuerte, los cuales procedíamos a clonar. Aquellos hibridomas desechados en esta segunda prueba, eran sometidos a una tercera, a fin de comprobar los resultados. En caso de que alguno fuera positivo, procedíamos a clonarlo.

E.VIII. CLONACION

Nosotros nos decidimos por la técnica de la dilución límite porque es muy sencilla, y además nos permite realizar el análisis de producción de anticuerpos de forma fácil y directamente del medio de cultivo, con el mismo sistema ELISA que hemos descrito anteriormente. Por el contrario, con técnicas de clonación en agarosa debemos pasar los hibridomas de la placa a medio de cultivo líquido, para luego poder analizarlos por la técnica ELISA, como necesitaron hacer Meyer *et al.* [83]. Esto puede paliarse empleando técnicas directas en el agar, con el problema que ya se necesita poner a punto una técnica de análisis más.

Los hibridomas productores de anticuerpos que reaccionaban con la enterotoxina homóloga eran clonados dos veces para asegurar la monoclonalidad y estabilidad de los mismos [269].

En esta fase de la producción de anticuerpos monoclonales tenemos pocos datos si nos referimos a los investigadores que los han producido frente a las enterotoxinas estafilocócicas. Todos los autores salvo Meyer et al. [173], realizan este proceso por la técnica de la dilución límite [83, 156, 163, 269]. Meyer et al. [173] realizan este proceso en medio semi-sólido, utilizando hepatocitos de rata como células cooperadoras.

Edwin et al. [83], Lin et al. [163] y Thompson et al. [269] realizan la clonación al menos dos veces. Lapeyre et al. [156] tan sólo citan que clonan repetidamente, sin especificar cuantas veces lo hacen.

Ningún autor describe detalladamente la técnica, tan sólo Meyer et al. [173] lo hace someramente y Lapeyre et al. [156] nos remiten a otros autores [202]. Los demás no comentan nada acerca del método empleado.

Edwin et al. [83] realizan un cultivo previo de las células de los pocillos originales de la fusión en microplaca durante 3 días para posteriormente realizar la clonación, paso que parece innecesario, y que no hace sino alargar el proceso de producción.

E.IX. EXPANSION Y CONSERVACION DE LOS CLONES

Una vez realizadas las pertinentes clonaciones, procedíamos a hacer crecer las células en volúmenes mayores de medio. Del pocillo seleccionado pasábamos todo su contenido unas veces, o la mitad otras (dependiendo de grado de crecimiento celular) a un pocillo de una placa de 24 pocillos que contenía 1 ml de medio de cultivo. Al día siguiente se añadía 1 ml más. Tras varios días (entre 3 y 5 dependiendo del número de células trasvasadas) el medio se mostraba amarillento, y al microscopio aparecía un tapiz de

celulas bastante denso. En ese momento realizabamos un pase a botella de 10 ml de medio, realizando varios subcultivos en estas condiciones hasta que las células mostraban haberse adaptado al cultivo en botella, esto es, mostraban en su totalidad un aspecto refringente y no se desprendian del plástico, asemejandose en definitiva al comportamiento de la linea de mieloma original.

Normalmente, tras 4 ó 5 subcultivos todas las líneas podian ser consideradas como estables, tras aparecer al ser observadas al microscopio como si fueran macroscopicamente células de mieloma. Sin embargo, algunas de ellas necesitaban la adición de más suero que las demás y ser subcultivadas entre 10-15 veces. No obstante, no perdimos ninguno de los clones que expandimos.

Con la adaptación en botellas de 10 ml de medio, pretendiamos poder obtener con pases a botellas de mayor tamaño y con mas medio (30 ml), un volumen elevado de células que nos permitiera congelarlas y también inocular los hibridomas en ratón para la producción de ascitis.

En cuanto era posible los clones eran congelados para tener una reserva de los mismos por si se produjeran contaminaciones o se perdiera viabilidad en alguno de ellos o cesara la producción de anticuerpos.

E.X. PRODUCCION DE ASCITIS

Los volúmenes de ascitis obtenidos por ratón fueron relativamente bajos (Tabla D.2), oscilando entre un máximo de 1'5 ml (B2) y un mínimo de 0'8 ml (B6 y A5). En el caso del anticuerpo monoclonal B6 este bajo volumen puede justificarse por la aparición en todos los ratones del lote (8) de grandes tumores solidos, con un bajísima presencia de líquido ascítico. Este hecho también se dió con los hibridomas productores de los anticuerpos B9, B13 y A2, aunque en menor medida que en el caso de B6. En el resto de los hibridomas los tumores estaban mejor distribuidos y eran de menor tamaño.

Si comparamos las cantidades obtenidas por nosotros, con las descritas por otros autores vemos que éstas son muy bajas, ya que se han llegado a describir máximos de 14'4 ml [110] y medias de 7-10 ml [42], aunque Mueller *et al.* [190] describen medias más bajas (5-7 ml/ratón). No obstante, nosotros hemos obtenido una producción puntual de 7 ml en una única extracción. En este caso, el ratón apareció muerto al día siguiente. Debemos destacar, que la media de obtención se ve muy disminuida en muchos lotes debido a que en muchos casos varios ratones morían durante la noche por lo que la ascitis no era recogida.

Por lo general la ascitis obtenida presentaba un tono amarillento, aunque en varias ocasiones ésta ofrecía un aspecto sanguinolento. Esto no dependía del proceso de inoculación de los hibridomas, ni del hibridoma inoculado, ni del sexo o edad de los animales, ya que esto se producía aleatoriamente en ciertos animales de un mismo lote, que por lo general eran de la misma edad y sexo, y, o bien eran de la misma camada, o procedían del mismo macho y dos madres de una misma camada.

Elegimos la producción de ascitis como medio de obtención de cantidades suficientes de anticuerpos monoclonales para nuestro estudio, debido a su mayor economía en comparación con el empleo de sobrenadante de cultivo de hibridomas, sobre todo por el elevado precio del FCS y del material empleado en el cultivo rutinario (botellas, pipetas, etc.), si se desean obtener cantidades similares a las obtenidas por medio de la inducción de ascitis en ratones histocompatibles. Esto se puede comprender debido a que la concentración obtenida en líquido ascítico es 1000 veces mayor (1-50 mg/ml) [102, 171, 202] que las obtenidas en medio de cultivo (1-20 µg/ml) [102, 171, 202].

Habitualmente la preparación de la cavidad peritoneal del ratón para la recepción del hibridoma inoculada suele realizarse con 0'5 ml de pristano [14, 41, 42, 216, 202, 276]. Posteriormente se descubrió la mayor utilidad del Adyuvante Incompleto de Freund (0'5 ml) [110, 190], por lo

que nos decidimos a utilizarlo en vez del clásico pristano. La búsqueda de soluciones alternativas al empleo de pristano fue debida al descubrimiento de que esta sustancia es carcinogénica, con lo que el empleo en terapia humana de anticuerpos monoclonales así obtenidos es desaconsejable por la posibilidad de la presencia de restos de la misma [110].

Aunque la mayoría de los autores realizan una sola inoculación de la sustancia preparadora, número considerado como suficiente [122], otros realizan este proceso 2 ó 3 veces, con intervalos semanales [173].

La preparación de la cavidad peritoneal se realizaba habitualmente 7 a 20 días antes de la inoculación de los híbridos [14, 41, 42, 163, 216], considerándose como óptimo un distanciamiento de la inoculación celular de 14 días [43]. No obstante, con la utilización del FIA este intervalo pueda reducirse a 1 día [190], aunque Gillette [110] amplía este periodo a 7 días. Nosotros reducíamos este intervalo a 1-3 días (dependiendo del momento en que las células estuvieran disponibles) procediéndose a la primera extracción tras 7-10 días independientemente del plazo de separación entre la inoculación intraperitoneal del FIA y la del híbrido.

Nosotros inculcábamos $1-3 \times 10^6$ híbridomas por ratón resuspendidos en 0.5 ml de DMEM-HT, cantidad similar a la máxima aconsejada por Brodeur *et al.* [42] (3.2×10^6 células/ratón) y parecida también a la utilizada por Gillette [110] y Lin *et al.* [163] (2×10^6 células) y Brodeur y Tsang [41] (3.2×10^6 células), aunque otros autores emplean aproximadamente una cantidad 10 veces menor [190].

Para la obtención del líquido ascítico seguimos dos pautas:

- * extracción diaria de la ascitis sin sacrificio del animal
- * sacrificio del animal y posterior recolección de la ascitis

La cantidad de ascitis obtenida siguiendo la primera

pauta es teóricamente mucho mayor [76], como pudimos confirmar, ya que aproximadamente se obtiene el doble de líquido ascítico por ratón que con el otro sistema empleado por otros autores [190, 216]. Este último método se empleó en todos los ratones inoculados con los hibridomas productores de anticuerpos frente a EEA, los volúmenes nunca llegaron a los obtenidos con los hibridomas producidos frente a EEB (Tabla D.2).

E.XI. PURIFICACION

Los volúmenes de líquido ascítico utilizados en la purificación fueron bastante bajos (Tabla D.2), oscilando entre un máximo de 26 ml (B2) y un mínimo de 7 ml (B6 y A5). Normalmente se resuspendió el sedimento en PBS, de tal manera que el volumen final fuera aproximadamente la mitad del volumen de partida. No obstante, ello no se realizó en todos los casos, en particular en aquellas ascitis cuyo volumen precipitado era escaso (destacando B6 y A1), que fueron resuspendidos en más volumen de PBS, ya que preferimos tener una cantidad que nos permitiera hacer un mayor número de alícuotas con volúmenes significativos. En estos casos, los títulos entraron dentro de lo normal en este estudio; siendo destacable que el que poseía el título más bajo (B12) no sufrió una resuspensión en un volumen de PBS mucho mayor al preestablecido por nosotros. Aunque en los casos en que la resuspensión se realizó en un volumen mayor al habitual, el título habría sido mayor de haber añadido el volumen adecuado de PBS, no parece que ello influya en gran manera en los títulos obtenidos dentro de los márgenes en que realizamos la resuspensión.

En este estudio probamos dos tipos de purificación de líquido ascítico. Dos de los anticuerpos monoclonales producidos por nosotros (B1 y B3), así como la ascitis obtenida como blanco (por inoculación de células de mieloma en vez de hibridomas), fueron purificados por un tratamiento doble, que incluía una precipitación salina con sulfato amónico, y una posterior cromatografía de exclusión

molecular. El resto de los monoclonales empleados en este trabajo sufrieron una purificación menor, restringiéndose ésta a una mera precipitación con sulfato amónico, seguida como se hizo también en el caso anterior de diálisis. Aunque en el caso de los anticuerpos que sufrieron exclusivamente precipitación salina como es lógico, la presencia de proteínas extrañas será mayor, estas no influyeron a la hora de realizar los ELISAs, ya que las lecturas de "fondo" o lecturas base inespecíficas fueron similares en todos los casos (entre 0'02 y 0'04 a 450 nm).

Se han descrito muchos métodos para la purificación de anticuerpos monoclonales en ascitis o en medio de cultivo. Manil *et al.* [168] realizan una evaluación de varios de los métodos empleados de forma habitual por los laboratorios que necesitan realizar esta tarea (precipitación con sulfato amónico y/o gel filtración, intercambio aniónico, hidroxilapatita, cromatografía de afinidad con proteína A estafilocócica, o combinaciones de estos métodos). Para ellos, los mejores resultados en lo referente a recuperación y pureza fue siempre obtenida con la proteína A, fuera cual fuera la subclase de IgG. Este punto contrasta con lo descrito por varios autores respecto a que la IgG de ratón presentan uniones pobres y variables con la proteína A [86, 111]. Sin embargo, Thompson *et al.* [269] utilizan un sistema de detección de hibridomas productores de anticuerpos específicos frente a enterotoxinas estafilocócicas que incluye el empleo de proteína A. Con dicho sistema la mayoría de e los hibridomas detectados son productores de esta subclase de IgG. En cualquier caso la proteína A no se une exclusivamente con las IgGs de interés, sino también con las contaminantes [7]. Este caso es extremo en la purificación de ascitis donde las proteínas contaminantes son mayoría [7, 49, 194, 279], con lo que sería necesario un paso más de purificación. Adicionalmente, por lo general se necesita un pH bajo para eluir el anticuerpo de la proteína A, que puede alterar potencialmente la actividad del anticuerpo [254], aunque muchas veces más que una pérdida de actividad, lo que se produce es una pérdida de IgGs [211]. Por lo tanto este

sistema no parece ser el ideal como paso único, de lo cual podemos llegar a la conclusión de que se necesitan combinaciones de varias técnicas para obtener un pureza aceptable.

Nosotros decidimos aplicar métodos no-cromatográficos a la mayoría de los monoclonales estudiados. Esto es debido a que la precipitación salina es un método rápido [194, 211, 229], sobre todo si se compara con los métodos cromatográficos tradicionales, los cuales requieren un elevado gasto de tiempo [46, 194]. Aunque con la precipitación salina se puede recuperar más del 90% de la inmunoreactividad [168], por lo general la precipitación con sulfato amónico proporciona un rendimiento bajo [7, 194] y existe contaminación con otras proteínas [7].

Una pureza elevada del anticuerpo monoclonal sólo es necesaria para casos especiales [46], como sería su aplicación "in vivo" [168]. En nuestro caso esta necesidad no es muy grande, ya que tan sólo nos proponíamos eliminar una parte de las sustancias presentes en la ascitis que tal vez podrían interferir en los inmunoensayos, ya que con este sistema parecen eliminarse preferencialmente las proteínas ácidas y las de elevado peso molecular [168]. Por lo tanto nuestro sistema parece ser suficiente para los propósitos de este trabajo.

La precipitación con sulfato amónico, que normalmente entra a formar parte de sistemas de purificación como paso previo [7], puede alterar algunos anticuerpos monoclonales, por lo que para Burchiel [45] debería ser omitido o usado con precaución. Nuestra única medida para evitar este posible problema era el realizar tan sólo una precipitación con sulfato amónico, y no dos como realizan otros autores [83, 173]. Sólo el anticuerpo B10 debió ser precipitado dos veces ya que tras añadir sulfato amónico la primera vez, no apareció precipitado alguno, hecho curioso ya que sí apareció en el resto de los tubos con ascitis de otros hibridomas, y que fueron precipitados el mismo día y con el mismo lote de sulfato amónico.

Aunque este es el método no-cromatográfico tradicional,

se han descrito otros tipos de precipitación, bien simples con ácido caprílico [229] o con PEG [194] (aunque este precedido de un proceso de delipidación), o bien dobles como es precipitar las proteínas no-globulinicas con ácido caprílico y luego realizar una precipitación con sulfato amónico [140]. El ácido caprílico precipita la albumina y otras proteínas no-IgG. Esta precipitación está influenciada por la presencia de lípidos, ya que interfieren la sedimentación de las proteínas precipitadas por este método [140], problema que no presenta la precipitación con sulfato amónico. Por lo tanto, el empleo del ácido caprílico, bien solo o en combinación con sulfato amónico necesitaría una delipidación previa, por lo que el proceso de purificación se vería aumentado en un paso más. Franek [96] describe un tipo de precipitación que emplea 2-etoxi-6,9-diaminoacridina lactato (RivanolTM). aunque esta precipitación se ve seguida en algunos casos de cromatografía de exclusión molecular, aunque puede realizarse como paso único. El Rivanol no precipita las IgG sino otras proteínas contaminantes.

En lo que respecta al empleo conjunto de precipitación con sulfato amónico seguida de gel filtración, parece que esta última empleada de forma aislada es un método idóneo, situándose en un punto intermedio entre un rendimiento óptimo y una inactivación aceptable, por lo menos en lo que a purificación de suero se refiere [211]. La combinación de ambos métodos no parece ser aceptable para Phillips *et al.* [211], aunque ambos sistemas por separado, junto con la precipitación con PEG dan como resultado una recuperación y una pureza moderadas, pero con una inactivación de IgGs mínima [211], factor importante, ya que la gran mayoría de las IgGs recogidas se encuentran en estado activo.

E.III. TITULO Y CURVAS DE DILUCION

E.III.a: Titulo:

El titulo relativo de cada anticuerpo monoclonal fue determinado por ELISA indirecto, tapizando las placas con

0'1 μg /pocillo de EE homóloga. Se analizaron diluciones dobles a partir de una decimal previa. Este título fue arbitrariamente establecido como el recíproco de la dilución más alta que diera una absorbancia $\geq 0'1$ a 450 nm. Los títulos oscilaron entre un mínimo de 1:40 para el anticuerpo monoclonal B12 y un máximo de 1:1.280 para los anticuerpos B8, A6 y A8 (Tabla D.1).

El valor del título es útil al decirnos cuanto material tenemos disponible, no indicando nada en cuanto a la actividad específica del anticuerpo monoclonal, la cual debe ser expresada en unidades de actividad por mg de anticuerpo [296].

Al ser un dato arbitrario, y que además depende de la técnica empleada, es muy difícil realizar una comparación con otros autores. Así, Bonventre et al. [36], para la TSST-1 establecen el título en aquella dilución con la que se obtiene el 50% del color máximo, mientras que Bohach et al. [35] usan para anticuerpos frente a la TSST-1 un parámetro idéntico al nuestro, pero realizando la lectura a 490 nm. No obstante lo más habitual es no indicar el criterio empleado para establecer este dato o hacerlo de manera muy somera como indicar que es la máxima dilución a la que se obtiene un resultado positivo [296], sin describir cómo diferencian un resultado positivo de uno negativo.

Si comparamos nuestros títulos con los de otros autores, los nuestros son extremadamente bajos, ya que los mínimos y máximos de otros autores oscilan entre 2.000-1.024.000 [35], 1.000-2.500.000 [36], 3.200- >819.200 [163], 10^5 - 10^8 [83], por citar a algunos que especifican este dato y que emplean el sistema ELISA para su determinación. En el caso de Bohach et al. [35], el control (ascitis inespecífica) dió un título de 500, mientras que en nuestro control fue 0, con lo que comprendemos la necesidad de conocer todos los factores que concurren en el análisis para poder realizar una comparación fiable.

Debido a que Edwin et al. [81] obtienen los títulos más elevados y a que emplean un tapizado con 10 veces más toxina

por pocillo, probamos a realizar la titulación empleando esta concentración de toxina. Como es lógico los títulos aumentaron considerablemente, aunque no tanto como para poder comparar nuestros resultados con los autores anteriormente citados, ya que los mínimos y los máximos obtenidos por nosotros oscilaron entre 1:640 (anticuerpos B7 y B12) y 1:40.960 (B1, B3, B11 y A5) (Tabla D.1). En todos los casos se observó un lógico aumento del título con respecto al obtenido tapizando con 0'1 $\mu\text{g/pocillo}$, aunque este aumento no fue proporcional observándose un comportamiento diferente de cada anticuerpo en un sistema u otro. Así, los que presentaban un título elevado en el primer sistema (1:1280) en ninguno de los casos dieron el título máximo en el segundo análisis con más toxina de tapizado.

Esta relativa poca disponibilidad de material, nos hizo pensar en que nuestro sistema de purificación era inadecuado. Por lo tanto realizamos la titulación de la ascitis original centrifugada de siete de los anticuerpos frente a EEB (B2, B4, B5, B7, B8, B11 y B14), ya que del resto de los anticuerpos toda la ascitis había sido empleada en la purificación. Este análisis se realizó con placas tapizadas con 0'1 $\mu\text{g/pocillo}$. Manteniendo el mismo criterio arbitrario que para los títulos descritos para los otros casos, los títulos fueron muchísimo más elevados, lo que nos obligó a realizar diluciones decimales en vez de dobles. Estos valores oscilaron entre 1: $>10^3$ (B8) y 1: 10^7 (B4 y B7) (Tabla D.1). De nuevo se observó un comportamiento diferente de cada anticuerpo, si se compara con los resultados obtenidos con el anticuerpo parcialmente purificado. Así, el anticuerpo B8 purificado de ser uno de los de mayor título, pasa a ser el que menos título presenta en el análisis de ascitis. Por lo tanto, volvemos a recalcar el comportamiento diferente de cada anticuerpo dependiendo del sistema empleado y de si ha sufrido un proceso de purificación o no.

Todos estos resultados nos obligan a pensar en una deficiente precipitación con sulfato amónico. Aunque se ha descrito que muchos anticuerpos monoclonales no precipitan bien con sulfato amónico [268], creemos que sería muy

extraño que todos los nuestros pertenecieran a este tipo, por lo que pensamos que el defecto se encuentra en el sistema de purificación empleado, bien por la técnica en sí, o por que nuestro sulfato amónico no estuviera en óptimas condiciones. Dado que la técnica empleada es idéntica en su protocolo a la utilizada por nosotros para la purificación de anticuerpos policlonales, técnica con la que conseguimos buenos títulos, creemos que el protocolo no debe ser adecuado para la purificación de un material en el que la porción específica es más homogénea que en suero tradicional.

E.XII.b: Curvas de dilución:

La determinación de las curvas de dilución fue otro de los parámetros estudiados para definir el comportamiento de los anticuerpos monoclonales. Para ello se analizaron por medio del sistema ELISA indirecto diluciones dobles de cada anticuerpo monoclonal a partir de una inicial 1:10. Esto fue realizado con dos diferentes concentraciones de EE (0'1 µg/pocillo y 1µg/pocillo), así como diluciones decimales de ascitis en placas tapizadas con 0'1 µg/pocillo.

El comportamiento de los anticuerpos con cada una de las dos concentraciones es bastante diferente. Al contrario de lo que cabía esperar, las lecturas máximas en ambos sistemas fueron bastante similares (dilución 1:10), aunque posteriormente se observa un efecto dilución más suave cuando se tapiza con 1 µg/pocillo, apareciendo una conservación en los valores de las lecturas a 450 nm más prolongada (Figuras D.3 a D.15). Estas apreciaciones son más claras en el caso de los anticuerpos monoclonales frente a EEA (Figuras D.7-D.8 y D.13-D.14).

Las curvas de dilución obtenidas al representar en una gráfica las lecturas a 450 nm de diluciones decimales de la ascitis centrifugada de varios hibridomas (Figuras D.27 y D.28), nos muestran que el comportamiento ante las sucesivas diluciones fue similar a los obtenidos mediante diluciones dobles en los anticuerpos parcialmente purificados por precipitación con sulfato amónico. De nuevo los valores obteni-

dos en la primera dilución (1:10) fueron similares con ascitis o con el anticuerpo precipitado, si bien en algunos casos fueron menores (B2, B4, B5, B8 y B14), aunque luego mantuvieron valores de lectura similares pese a sufrir diluciones muy fuertes. Todo ello parece indicarnos una fácil saturación del sistema (con pronto agotamiento de los epitopos de la toxina unida al plástico) al haber un exceso de anticuerpos, fenómeno que recordaría un poco al efecto "pro-zona" que se produce en otros sistemas inmunológicos, pero que no debería producirse en el ELISA [296]. Luego los valores van disminuyendo de manera muy suave a medida que realizamos diluciones.

Todas estas curvas de dilución no muestran un patrón como el considerado típico de anticuerpos de elevada afinidad, esto es, una meseta de absorbancia máxima en una serie de diluciones del anticuerpo monoclonal, seguida de una fuerte disminución a diluciones más altas [120, 210]. No obstante si establecemos un máximo de lectura tal y como realizan Edwin *et al.* [81] las curvas se asemejan más a lo anteriormente descrito (Figuras D.15 a D.26 y D.29-D.30). Este aspecto es especialmente destacable en los monoclonales B1 y B6 cuando se tapiza con 1 µg/pocillo de EEB. No obstante el número de diluciones con una absorbancia máxima en el caso del anticuerpo B6 es muy bajo.

E.XIII. DETERMINACION DE LA SUBCLASE DE IgG

La subclase de IgG fue determinada por medio de un sistema ELISA indirecto que incluía la utilización de 0'1 µg de EE/pocillo y RAM específico para cada subclase de IgG marcado con peroxidasa. El 63'6% de los anticuerpos analizados por este sistema pertenecieron a la subclase IgG₁, mientras que el resto (36'4%) pertenecieron a la subclase IgG_{2b} (Figura D.2). Este tanto por ciento se ve aumentado si solo analizamos los anticuerpos monoclonales frente a la enterotoxina B (42'9%).

Aunque estos resultados concuerdan con los de otros autores, los cuales describen anticuerpos monoclonales pre-

dominantemente de subclase 1 [81, 156, 163, 173, 268, 269], el número de anticuerpos perteneciente a la subclase 2b es muy elevado en nuestro caso. Esto podría ser debido a deficiencias de los sueros comerciales, ya que para algunos autores estos sueros anti-subclase dejan mucho que desear en cuanto a su especificidad [296]. No obstante, nuestros resultados se repitieron constantemente al emplear los reactivos de la casa Serotec, obteniéndose valores con diferencias claras entre los positivos y los negativos de cada subclase. Si nos referimos a Thompson et al. [268], el número de anticuerpos de la subclase 2b podría verse aumentado, ya que 12 de los 37 anticuerpos no fueron analizados a este respecto, en cualquier caso sólo el 8% de sus anticuerpos perteneció a esta subclase.

Si bien es normal que la mayoría de los autores, incluidos nosotros, describan una predominancia de la subclase 1, este hecho es muy extraño en el caso de Thompson et al. [268, 269] ya que estos autores realizan una detección de híbrdomas productores de anticuerpos frente a EEs que incluye la utilización de proteína A estafilocócica. Dicha subclase se une muy pobremente a dicha proteína A [86, 111], con lo que los resultados son cuando menos sorprendentes, y tal vez nos indican que los sistemas de determinación de subclases de inmunoglobulinas no son muy fiables.

E.XIV. CAPACIDAD DE DETECCION DE EE HOMOLOGA POR ELISA INDIRECTO

En esta prueba se enfrentó una cantidad constante de cada anticuerpo monoclonal con varias concentraciones de EEs empleadas para tapizar los pocillos de microtitulación (100 μ l de soluciones que oscilaban entre 0 y 1000 ng/ml). Por lo tanto las concentraciones de EE por pocillo serían 0, 0'1, 0'5, 1, 5, 10, 50 y 100 ng. Un grado de sensibilidad \leq 1 ng se asocia generalmente a anticuerpos monoclonales de elevada afinidad [258]. En la mayoría de los anticuerpos monoclonales analizados existe una diferencia de lectura relativa-

mente amplia entre 0 y la solución de 1 ng/ml (Figuras D.31 a D.36).

Por lo tanto y si nos referimos a lo descrito por Steward y Lew [258], todos nuestros anticuerpos monoclonales presentan una elevada afinidad por el antígeno homólogo. El peor caso (A1) detecta 1 ng de EEA, detectando la mayoría de los anticuerpos 0.1 ng (Tabla D.1).

Estos datos nos hacen suponer que cualquiera de estos anticuerpos podrían ser utilizados en sistemas de detección de EEs, siendo capaces de discernir bajas cantidades de EE. No obstante para su utilización en un sistema ELISA, por ejemplo, se deben considerar otros factores que pueden limitar la utilidad de un determinado anticuerpo o incluso incapacitarlo para ser empleado, pese a presentar unas premisas favorables.

También debemos tener en cuenta que estos resultados nos adelantan que ya que nuestros anticuerpos pueden diferenciar muy bajas concentraciones de EE entre muchas proteínas extrañas, como las que están presentes en las toxinas crudas, estos teóricamente podrán diferenciar estas toxinas entre todas las proteínas extrañas presentes en los alimentos [81].

E.IV. ESTUDIOS DE INHIBICION

E.IV.a: Análisis de inhibición de unión a EE homóloga:

Como era de esperar por los datos anteriormente analizados, se necesitaron cantidades extramadamente bajas de EE homóloga para obtener una inhibición en la unión de cada anticuerpo monoclonal con la EE empleada para tapizar los pocillos de microtitulación (100 μ l de una solución de 1 ng de EE por ml) (Tabla D.1 y Figuras D.37 a D.42)).

Debido a que, añadimos el doble de cantidad de anticuerpo de lo habitual para que al mezclarlo con la enterotoxina (1:1) esta quedara en el rango de rutina, la concentración final de EE resultaba ser la mitad de los

valores descritos en material y métodos. Así de 1, 10, 100 y 1000 ng/ml pasaron a ser en la solución final de 0'5, 5, 50 y 500 ng/ml.

Varios anticuerpos fueron inhibidos con 0'5 ng/ml (B5, B13, B14, y A2), si bien para un número elevado de anticuerpos se necesitó unas cantidades más elevadas (> 500 ng/ml) (B12, A3, A4 y A7). Debemos destacar que para determinar el nivel de inhibición establecimos un parámetro arbitrario bastante exigente. Este parámetro consistía en considerar la unión inhibida tan sólo cuando la lectura era aproximadamente la mitad de la referencia (anticuerpo monoclonal+PBS). Todos los anticuerpos ven inhibida en parte su unión con el antígeno con 0'5 ng de EE/ml. Como indican Lapeyre et al. [156], debido a la gran afinidad de los anticuerpos monoclonales, se necesitan emplear concentraciones muy bajas de toxina para observar competición, que en su caso son concentraciones que rondan 1 a 5 ng/ml. No obstante, estos autores emplean el anticuerpo monoclonal a la mitad de la concentración habitual, con lo cual es más fácil realizar una inhibición de la unión al estar presente una menor cantidad de anticuerpos. Nuestro sistema parece ser más real que el de estos autores al emplear el anticuerpo en las condiciones habituales de trabajo.

Los anticuerpos monoclonales anti-EEA mostraron un peor comportamiento en esta prueba, necesitando constantemente más cantidad de EE para mostrar el grado de inhibición establecido por nosotros, salvo en el caso del anticuerpo A2 (0'5 ng de EEA por ml).

E.XV.b: Constante de disociación:

Aunque un sistema que emplee anticuerpos monoclonales puede funcionar muy bien sin saber nada sobre su afinidad [296] puede darnos una idea del tipo de anticuerpo que manejamos, junto con su comportamiento frente al antígeno.

Las constantes de nuestros anticuerpos monoclonales son relativamente bajas (Tabla D.4), sobre todo en el caso del

monoclonal B12 (0.12×10^{-6} M), constantes que contrastan con el comportamiento obtenido en las pruebas descritas hasta ahora.

Si bien la fórmula empleada para este cálculo está diseñada para su empleo con anticuerpos monoclonales parcialmente purificados por precipitación con sulfato amónico [93], debe conocerse la concentración real del anticuerpo monoclonal, dato del que carecíamos. Nosotros empleamos la concentración total de proteína, estimada por el método que describimos en el apartado C.II.o. Por lo tanto, la concentración del anticuerpo monoclonal utilizada en el sistema debe ser mucho menor que la empleada para el cálculo de las constantes de disociación, y por lo tanto, esas constantes se verían aumentadas. Aun así estas no son excesivamente bajas para su utilización en ELISA, y además, como ya hemos indicado anteriormente, el comportamiento de nuestros anticuerpos cumple con muchos de los requisitos teóricos de anticuerpos de elevada afinidad.

B.IVI. REACCIONES CON OTRAS ENTEROTOXINAS

Para comprobar las posibles reacciones con otros serotipos de enterotoxinas empleamos dos metodologías: ELISA e inmunotransferencia (Tabla D.1).

En ambos sistemas analizamos la reacción con la enterotoxina homóloga, sirviéndonos en el caso de la inmunotransferencia como base para determinar una reacción como positiva. Así, para poner a punto la última técnica empleamos los anticuerpos monoclonales frente a EEB. Tras determinar que los parámetros más adecuados eran los expuestos en el apartado C.II.m.2 encontramos resultados sorprendentes en cuanto a la reacción con la enterotoxina homóloga, en este caso la B.

Absolutamente todos los anticuerpos monoclonales que se unían a la EEB reaccionaban con dos bandas relativamente cercanas (Figura D.41), una situada en el lugar correspondiente a la EEB (aproximadamente 28.000 daltons) y

otra de peso molecular superior (Figura D.44), con la que la reacción era ligeramente menor. Decidimos probar con otro lote de EEB que no fuera cruda, recurriendo a la EEB comercial (Sigma), repitiéndose en todos los casos los mismos resultados. Nosotros creemos que esta banda de peso molecular superior debe corresponder al precursor de EEB descrito por Tweten e Iandolo [273, 274], que posee una movilidad electroforética inferior a la EEB extracelular. Este precursor es 3.500 daltons mayor que la EEB [273]. El problema radica en que se trata de un componente de la membrana celular, que por lo tanto no debería estar presente en la enterotoxina cruda. No obstante, y debido a que para producir toxina cruda, el medio de cultivo no sufre más que una simple centrifugación y el sobrenadante una posterior liofilización, las membranas rotas no son eliminadas de dicho sobrenadante, con lo cual éstas podrían estar en la cantidad suficiente para que nuestros monoclonales lo detecten. Este hecho puede verse aumentado si el medio de cultivo ha sido incubado en exceso, con lo cual las bacterias comenzarían a morir aumentando de esta forma la cantidad de restos celulares en el medio, y entre ellos de membranas, portando el precursor.

Este hecho se va confirmado ya que aquellos anticuerpos monoclonales obtenidos frente a EEB que presentaban alguna reacción cruzada con otras enterotoxinas, reaccionaban con una sólo banda. Nuestro sistema presenta una sensibilidad igual a la de Tweten e Iandolo [1981] (5 ng por banda, ya que nosotros corremos 1 μ l de una solución de 5 μ g/ml), aunque es de suponer que la nuestra sea más sensible ya que consideramos que en la titulación de EEB, interferirá su precursor con lo que la concentración real de toxina será menor. Además al poder detectar el precursor, cuya concentración debe ser mucho menor que los 5 μ g/ml de EEB de partida, podemos asegurar que la sensibilidad de la técnica es mucho mayor. Un hecho parecido ocurre en un estudio de Edwin et al. [82]. En dicho estudio analizan un anticuerpo monoclonal obtenido frente a EEA y que reacciona con el resto de las enterotoxinas. En el análisis de la reacción

frente a EEB también aparece una reacción con otra banda de peso molecular superior cuando se emplea EEB cruda, que también suponen pueda ser el precursor de la EEB.

Lo que sí que parece mucho más extraño es la reacción con esta segunda banda en el caso de la EEB comercial, ya que ésta debería haber sufrido un proceso de purificación más intenso. De hecho en la electroforesis realizada para comprobar el estado de pureza de esta toxina, no aparece más que una banda situada en el teórico lugar de la EEB. Tal vez la elevada sensibilidad de la técnica nos permita detectar restos de membranas extremadamente fraccionados que se hayan "escapado" a una purificación intensa.

En ningún otro de los trabajos de los diversos autores se describe un hecho parecido, si bien las bandas de reacción son extremadamente amplias, lo que puede hacer que la reacción frente a la EEB tape la cercana con el precursor. No obstante todo depende del estado de purificación de la toxina empleada, aunque Lin et al. [163] emplean la EEB de Sigma que empleamos nosotros, pero seguramente de otro lote.

Analizando las reacciones obtenidas en ELISA e inmunotransferencia, podemos destacar el que encontramos dos anticuerpos monoclonales obtenidos frente a EEA que reaccionan frente a todas las enterotoxinas (Tabla D.1), hecho ya descrito por Edwin et al. [82]. Otros autores han descrito un factor semejante [173] pero realizando un doble inmunización con EEA y EED. No obstante, en este último caso se descubrió que este anticuerpo reaccionaba con proteínas extrañas [24], factor que no se pudo descubrir en el trabajo original al no emplear técnicas de inmunotransferencia, para así demostrar la especificidad de las reacciones.

Analizando otro tipo de reacciones, y siguiendo con los anticuerpos monoclonales anti-EEA, observamos que tan sólo uno de ellos reacciona exclusivamente frente a la enterotoxina homóloga (EEA), se trata del anticuerpo A1 (Tabla D.1). Otros cuatro anticuerpos reaccionan frente a EEA y EEE (Tabla D.1), reacciones no sorprendentes dada la similitud

antigénica entre ambas toxinas y que ya ha sido descrita por otros autores [83, 268]. Por último el anticuerpo A4 no reacciona con EEB ni en ELISA ni en inmunotransferencia, pero si con EEA, EEC₁, EED y EEE. Este es el único monoclonal que no reacciona¹ en inmunotransferencia con la toxina homóloga, sin duda por haberse destruido su epitopo de acción con el tratamiento con SDS-Mercaptoetanol.

Refiriéndonos a los anticuerpos monoclonales frente a EEB, las reacciones son más restringidas ya que sólo encontramos reacciones con la enterotoxina homóloga y con EEC₁ (Tabla D.1), que fue la única subclase de EEC probada en este estudio.

Encontramos que tan sólo tres anticuerpos monoclonales resultaron ser específicos para la EEB por ambos sistemas (B5, B12 y B14), mientras que otros cuatro reaccionaron con EEB y EEC₁ por el sistema ELISA indirecto, mientras que en inmunotransferencia reaccionaron exclusivamente frente a EEB (B6, B8, B10 y B11). El resto de los anticuerpos reaccionaron en ambos sistemas con EEB y EEC₁. Este tipo de reacciones ya han sido descritas con anterioridad, tanto las exclusivas con EEB [77, 139, 156, 163, 218, 269], como las que incluyen EEB y EEC₁ [156, 269].

Podemos comprobar que existe una gran coincidencia entre los resultados obtenidos por un sistema y otro, no obstante, y dado que las reacciones en ELISA no pueden considerarse como específicas [82], debemos tener más en cuenta las reacciones obtenidas en la inmunotransferencia, tomando como ideales aquellos monoclonales de los que obtenemos reacciones idénticas en ambos sistemas.

El que en nuestro laboratorio, y con nuestras condiciones de trabajo un determinado anticuerpo monoclonal presente una reacción determinada, no quiere decir que en otras condiciones y con otros sistemas no vaya a presentar otra u otras muy diferentes. El caso es claro si nos fijamos en el trabajo publicado conjuntamente por los grupos del FRI ("Food Research Institute") y FDA ("Food and Drug Administration"), en el que un anticuerpo que por el sistema

del FRI era específico de EEB [269], presentaba una fuerte reacción con EEC₁ por el sistema del FDA [268]. Por contra y como ya hemos citado anteriormente se descubrió en el FRI que el anticuerpo monoclonal descrito por Meyer et al. [173] reaccionaba con otras proteínas extrañas [24].

E.XVII. ELECCION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA TAPIZADO Y/O CONJUGADO

La primera limitación para adaptar anticuerpos monoclonales a un sistema ELISA "sandwich" es que se necesitan dos diferentes para que el sistema funcione [270]. Por lo tanto, uno de ellos se utiliza para tapizar la placa y así separar la enterotoxina de la solución que va a ser analizada. El otro anticuerpo se conjuga con la enzima peroxidasa, empleándose para detectar la toxina capturada por el anticuerpo monoclonal usado en el tapizado. Así, es totalmente necesario identificar una(s) pareja(s) de anticuerpos efectiva(s).

E.XVII.a: Determinación de anticuerpos válidos para tapizado:

No todos los anticuerpos monoclonales de este estudio funcionan bien en la labor de anticuerpo de captura (Tabla D.1). Más bien ocurre todo lo contrario, ya que tan sólo tres producidos frente a EEB (B4, B7 y B14) y otros tres frente a EEA (A5, A7 y A8) se comportaron adecuadamente.

Las pendientes obtenidas no son excesivamente grandes, pero los puntos están muy cercanos a la recta ideal, cuando no forman parte de ella (Figuras D.45 a D.50). En cualquier caso, los resultados obtenidos en los anticuerpos considerados como válidos parecen ser mejores que con anticuerpos policlonales, destacando que incluso muchos de los rechazados parecen resultar mejores que el empleo exclusivo de anticuerpos policlonales.

Nosotros realizamos el tapizado añadiendo 100 μ l de una solución de 10 μ g/ml del anticuerpo, tal y como describen

Dupont et al. [77]. Otros autores emplean otras concentraciones de anticuerpo: 1 $\mu\text{g/ml}$ (50 μl) [155, 156] y 5 $\mu\text{g/ml}$ (50 μl) [270]. Edwin [80] realiza el tapizado con una dilución 1:50 del anticuerpo monoclonal, con lo que es imposible saber la concentración proteica, ya que dicho autor no aporta más datos. Schönwälder et al. [236] no mencionan este dato.

Aunque como es de suponer que han hecho otros autores, y tal y como mencionan Thompson et al. [270], tan sólo se han probado las condiciones de tapizado descritas, el tapizado empleado por nosotros y Dupont et al. [77] parece el más real de todos los descritos anteriormente. Si tenemos en cuenta que el tapizado que se realiza usualmente con anticuerpos policlonales se lleva a cabo con concentraciones que oscilan entre los 7'5 y los 8 $\mu\text{g/ml}$, es lógico pensar que un anticuerpo monoclonal, que posee la desventaja de dirigirse a un único epitopo, necesitará una mayor concentración para desempeñar adecuadamente la labor de captura. No obstante, debemos destacar que en el caso de los trabajos de Lapeyre et al. [155, 156] y Thompson et al. [270], los anticuerpos monoclonales se encuentran más purificados que los nuestros, por lo que la proporción del anticuerpo monoclonal será más elevada, con lo cual se puede disminuir la concentración. Sin embargo la concentración empleada por Lapeyre et al. [155, 156] parece poco probable que funcione adecuadamente, si bien como ya hemos mencionado en apartados anteriores, estos autores se caracterizan por emplear concentraciones mínimas en todos los procesos de producción y utilización de sus anticuerpos monoclonales.

E.XVII.b: Determinación de parejas efectivas:

Una vez elegidos aquellos anticuerpos monoclonales que servían como anticuerpo de captura, procedimos a la determinación de cuáles de los conjugados funcionaban bien con los anticuerpos monoclonales elegidos para tapizar.

Como ya indicamos anteriormente, para referirnos a los monoclonales conjugados con la enzima peroxidasa, el nombre

del anticuerpo irá seguido del símbolo *.

Una vez más, sólo funcionaron la minoría de los anticuerpos probados: B2*, B8*, B9*, B10*, B12*, A2*, A3*, A7* y A8* (Tabla D.1 y Figuras D.51 a D.61). Dos de ellos formaron una pareja adecuada con dos anticuerpos de tapizado: B10* con B4 y B14 y A8* con A5 y A7. Esta prueba se realizó con la toxina homóloga, por lo que se debió comprobar el comportamiento con las demás toxinas.

Ninguno de los anticuerpos monoclonales de este estudio fue inactivado en cuanto a su capacidad de unión a la EE homóloga tras ser conjugado, hecho que puede producirse tras la conjugación [47].

Como ya se describió en el apartado correspondiente de Material y Métodos, los conjugados fueron utilizados a una dilución del 1:1.000, tal y como describen Dupont et al. [77], pero añadiendo tan sólo 50 µl de dicho conjugado en vez de 100 µl como señalan estos autores e incubando 30 minutos en vez de 1 hora. Thompson et al. [270] y Schonwalder et al. [236] no señalan la concentración del anticuerpo conjugado.

En cualquier caso el emplear todos los conjugados al 1:1.000 puede hacer que se nos escape alguno efectivo, ya que puede que necesitara una concentración mayor o menor para funcionar adecuadamente; no obstante dado el número de combinaciones posibles, sería extremadamente largo el realizar una titulación de todos los conjugados por lo que optamos por el sistema utilizado por nosotros.

E.IVII.c: Otras consideraciones:

Es de destacar que empleando el anticuerpo A8 para tapizar, fue imposible encontrar una pareja que funcionara correctamente en ELISA doble-"sandwich", por lo menos en las condiciones empleadas por nosotros.

Como se puede observar, no se han producido combinaciones recíprocas, es decir no se puede invertir la pareja,

esto es el que funciona bien como conjugado, no funciona bien para tapizar y viceversa, tal y como ocurre en el sistema diseñado por Thompson et al. [270]. Esto parece indicar que algunos anticuerpos son más efectivos que otros tapizando las placas de microtitulación [270].

E.XVIII. ELISA DAS:

E.XVIII.a: ELISA con parejas efectivas:

En esta prueba empleamos todos los serotipos conocidos de enterotoxinas, exceptuando EEC₂ y EEC₃, como venimos realizando a lo largo de este estudio. Las enterotoxinas fueron utilizadas a las concentraciones habituales en nuestro laboratorio para realizar el patrón en el ELISA DAS con anticuerpos policlonales, es decir, 0, 0'625, 1'25, 2'5, 5 y 10 ng de EE por ml.

Las lecturas obtenidas con otras enterotoxinas con las que no reaccionaban las parejas fueron similares al "blanco" (0 ng/ml) obtenido con la EE homóloga.

Observando las absorbancias obtenidas en esta prueba (Tabla D.5), comprobamos que no existen grandes diferencias en las reacciones de una pareja con las distintas enterotoxinas con las que se une. Esta norma se rompe claramente en la pareja B14-B10*, donde el "blanco" con EEB nos dió una lectura doble al obtenido en EEC. No obstante, a medida que aumenta la concentración de toxina, las lecturas se van igualando, aunque, como es lógico, sin llegar a la paridad.

En la pareja A5-A7* se puede observar algo parecido ya que las lecturas frente a EEA y EEE fueron bastante mayores que frente a EEB, EEC y EED, pero sin llegar al extremo de la pareja B14-B10*. Este resultado parece lógico dado que EEA es la toxina homóloga y EE presenta una estructura antigénica muy similar a EEA.

Refiriéndonos a las correlaciones, podemos comprobar que en líneas generales, son lo suficientemente altas como para considerar el sistema como efectivo, permitiéndonos

detectar con fiabilidad las toxinas en cuestion (Tabla D.5). La correlacion mas baja la obtuvimos con la pareja B7-B2* para la toxina B (0'944), mientras que la mejor resultado obtenerse con la paareja B4-B10* para EEC (0'999). No obstante, las correlaciones varian de una prueba a otra con la misma pareja, debido a las variables intrinsecas y extrinsecas de todo sistema de deteccion, que influyen en gran manera en el proceso, y que ademas son dificiles de controlar (calidad de los tampones y reactivos, temperaturas de incubacion, diluciones de los patrones, etc.).

Debemos destacar que las lecturas obtenidas con este sistema doble-"sandwich" son mucho mas bajas que las obtenidas por Thompson et al. [270] con un sistema ELISA similar. Este hecho se ha repetido en todos los tipos de ELISA realizados por nosotros en este estudio con respecto a los demas autores. En este ELISA-DAS con monoclonales, las lecturas son tambien menores a las obtenidas por nosotros con nuestro ELISA que emplea anticuerpos policlonales, resultado logico, ya que al tratarse de un material mas homogeneo y especifico, el numero de uniones a concentraciones similares debe ser menor, con lo que las lecturas seran a la vez menores. En todo caso, no es tan importante la lectura como la correlacion obtenida entre las lecturas con varias concentraciones de enterotoxinas dentro de un sistema ELISA concreto.

Observando los resultados obtenidos por las diversas parejas, comprobamos que realizando diversas combinaciones de las mismas en un analisis podemos detectar con una de ellas (A5-A7*) todas las enterotoxinas conocidas. Con algunas parejas detectaríamos EEB y EEC (B4-B9*, B4-B10*, B7-B2* y B14-B10*), mientras que la combinacion B14-B12* tan solo reacciona con EEB. Por lo tanto si se produjeran dos lecturas positivas empleando esta ultima pareja y otra de las anteriores, la toxina detectada seria EEB, mientras que si con B14-B12* fuera negativa y con la otra positiva, se trataria de EEC. Asi, tapizando con B14 y empleando dos conjugados (B12* para EEB y B10* para EEC) detectamos ambas toxinas, evitando asi el tapizado con dos anticuerpos distintos. El problema radica en que con este sistema no

podemos saber si en una misma muestra existen a la vez EEB y EEC al carecer de anticuerpos especificos de EEC, debiendo recurrirse al suero policlonal.

Por otro lado, hemos formado varias parejas que reaccionan con EEA y EEE (A5-A2*, A5-A8*, A7-A3* y A7-A8*). Desgraciadamente, el único anticuerpo monoclonal específico para EEA se mostró repetidamente inefectivo para el tapizado y para ser empleado como conjugado. Por lo tanto, con nuestro sistema nos es imposible deducir si una reacción se debe a la presencia de EEA o EEE, y aunque funcionara bien, presentaría el mismo inconveniente que citábamos antes para la detección de EEB y EEC en mezclas ya que carecemos de anticuerpos específicos de EEE. Un dato más es que una reacción positiva con la pareja A5-A7* y negativa con el resto, nos indicaría la presencia de EED.

Sin duda el resultado más importante de todos es el haber formado una pareja efectiva para la detección de todas las EEs. Ninguno de los autores que describen anticuerpos monoclonales que reaccionan con todas las enterotoxinas conocidas [82, 173] describe un ELISA efectivo para todas las EEs empleando de forma exclusiva anticuerpos monoclonales. De ellos Edwin et al. [82] lo intentaron, pero fueron incapaces de diseñarlo. Lapeyre et al. [155, 156] utilizan anticuerpos monoclonales con distintas especificidades como anticuerpos de captura y un polisero que reacciona con las cuatro clases de enterotoxinas con las que reaccionan sus monoclonales (EEA, EEB, EEC y EED), sin mencionar cómo obtienen dichos anticuerpos policlonales. Nosotros tenemos la ventaja de emplear siempre anticuerpos monoclonales, que incluso detectan EEE, y de no tener que recurrir a un tapizado con varias clases de anticuerpos monoclonales. Además, tal y como exponen Thompson et al. [268] es difícil entender el razonamiento que lleva a emplear una mezcla de anticuerpos monoclonales y policlonales, si uno está interesado en eliminar la necesidad de producir sueros en conejo, para lo que se obtienen anticuerpos monoclonales. Edwin [80] emplea también sistemas combinados monoclonal-policlonal para la detección de EEA.

E.XVIII.b: Otras combinaciones:

Debido a que tan sólo intentamos formar combinaciones entre anticuerpos obtenidos frente a la misma EE, optamos por realizarlas también entre aquellos obtenidos frente a EEB y los producidos frente a EEA que reaccionaban con todas las enterotoxinas. Solo probamos aquellos que se comportaron correctamente bien en el tapizado o bien como anticuerpo marcado, teniendo en cuenta que los anticuerpos frente a EEB nos limitaron la detección posible a EEB y/o EEC.

Como podemos observar en las lecturas obtenidas en las combinaciones posibles y de acuerdo a las correlaciones obtenidas (Tabla D.6), no se encontraron emparejamientos excesivamente buenos, aunque aparecieron correlaciones suficientemente altas en algunos casos para una determinada toxina, pero no para la otra (en los casos en que se pueden detectar dos). Por ejemplo, la pareja A7-B2* muestra una correlación de 0'976 para EEB, mientras que para EEC el resultado es de 0'861, valor claramente insuficiente. La única combinación que aportó algún resultado positivo fue la pareja A7-B10*, cuyas correlaciones fueron relativamente altas (0'970 para EEB y 0'981 para EEC), lo que nos aportaría una nueva pareja. En este análisis empleamos también el monoclonal A5*, aunque los estudios previos nos indicaron que no era válido para ser empleado como conjugado. De nuevo comprobamos su mal comportamiento dando correlaciones bajas en todas las combinaciones empleadas.

E.IX. DETECCIÓN DE EES EN ALIMENTOS

Elegimos para esta prueba la EEB, debido a que es una toxina que puede ser detectada con los anticuerpos obtenidos frente a EEA (pareja A5-A7*) como con los obtenidos frente a EEB. Elegimos para esta prueba dos parejas con anticuerpos obtenidos frente a EEB (B4-B9* y B4-B10*) y la anteriormente citada de anticuerpos frente a EEA. Además probamos de nuevo la combinación inversa (A7-A5*) repitiéndose los malos resultados.

Además de lo anteriormente citado realizamos una mezcla de los anticuerpos A5 y A7 para el tapizado, empleando como conjugado una mezcla de dichos anticuerpos marcados con peroxidasa. Para la solución de tapizado, se emplearon dichos anticuerpos a una concentración de $5 \mu\text{g/ml}$ cada uno (concentración final de proteína: $10 \mu\text{g/ml}$), mientras que como conjugado, se diluyó cada uno a una concentración final de 1:2.000 (es decir el doble de diluido de lo habitual). Esta mezcla en teoría debía aumentar la afinidad de cada anticuerpo por el antígeno [84, 189].

Como puede comprobarse, las correlaciones son adecuadas pese a que cada anticuerpo se encontraba a la mitad de la concentración. Según Thompson *et al.* [270] mezclas de dos monoclonales pueden producir en ELISA (no en RIA) una curva estándar bimodal, hecho que no ocurre en nuestro caso, ya que nuestra curva estándar es similar a la obtenida con anticuerpos individuales. Para estos autores, las mezclas deberían constar de tres o más monoclonales.

Las lecturas obtenidas con los extractos "blanco" de cada alimento, una vez analizadas dan resultados negativos en cuanto a cantidad de EEB, salvo en el caso del yogur en que las parejas B4-B9* y B4-B10* y la mezcla de A5-A7* presentan un ligero falso positivo, en todos los casos por debajo de 1 ng/ml . Las concentraciones de toxina están referidas a los $100 \mu\text{l}$ de muestra analizados en cada pocillo, por lo tanto se debe trasladar a los 10 ml finales del extracto alimenticio (Tabla D.7).

Así, vemos que como máximo detectamos $1.09 \mu\text{g}$ (extracto de yogur contaminado en el caso de la pareja B4-B10*). Los valores obtenidos en todos los casos son similares para cada alimento, con variaciones mínimas debidas a la técnica. Por lo tanto, en el mejor de los casos recuperamos el 10 % de la toxina añadida al alimento, cuando con esta técnica nosotros recuperamos en yogur entre el 48 y el 60 % [205]. esta particularidad es extrema en el caso del extracto cárnico, donde recuperamos todavía 10 veces menos, hecho lógico si se tiene en cuenta la dificultad para una extracción de un

alimento de estas características. En cualquier caso, se trata de un defecto en la realización de la técnica de extracción que no influye en la demostración final, que es la capacidad de nuestro sistema ELISA para diferenciar entre un extracto alimenticio normal de uno contaminado.

E.XI. CAPACIDAD DE DETECCIÓN

De todo lo expuesto anteriormente, podemos deducir que nuestro sistema ELISA-DAS, que emplea de forma exclusiva anticuerpos monoclonales, es al menos tan efectivo como el sistema policlonal, detectando con fiabilidad cantidades menores a 1 ng de EE (aproximadamente 0'6 ng de EE por ml).

Schewalder *et al.* [236] indican una sensibilidad de su sistema de 0'025 ng/ml en comparación con los 0'22 ng/ml de su sistema policlonal. Dupont *et al.* [77] señalan una sensibilidad de 0'1 ng/ml empleando un anticuerpo monoclonal marcado con avidina, mientras que en un sistema ELISA similar al nuestro, la capacidad es de 10 ng/ml. El marcar con avidina reduce notablemente la interferencia por proteína A aunque no la elimina [77]. Nosotros sin embargo debemos recurrir a la adición de suero normal de conejo a la muestra (1:1) [92], tal y como venimos haciendo hasta ahora. No obstante, los problemas de interferencia con proteína A y sobre todo los falsos positivos podrían eliminarse realizando las diluciones de toxina patrón en extracto "blanco" de alimento a analizar [97]. Sin embargo, es muy difícil que el "blanco" tenga exactamente los mismos componentes que el alimento problema [236]. Afortunadamente, las uniones inespecíficas de nuestro sistema son prácticamente nulas.

F. CONCLUSIONES



- PRIMERA:** de los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir que no es necesario realizar inmunizaciones con varios serotipos de enterotoxinas para obtener anticuerpos monoclonales que reconozcan todas las enterotoxinas conocidas.
- SEGUNDA:** una vez definida una pareja de anticuerpos monoclonales que funcione adecuadamente en un sistema ELISA DAS, no es factible el realizar combinaciones recíprocas de dicha pareja, esto es que el anticuerpo que funciona correctamente en el tapizado no puede ser empleado como conjugado, y viceversa.
- TERCERA:** la pareja A5-A7* permite analizar en una sola prueba la presencia o ausencia de enterotoxinas estafilocócicas en substratos laboratoriales o en alimentos.
- CUARTA:** el límite de detección de nuestro sistema ELISA que emplea exclusivamente anticuerpos monoclonales es de 0'6 ng por ml de muestra.
- QUINTA:** los anticuerpos monoclonales de este estudio no se unen a otras proteínas diferentes a las enterotoxinas estafilocócicas, observándose la ausencia de falsos positivos. Por lo tanto su empleo en sistemas de análisis permite detectar enterotoxinas con total fiabilidad.
- SEXTA:** hemos desarrollado un método de diagnóstico ("kit"), que nos permite la detección práctica de todos los serotipos conocidos de enterotoxinas estafilocócicas.

G. RESUMEN



G.I. RESUMEN

En este estudio se produjeron 22 anticuerpos monoclonales frente a dos enterotoxinas estafilocócicas (EE), 14 de ellos frente a EEB (nombrados como B1 a B14) y 8 de ellos frente a EEA (nombrados como A1 a A8). Estos anticuerpos se obtuvieron fusionando células de bazo procedentes de ratonas de la estirpe BALB/c hiperinmunizadas con EE pura, con células de mieloma (Sp2/O) a una relación de 5:1. Para ello se emplearon técnicas de fusión tradicionales.

Todos los anticuerpos fueron producidos en grandes cantidades haciendo crecer los clones en la cavidad abdominal de ratones pretratados con 0'5 ml de Adyuvante Incompleto de Freund. Los anticuerpos monoclonales presentes en la ascitis fueron parcialmente purificados mediante precipitación con sulfato amónico, aunque dos de ellos (B1 y B3) sufrieron además un pase por columna de gel filtración.

Se procedió a caracterizar estos anticuerpos mediante el método ELISA indirecto, determinándose título (frente a dos concentraciones de tapizado: 0'1 μg de EE/ml y 1 μg de EE/ml), subclase de IgG a la que pertenecían, capacidad de detección, capacidad de inhibición, con determinación de su constante de disociación y reacciones cruzadas con otras enterotoxinas, dato que fue confirmado mediante la técnica de inmunotransferencia.

El 63'6 % de los anticuerpos monoclonales de este estudio pertenecieron a la subclase IgG₁, mientras que el 36'4 % restante fueron de la subclase IgG_{2b}.

La mayoría de los anticuerpos monoclonales presentaron títulos bajos en ambos sistemas, oscilando entre 1:40 y 1:1.280 cuando las placas fueron tapizadas con 0'1 μg y entre 1:640 y 1:40.960, cuando en el sistema se empleó 1 μg . Estos títulos bajos fueron achacados a una deficiente precipitación, extremo que fue confirmado al determinar el título de la ascitis original de 8 de estos hibridomas (1:>10³ a 1:10⁷).

Todos los anticuerpos monoclonales de este estudio fueron capaces de detectar bajas cantidades de enterotoxinas empleadas en el tapizado (1 ng totales en el peor de los casos, aunque la gran mayoría detectó 0'1 ng) y su capacidad de unión a la EE homóloga en ELISA de competición fue inhibida con pequeñas cantidades de EE (500 ng aproximadamente en los peores casos, mientras que los anticuerpos B5, B13, B14, y A2, necesitaron tan sólo 0'5 ng), datos que nos demostraban que se trataba de anticuerpos de elevada afinidad.

En cuanto a las reacciones cruzadas, cabe destacar el que dos de los anticuerpos producidos frente a EEA reaccionaron con todos los serotipos de EE conocidos (A5 y A7) en los dos sistemas de análisis empleados. Los demás monoclonales fueron específicos para la EE homóloga (B5, B13 y A1) o presentaron otras reacciones cruzadas (B-C₁ y A-E, principalmente).

Se determinaron que anticuerpos eran capaces de funcionar en un sistema ELISA DAS, en la función de tapizado o en la de conjugado, diseñándose las parejas efectivas de anticuerpos monoclonales. La pareja A5-A7* permite detectar bajas cantidades de todas las enterotoxinas conocidas mediante este sistema ELISA (0'6 ng EE/ml), siendo capaz de diferenciar la presencia de EE de los materiales presentes en el líquido resultante de la extracción a partir de alimentos. Las parejas de anticuerpos monoclonales que funcionaron correctamente en el sistema ELISA DAS fueron: B4-B9*, B4-B10*, B7-B2*, B7-B8*, B14-B10*, B14-B12*, A5-A2*, A5-A7*, A5-A8*, A7-A1* y A7-A8*.

G.II. SUMMARY

In this study, we produced 22 monoclonal antibodies against two staphylococcal enterotoxins (SE), 14 against SEB (named B1 through B14) and 8 against SEA (named A1 through A8). These antibodies were obtained by the fusion of spleen cells from female BALB/c mice hiperimmunized with pure SE, with Sp2/O cells. The ratio was 5:1 and the fusion was

carried out by standard techniques.

All the antibodies were produced in high quantities by growing the clons in the abdominal cavities of mice pretreated with 0.5 ml of Incomplete Freund's Adjuvant. The monoclonal antibodies presents in the ascites were partially purified by precipitation with ammonium sulphate, though two (B1 and B3) were also filtered through a column filled with Sephacryl S-200.

These antibodies were characterized by indirect ELISA. We determined the titer using two concentrations of SE to coat the plates: 0.1 and 1 $\mu\text{g}/\text{well}$. Most of them had low titers, ranging between 1:40 and 1:1280 when plates were coated with 0.1 μg , and between 1:640 and 1:40960 when we used 1 μg . We believe that this low titer was due to an incomplete precipitation, as the titer of the original ascites ranged between 1: $>10^3$ and 1: 10^7 .

Most (63.6 %) of the monoclonal antibodies belonged to IgG₁ subclass, while the remainig 36.4 % to IgG_{2b}.

All the monoclonal antibodies in this study were able to detect low quantities of enterotoxins used for coating the plates (at least 1 ng total, though most of them could detect 0.1 ng total). Their ability to react with the homologous SE in a competition ELISA could be inhibited with low quantities of SE (at least 500 ng, while B5, B13, B14 and A2 only needed 0.5 ng); this shows that they are high affinity antibodies.

As respects cross-reactions, two of the antibodies produced against SEA (A5 and A7) reacted with all the known serotypes in the detection systems we used. The remaining monoclonal antibodies were either specific for the homologous SE (B5, B12, A1) or showed other crossed reactions (B-C, A-E mainly).

We determined which antibodies could be used in an ELISA double antibody sandwich, either for coating or as conjugate (monoclonal antibody number plus *), and we choose the efective pairs. The pair A5-A7* can detect all the known

enterotoxins by this ELISA system (with a detection limit of 0.6 ng/ml), and is able to differentiate SE from the contaminating materials from a food extract. The monoclonal antibodies pairs which worked correctly in a ELISA DAS were: B4-B9*, B4-B10*, B7-B2*, B7-B8*, B14-B10*, B14-B12*, A5-A2*, A5-A7*, A5-A8*, A7-A3* Y A7-A8*.

H. BIBLIOGRAFIA



- [1] ABRAMS, P.G.; J.L. ROSSIO; W.C. STEVENSON and K.A. FOON (1986). Optimal strategies for developing human-human monoclonal antibodies. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part 1. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and M. Van VUNAKIS), 121: 107-119. Academic Press (Nueva York).
- [2] AHKONG, O.F.; D. FISHER; V. TAMPION and J.A. LUCY (1975). Mechanisms of cell fusion. *Nature*, 253: 194-195.
- [3] ANDERSON, I. (1980). Fetal calf serum drought hits cell culture laboratories. *Nature*, 285: 63.
- [4] ANDERSON, P.N. and M. POTTER (1969). Induction of plasma cell tumours in BALB/c mice with 2,6,10,14-Tetramethylpentadecane (Pristane). *Nature*, 222: 994-995.
- [5] ANDERSSON, J. and F. HELCHERS (1978). The antibody repertoire of hybrid cell lines obtained by fusion of X63-Ag8 myeloma cells with mitogen-activated B-cell blasts. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.*, 81: 130-139.
- [6] ANOHIMO (1982). Method may boost monoclonal antibody output. *CHEM*, 11: 22-23.
- [7] ANOHIMO (1986). Monoclonal antibody purification. *Separation News*, 13: 1-5.
- [8] ASHORN, P. and K. KROHN (1986). Washing of ELISA plates with running tap water. *J. Immunol. Methods*, 88: 141-142.
- [9] ASTALDI, G.C.B.; M.C. JANSSEN; P. LANSDORP; C. WILLEMS; W.P. ZEIJLEMAKER and F. OOSTERHOF (1980). Human Endothelial Culture Supernatant (HECS): a growth factor for hybridomas. *J. Immunol.*, 123: 1411-1414.
- [10] BANKERT, R.B.; D. DESOYE and L. POWERS (1980). Screening and replica plating of anti-hapten hybridomas with a transfer template hemolytic spot assay. *J. Immunol. Methods*, 35: 23-32.
- [11] BANKERT, R.B.; D. DESOYE and L. POWERS (1980). Antigen-promoted cell fusions: antigen-coated myeloma cells fuse with antigen-reactive spleen cells. *Transplantation Proceedings*, 12: 443-446.
- [12] BARALD, K.F. and K.X. VESSELLS (1984). Differential antigen adhesivity used to select spleen cells for the production of monoclonal antibodies to embryonic neurons. *J. Immunol. Methods*, 73: 1-15.
- [13] BARTAL, A.N. and Y. KIRSHAUT (1987). Current methodologies in hybridoma formation. En "Methods of hybridoma formation" (Eds. A.N. BARTAL and Y. KIRSHAUT), pp. 1-40, Humana Press (Nueva Jersey).
- [14] BASTIN, J.M.; J. KIRKLEY and A.J. McMICHAEL (1982). Production of monoclonal antibodies: a practical guide. En "Monoclonal antibodies in clinical medicine" (Eds. A.J. McMICHAEL and J.W. FABRE), pp. 503-517, Academic Press (Nueva York).
- [15] BAZIN, H. (1987). Rat-rat hybridoma formation and rat monoclonal antibodies. En "Methods of hybridoma formation" (Eds. A.N. BARTAL and Y. KIRSHAUT), pp. 337-378, Humana Press (Nueva Jersey).
- [16] BAZIN, H.; F. CORHONT and L. De CLERQ (1984). Rat monoclonal antibodies. II. A rapid and efficient method of purification from ascitic fluid or serum. *J. Immunol. Methods*, 71: 9-16.

- 1171 BAZZIN, M.; P. CORNONT and A. DE CLESCQ (1986). Purification of rat monoclonal antibodies. En *Methods in Enzymology: Immunological Techniques, Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies* (Eds. J.L. LANGONE and N. Van VUNAKIS), 121: 638-652. Academic Press (New York).
- 1181 BAZZIN, M. and J. M. MALACHE (1986). Rat (and mouse) monoclonal antibodies. V. A simple automated technique of antigen purification by immunaffinity chromatography. *J. Immunol. Methods*, 93: 19-24.
- 1191 BEATTY, J.D.; B.G. BEATTY and W.G. VLAMOS (1987). Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay. *J. Immunol. Methods*, 100: 173-179.
- 1201 BERDAL, B.P.; O. OLSVIK and T. OHLAND (1981). A sandwich ELISA method for detection of ~~Staphylococcus aureus~~ enterotoxins. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 89: 411-415.
- 1211 BERGDELL, M.S. (1971). Enterotoxins. En *"Microbial Toxins"* (Eds. T.C. MONTIE, S. KAGIS and S.J. ADLER), 3: 295-306. Academic Press (New York).
- 1221 BERGDELL, M.S. (1972). The nature of bacterial toxins. *Clin. Toxicol.*, 7: 441-451.
- 1231 BERGDELL, M.S. (1973). Staphylococcal intoxications. En *"Food-borne Infections and Intoxications"* (Eds. H. RIZOVIC and F.L. MATHAN), pp. 443-494. Academic Press (New York).
- 1241 BERGDELL, M.S. (1989). ~~Staphylococcus aureus~~. En *"Foodborne Bacterial Pathogens"* (Ed. M.P. DOYLE), pp. 463-503. Mark Dekker (New York).
- 1251 BERGDELL, M.S.; E.B. BORJA and R.M. AVENA (1965). Identification of a new enterotoxin as enterotoxin B. *Bacteriol.*, 90: 1467-1468.
- 1261 BERGDELL, M.S.; E.B. BORJA; R.H. ROBBINS and K.F. WEISS (1977). Identification of enterotoxin B. *Infect. Immun.*, 51: 593-598.
- 1271 BERGDELL, M.S.; I.-Y. HUANG and E.J. SCHANTZ (1974). Chemistry of the staphylococcal enterotoxins. *J. Agric. Food Chem.*, 22: 9-13.
- 1281 BERGDELL, M.S. and R.F. WEISER (1980). Application of radioimmunoassay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *J. Food Prot.*, 43: 68-72.
- 1291 BERGDELL, M.S. and R.M. ROBBINS (1973). Characterization of types of staphylococcal enterotoxins. *J. Milk Food Technol.*, 36: 610-612.
- 1301 BERGDELL, M.S.; M. SUBRAMA and G.M. DACK (1959). Staphylococcal enterotoxin. I. Purification. *Arch. Biochem. Biophys.*, 45: 62-69.
- 1311 BERT, G.M.; D.F. BOFFY; J.M. SLING; M.E. THOMPSON; L.E. ADOLFI and P.F. BONVENTRE (1986). Production of rabbits in an infection model of Toxic Shock Syndrome (TSS) by a TSS toxin-3-specific monoclonal antibody. *Infect. Immun.*, 54: 998-999.
- 1321 BLUMSTEIN-WANAWANA, D.S.; S.P. NOVICK and P.M. SCHLEVERT (1986). Localization of biologic markers of Toxic Shock Syndrome toxin-1 by use of monoclonal antibodies and antigenic bromelain-generated toxin fragments. *J. Immunol.*, 137: 3572-3576.
- 1331 BOREAN, M.; G. BURTONOV and H. BAZZIN (1985). Rat monoclonal antibodies. IV. Easy method for in vitro production. *J. Immunol. Methods*, 79: 1-6.
- 1341 BOREN, A. (1986). Clonal isolation of hybridomas by manual single-cell isolation. [In

- "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 332-340. Academic Press (Nueva York).
- [35] BONACH, G.A.; C.J. HOVDE; J.P. HAWLEY and P.M. SCHLIEVERT (1988). Cross-neutralization of staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins by monoclonal and polyclonal antibodies. *Infect. Immun.*, 56: 400-404.
- [36] BONVENTRE, P.F.; M.R. THOMPSON; L.E. ADIWOLFI; Z.A. GILLIS and J. PARSONNET (1988). Neutralization of Toxic Shock Syndrome Toxin-1 by monoclonal antibodies in vitro and in vivo. *Infect. Immun.*, 56: 135-141.
- [37] BORJA, C.R. (1969). Staphylococcal enterotoxin C. I. Phenolic hidroxil ionization. *Biochemistry*, 8: 71-75.
- [38] BORJA, C.R. and M.S. BERGDOLL (1969). Staphylococcal enterotoxin C. II. Some physical, immunological and toxic properties. *Biochemistry*, 8: 75-79.
- [39] BOSS, B.D. (1986). An improved in vitro immunization procedure for the production of monoclonal antibodies. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 27-33. Academic Press (Nueva York).
- [40] BRAMS, P.; D.E. PETTIJOHN; M. BROWN and L. OLSSON (1987). In vitro B-lymphocyte antigen priming against both non-immunogenic and immunogenic molecules requiring low amounts of antigen and applicable in hybridoma technology. *J. Immunol. Methods*, 98: 11-22.
- [41] BRODEUR, B.R. and P.S. TSANG (1986). High yield monoclonal antibody production in ascites. *J. Immunol. Methods*, 86: 239-241.
- [42] BRODEUR, B.R.; P. TSANG and Y. LAROSE (1984). Parameters affecting ascites tumour formation in mice and monoclonal antibody production. *J. Immunol. Methods*, 71: 265-272.
- [43] BRODIN, T.; L. OLSSON and H.O. SJÖGREN (1986). Feeder effect of enriched human monocytes on human hybridoma, myeloma, and lymphoma cell lines. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 295-300. Academic Press (Nueva York).
- [44] BUCHANAN, D.; M. KAMARCK and H.N. RIDDLE (1981). Development of a protein A enzyme immunoassay for use in screening hybridomas. *J. Immunol. Methods*, 42: 179-185.
- [45] BURCKIEL, S.W. (1986). Purification and analysis of monoclonal antibodies by high-performance liquid chromatography. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 596-615. Academic Press (Nueva York).
- [46] BURCKIEL, S.W.; J.R. BILLMAN and T.R. ALBER (1984). Rapid and efficient purification of mouse monoclonal antibodies from ascites fluid using high performance liquid chromatography. *J. Immunol. Methods*, 69: 33-42.
- [47] BURKOT, T.R.; R.A. WIRTZ and J. LYON (1985). Use of fluorodinitrobenzene to identify monoclonal antibodies which are suitable for conjugation to periodate-oxidized horseradish peroxidase. *J. Immunol. Methods*, 84: 25-31.

- 1480 BURNET, F.M. (1957). A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *Austral. J. Sci.*, 20: 67.
- 1491 CARLSSON, M.; J. HEDIN; M. ISOGAKI; S. HARFAST and F. KLONBERG (1985). Purification of in vitro produced mouse monoclonal antibodies. A two-step procedure utilizing cation exchange chromatography and gel filtration. *J. Immunol. Methods*, 79: 89-98.
- 1501 CARSON, D.A. and B.D. FREEMAN (1986). Human lymphocyte hybridomas and monoclonal antibodies. In "Advances in Immunology" (Ed. F.J. DIXON), 38: 275-311. Academic Press (New York).
- 1511 CASMAN, E.P. (1960). Further serological studies of staphylococcal enterotoxin. *J. Bacteriol.*, 79: 849-856.
- 1521 CASMAN, E.P. and R.W. BENNETT (1965). Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Appl. Microbiol.*, 13: 181-189.
- 1531 CASMAN, E.P.; R.W. BENNETT; A.E. GORSEY and J.A. ISSA (1967). Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *J. Bacteriol.*, 94: 1875-1882.
- 1541 CASMAN, E.P.; M. S. BERGDOLL and J. ROBINSON (1963). Designation of staphylococcal enterotoxins. *J. Bacteriol.*, 85: 715-716.
- 1551 CAIT, K. and S.W. TROSBER (1967). Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes. *Science*, 158: 1570-1572.
- 1561 CERRATO, A.; M. De MICHA; F.F. PUSSI and G.C.B. ASTALDI RICOTTI (1985). Carboxyethyl gamma-aminobutyric acid, a polyamine derivative molecule with a growth effect on hybridomas. *J. Immunol. Methods*, 79: 229-235.
- 1571 DAVIN, D.L. and M.L. BANQUERIGO (1986). Cloning of murine hybridoma cells in ultra-low gelation temperature agarose. In "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and N. Van VUNAKIS), 131: 302-307. Academic Press (New York).
- 1581 CLARK, W.S. and J.S. PAGE (1968). Pyrogenic responses to staphylococcal enterotoxins A and B in mice. *J. Bacteriol.*, 96: 1940-1944.
- 1591 COURCO, L. De; F. COMONT and H. BAZIN (1986). Generation of rat hybridomas with the use of the LGM 2702F nonsecreting fusion cell line. In "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and N. Van VUNAKIS), 131: 254-258. Academic Press (New York).
- 1601 CRUICKSHANK, W.L.; J. WOOD and B.F. ERLINGER (1981). Routine large-scale production of monoclonal antibodies in a protein-free culture medium. *J. Immunol. Methods*, 58: 221-234.
- 1611 COLLETTI, D.S.; S.M. HOSANALEK and J.R. McGRUE (1986). Method for generating a high frequency of hybridomas producing monoclonal IgM antibodies. In "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and N. Van VUNAKIS), 131: 42-51. Academic Press (New York).
- 1621 COLLIER, H.A. and B.S. COLLIER (1983). Statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique with a view toward ensuring hybridoma monoclonality. *Hybridoma*, 2: 95-96.
- 1631 COLLIER, H.A. and B.S. COLLIER (1986). Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by

- the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality. En "Methods in Enzymology, Immunochemical Techniques, Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 412-417. Academic Press (Nueva York).
- [64] COLLINS, W.S.; A.D. JOHNSON; J.F. METZGER and R.W. BENNETT (1973). Rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Microbiol.*, 25: 774-777.
- [65] COLLINS, W.S.; J.F. METZGER and A.D. JOHNSON (1972). A rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal B enterotoxin. *J. Immunol.*, 108: 852-856.
- [66] COPPE, P. (1968). Les anticorps monoclonaux en diagnostic vétérinaire. *Ann. Méd. Vét.*, 132: 243-250.
- [67] CORHONT, F.; P. MANOUVRIZ; L. De CLERCO and H. BAZIN (1986). The use of rat monoclonal antibodies to characterize, quantify, and purify polyclonal or monoclonal mouse IgM. En "Methods in Enzymology, Immunochemical Techniques, Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 622-631. Academic Press (Nueva York).
- [68] COTTON, R.G.H. and C. MILSTEIN (1973). Fusion of two immunoglobulin-producing myeloma cells. *Nature*, 244: 42-43.
- [69] CRAWLEY, G.J.; J.N. BLACK; J. GRAY and J.W. BLANCHARD (1966). Clinical chemistry of staphylococcal enterotoxin poisoning in monkeys. *Appl. Microbiol.*, 14: 445-450.
- [70] CHU, F.S. (1968). Hydrogen ion equilibria of staphylococcal enterotoxin B. *J. Biol. Chem.*, 243: 4342-4349.
- [71] CHU, F.S.; E. CRARY and M.S. BERGDOLL (1969). Chemical modification of amino groups in staphylococcal enterotoxin B. *Biochemistry*, 8: 2890-2896.
- [72] DALIDOWICZ, J.E.; S.J. SILVERMAN; E.J. SCHANTZ; D. STEFANYE and L. SPERO (1966). Chemical and biological properties of reduced and alkylated staphylococcal enterotoxin B. *Biochemistry*, 5: 2375-2381.
- [73] DAVIS, J.M. (1986). A single-step technique for selecting and cloning hybridomas for monoclonal antibody production. En "Methods in Enzymology, Immunochemical Techniques, Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 307-322. Academic Press (Nueva York).
- [74] DAVIS, J.M.; J.E. PENNINGTON; A.-M. KUBLER and J.F. CONSCIENCE (1982). A simple, single-step technique for selecting and cloning hybridomas for the production of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 50: 161-171.
- [75] DEAN, C.J.; L.A. GYURE; J.D. HALL and J.M. STYLES (1986). Production of IgA-secreting Rat x Rat hybridomas. En "Methods in Enzymology, Immunochemical Techniques, Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 52-59. Academic Press (Nueva York).
- [76] DEUSEN, R.A. Van and C.A. WHEATSTONE (1981). Practical aspects of producing and using antiviral monoclonal antibodies as diagnostic reagents. *Amer. Assn. Veterinary Laboratory Diagnosticians. 24th Annual Proceedings*, pp. 221-228.

- 1771 DUPONT, M.; J. HERASSE; J.M. PINON and P. BINDER (1990). Detection of staphylococcal enterotoxin B: A comparative study of ELISA and ELIPA systems. *J. Immunol. Methods*, **128**: 287-294.
- 1772 EASER, K.B. and R.W. KIMBLE (1986). The use of conventional antisera in the production of modified monoclonal antibodies. In "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and N. VAN VUNAKIS), **121**: 59-69. Academic Press (New York).
- 1773 EBY, E.W., C.H. MILLER and C.A. LINGGOD (1985). Preparation of monoclonal antibody to sulfoxymethylerythrosin by in vitro immunisation with a glycolipid-glass conjugate. *J. Immunol. Methods*, **81**: 137-146.
- 1774 EDWIN, S. (1987). Quantitative determination of staphylococcal enterotoxin A by an enzyme-linked immunosorbent assay using a combination of polyclonal and monoclonal antibodies and brain-streptavidin interaction. *J. Clinical Microbiol.*, **22**: 1496-1501.
- 1775 EDWIN, S.; S.R. YATINI and S.K. MAHESWARAN (1986). Nature and reactivity of staphylococcal enterotoxin A monoclonal antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**: 1247-1252.
- 1776 EDWIN, S.; S.R. YATINI and S.K. MAHESWARAN (1986). Specificity and cross-reactivity of staphylococcal enterotoxin A monoclonal antibodies with enterotoxins B, C, D and E. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**: 1253-1257.
- 1777 EDWIN, S.; S.R. YATINI; N.S. STROBEL and S.K. MAHESWARAN (1984). Production of monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**: 1171-1175.
- 1778 EMBELSON, P.K.; W.R. MOYER; Z.A. HOUSARA and R.E. CARFIELD (1982). Mixing two monoclonal antibodies yields enhanced affinity for antigen. *J. Immunol.*, **129**: 2709-2713.
- 1779 EVAN, G.I. (1985). A simple and rapid solid phase enzyme-linked immunosorbent assay for measuring monoclonal antibodies to poorly soluble proteins. *J. Immunol. Methods*, **73**: 427-435.
- 1780 FY, P.L.; S.J. PROWSE and C.R. JENKIN (1978). Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochimistry*, **15**: 429-436.
- 1781 GEBREAB, Y.Y.; Y.P. MOGANA and A.M. MOGANA (1982). Properties of staphylococcal enterotoxin A under limited proteolysis. *Int. J. Biochem.*, **14**: 505-510.
- 1782 FASENAS DE ST. GONZA, S. (1980). Monoclonal antibodies and how to make them. *Transplantation Proceedings*, **12**: 647-650.
- 1783 FASENAS DE ST. GONZA, S. (1983). Automated production of monoclonal antibodies in a cytostat. *J. Immunol. Methods*, **57**: 121-136.
- 1784 FASENAS DE ST. GONZA, S. (1983). Automated production of monoclonal antibodies in a cytostat. In "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and N. VAN VUNAKIS), **121**: 369-375. Academic Press (New York).
- 1785 FASENAS DE ST. GONZA, S. and D. SCHNEIDER (1980). Production of monoclonal antibodies: methodology and results. *J. Immunol. Methods*, **35**: 1-21.
- 1786 FAY, M.; A. MUELLER and C. MILLER (1984). Simple production of staphylococcal enterotoxin B (SEB) with chromatography and immunofluorescence focusing in flat bed gels. *Zbl. Vet. Med. B*, **31**:

- 508-517.
- [93] FEY, H.; H. PFISTER and O. RUEGG (1984). Comparative evaluation of different enzyme-linked immunosorbent assay systems for the detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D. *J. Clin. Microbiol.*, 19: 34-38.
- [94] FOUNG, S.K.H.; E.G. ENGLEMAN and F.C. GRUMET (1986). Generation of human monoclonal antibodies by fusion of EBV-activated B cells to a human-mouse hybridoma. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 168-174. Academic Press (Nueva York).
- [95] FOX, P.C.; E.H. BERENSTEIN and R.P. SIRAGANIAN (1981). Enhancing the frequency of antigen-specific hybridomas. *Eur. J. Immunol.*, 11: 431-434.
- [96] FRANEK, F. (1986). Purification of IgG monoclonal antibodies from ascitic fluid based on Rivanol precipitation. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 631-638. Academic Press (Nueva York).
- [97] FREED, R.C.; M.L. EVENSON; R.F. REISER and M.S. BERGDOLL (1982). Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 1349-1355.
- [98] FRIQUET, B.; A.F. CHAFFOTTE; L. DJAVADI-OHANIANCE and K.E. GOLDBERG (1985). Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods*, 77: 305-319.
- [99] GAGNON, G. and Y. RAYMOND (1985). Cloning of hybridomas by a single-cell transfer technique. *J. Immunol. Methods*, 78: 267-269.
- [100] GALFRE, G.; G.W. BUTCHER; J.C. HOWARD; C.D. WILDE and C. MILSTEIN (1980). Clonal competition and stability of hybrid myelomas of mouse and rat origin. *Transplantation Proceedings*, 12: 371-375.
- [101] GALFRE, G. and C. MILSTEIN (1981). Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. En "Methods in Enzymology" (Eds. J.J. LANGONE and H.V. Van VUNAKIS), 73: 3-46. Academic Press (Nueva York).
- [102] GALFRE, G.; C. MILSTEIN and B. WRIGHT (1979). Rat x Rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG. *Nature*, 277: 131-133.
- [103] GARRITY, G.J. Mc; J. SARAMA and V. VAKAMAN (1985). Cell culture techniques. *ASM News*, 51: 170-183.
- [104] GASPER, E.; R.C. HEIMSCH and A.W. ANDERSON (1973). Quantitative detection of type A staphylococcal enterotoxin by Laurell electroimmunodiffusion. *Appl. Microbiol.*, 25: 421-426.
- [105] GAVILONDO, J.V. (1990). Anticuerpos monoclonales de segunda generación. *Investigación y Ciencia*, 169: 72-79.
- [106] GEARING, A.J.W.; R. THORPE; L. SPITZ and K. SPITZ (1985). Use of 'single shot' intrasplenic immunization for production of monoclonal antibodies specific for human IgM. *J. Immunol. Methods*, 76: 337-343.

- 17071 GEFNER, M. L.; D.V. NARAYANES and M.D. SCHARF (1977). A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somat. Cell Genet.*, 3: 231-236.
- 17080 GIBBSON, D. and G. SAGGS (1963). Properties of a somatic hybrid between mouse cells with different genotypes. *Nature*, 199: 912-913.
- 17089 GOLDBERT, Z.P. (1966). Effects of staphylococcal enterotoxin B on the coagulation mechanism and leukocyte response in beagle dogs. A preliminary study. *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica*, 36: 697-706.
- 17100 GOSSETT, R.V. (1987). Alternatives to pristane priming for ascitic fluid and monoclonal antibody production. *J. Immunol. Methods*, 92: 21-23.
- 17173 GOSHAW, J.W. (1981). Antibody production by hybridomas. *J. Immunol. Methods*, 32: 285-306.
- 17183 GOMEZ-LUCIA Y DUTRA, M.B. (1985). Síntesis de enterotoxinas estafilocócicas en alimentos tipo de elevado consumo. Tesis Doctoral. Facultad de veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.
- 17195 GRONIMONDZ, E.; A. GOUTINHO and P. MELCHERS (1976). A plaque assay for oil cells secreting Ig of a given type or class. *Eur. J. Immunol.*, 6: 588-590.
- 17164 GOLDBY, A.J.; B. BRILMANAN and R.A. GOLDBY (1986). Production and characterization of bovine γ immunoglobulin from bovine x murine hybridomas. In "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGRISH and N. VAN MUNKWICHT), 32: 244-265. Academic Press (New York).
- 17193 GULFBERG, J. and M.N. ISCOFF (1976). Partial replacement of serum by selenite, transferrin, albumin and lactacin in hemopoietic cell cultures. *Nature*, 263: 594-595.
- 17194 HADAW, B. and O. THEILM (1987). Production of monoclonal antibodies. The effect of hybridoma concentration on the yield of antibody-producing clones. *J. Immunol. Methods*, 92: 3-6.
- 17190 HALL, M.B.; S. ANSELOTTI and E.M. LEWIS (1965). Detection of the staphylococcal enterotoxin in food. *Health Lab. Sci.*, 2: 179-191.
- 17021 HARRIS, H. and J.W. HARKINS (1963). Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of somatic cells from different species. *Nature*, 203: 646-648.
- 17037 HERRMANN, H. J. A.G. LUZZATI and H. SCHNEIDER (1978). Fusion of *in vivo* immunized lymphoid cells with myeloma. *Exp. Top. Microbiol. Immunol.*, 11: 92-99.
- 17029 HETTINGER, V. VANJ D.J.N. BROCK and E. VAN HETTINGER (1983). A simple method for ranking the effectiveness of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods*, 62: 147-153.
- 17028 HERRIGER, P.; D. VERDREHAGE; K. DE CLERCQ; M. BAZIN and P. DREUT (1985). Rat monoclonal antibodies. III. A simple method for facilitation of hybridoma cell growth *in vitro*. *J. Immunol. Methods*, 80: 103-106.
- 17020 HERRINGMAN, H.J. and C.J. WRIGHT (1969). The effect of pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody production. In "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGRISH and N. VAN MUNKWICHT), 32: 375-389. Academic Press (New York).
- 17026 HERRINGMAN, H.J., S.M. JILLET and A. BRIGG (1967). An improved selection procedure for the

- rescue of hybridomas. A comparative study of methotrexate versus aminopterin. *J. Immunol. Methods*, 98: 145-149.
- [124] HORIBATA, K. and A.W. HARRIS (1970). Mouse myelomas and lymphomas in culture. *Exp. Cell Res.*, 60: 61-77.
- [125] HUANG, J.-Y. and M.S. BERGDOLL (1970). The primary structure of staphylococcal enterotoxin B. III. The cyanogen bromide peptides of reduced and aminoethylated enterotoxin B, and the complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.*, 243: 3518-3525.
- [126] HUANG, J.-Y.; E.J. SCHANTZ and M.S. BERGDOLL (1975). The amino acid sequence of the staphylococcal enterotoxins. *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 28: 73-75.
- [127] JAMES, K and G.T. BELL (1987). Human monoclonal antibody production. Current status and future prospects. *J. Immunol. Methods*, 100: 5-40.
- [128] JOHNSON, H.N.; J.A. BUKOVIC and P.E. KAUFFMAN (1973). Staphylococcal enterotoxins A and B: solid-phase radioimmunoassay in food. *Appl. Microbiol.*, 26: 309-313.
- [129] JOHNSON, H.N.; J.A. BUKOVIC; P.E. KAUFFMAN and J.T. PEELER (1971). Staphylococcal enterotoxin B: solid-phase radioimmunoassay. *Appl. Microbiol.*, 22: 837-841.
- [130] KADISH, J.L. and K.M. WENC (1983). Contamination of polyethylene glycol with aldehydes: implications for hybridoma fusion. *Hybridoma*, 2: 87-89.
- [131] KAPLAN, H.N. and M.J. TENENBAUM (1982). Staphylococcus aureus: cellular biology and clinical application. *Am. J. Med.*, 72: 248-257.
- [132] KARAWAJEW, L.; B. MICHEEL; O. BEHRING and M. GAESTEL (1987). Bispecific antibody-producing hybrid hybridomas selected by a fluorescence activated cell sorter. *J. Immunol. Methods*, 96: 265-270.
- [133] KAUFFMAN, P.E. (1980). Enzyme immunoassay for staphylococcal enterotoxin A. *J.A.O.A.C.*, 63: 1138-1143.
- [134] KAWAMOTO, T.; J.D. SATO; A. LE; D.B. McCURE and G.H. SATO (1983). Development of a serum-free medium for growth of NS-1 mouse myeloma cells and its application to the isolation of NS-1 hybridomas. *Analytical Biochemistry*, 130: 445-453.
- [135] KAWAMOTO, T.; J.D. SATO; D.B. McCURE and G.H. SATO (1986). Serum-free medium for the growth of NS-1 mouse myeloma cells and the isolation of NS-1 hybridomas. In "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 266-277. Academic Press (Nueva York).
- [136] KEARNEY, J.F.; A. RADBRUCH; B. LIESEGANG and K. RAJEVSKY (1979). A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.*, 123: 1548-1550.
- [137] KENNETT, R.H. (1979). Cell fusion. In "Methods in Enzymology. Cell Culture" (Eds. U.S. JAKOBY and I.H. PASTAN), 58: 345-359. Academic Press (Nueva York).
- [138] KENNY, P.A.; A.C. MCCASKILL and W. BOYLE (1981). Enrichment and expansion of specific antibody-forming cells by adoptive transfer and clustering, and their use in hybridoma production. *AJEBAK*, 39: 427-437.

- (190) KIEBLE, E. and H. G. BUSCHMANN (1989). Specificity, cross-reactivity and competition profile of monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxin B and C detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assays. *Med. Microbiol. Immunol.*, **178**: 127-133.
- (191) KIMBLE, M. N. Jr and A. PARKINSON (1987). A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J. Immunol. Methods*, **96**: 271-278.
- (192) KÖHLER, G. (1981). Why hybridomas? *Hybridoma*, **1**: 1-4.
- (193) KÖHLER, G.; S. C. HOWE and C. MILSTEIN (1976). Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines. *Eur. J. Immunol.*, **6**: 292-295.
- (194) KÖHLER, G. and C. MILSTEIN (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**: 495-497.
- (195) KÖHLER, G. and C. MILSTEIN (1978). Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.*, **8**: 511-519.
- (196) KOPISAR, J.A.; J.A. FURMAN and J.J. CEBRA (1982). IgA-producing hybridomas are readily derived from gut-associated lymphoid tissue. *J. Immunol.*, **128**: 2376-2378.
- (197) KOPPEL, J.W.; A.M. NAGEMAARS and S. NOTERMANS (1980). Prevention of cross-reactions in the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of Staphylococcus aureus enterotoxin type B in culture filtrates and foods. *J. Food Safety*, **3**: 35-45.
- (198) KOPPEL, A. and F. PRANKE (1986). Serum-free medium for hybridoma and parental myeloma cell cultivation. In "Methods in Enzymology. Immunochimical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. VAN VLIKAKIS), **121**: 277-292. Academic Press (New York).
- (199) KROBBER, D.; A.E. LIZANDE and J.C. ROPER (1982). Human hybridomas constructed with antigen-specific Epstein-Barr virus-transformed cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**: 6651-6655.
- (200) KUB, J.R.S. and S.J. BELVERMAN (1980). Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of staphylococcal enterotoxins in food. *J. Food Prot.*, **3**: 404-407.
- (201) LAMB, R.D. (1985). A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas. *J. Immunol. Methods*, **81**: 223-228.
- (202) LAMB, R.D.; R.S. CRISSEMAN and S. GINN (1986). High efficiency fusion procedure for producing monoclonal antibodies against weak immunogens. In "Methods in Enzymology. Immunochimical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. VAN VLIKAKIS), **121**: 183-192. Academic Press (New York).
- (203) LAMB, R.D.; R.S. CRISSEMAN and M.F. LACHMAN (1984). Comparison of polyethylene glycols as fusogens for producing lymphocyte-myeloma hybrids. *J. Immunol. Methods*, **72**: 71-76.
- (204) LAMB, D. and H. KOPROWSKI (1982). Molecular recognition and the future of monoclonal antibodies. *Nature*, **296**: 200-202.
- (205) LANGONE, J.A. (1982). Applications of immobilized protein A in immunochimical techniques. *J. Immunol. Methods*, **55**: 277-296.
- (206) LARIVIERE, J.; F. JAHN and S.V. HAYEHL (1988). Indirect double sandwich ELISA using monoclonal antibodies for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D in food samples. *Food*

- Microbiol., 5: 25-31.
- [156] LAPEYRE, C.; S.V. KAVERI; F. JAMIN and A.D. STROSBURG (1987). Production and characterization of monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxins: use in immunodetection and immunopurification. *Mol. Immunol.*, 24: 1243-1254.
- [157] LAPEYRE, C.; S.V. KAVERI and A.D. STROSBURG (1987). A novel approach to prevent the interference of protein A in immunoassays of enterotoxins. *Lett. Appl. Microbiol.*, 5: 55-59.
- [158] LEE, A.C.-M.; R.W. ROBBINS and M.S. BERGDOLL (1978). Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal enterotoxins A and E by affinity chromatography. *Infect. Immun.*, 21: 387-391.
- [159] LEE, A.C.-M.; R.W. ROBBINS; R.F. REISER and M.S. BERGDOLL (1980). Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal enterotoxins B, C₁ and C₂. *Infect. Immun.*, 27: 431-434.
- [160] LEIBO, S.P. and P. MAZUR (1975). The role of cooling rates in low temperature preservation. *Cryobiology*, 8: 447-452.
- [161] LERNHARDT, W.; J. ANDERSSON; A. EDUJINHO and F. MELCHERS (1978). Cloning of murine transformed cell lines in suspension culture with efficiencies near 100%. *Exp. Cell Res.*, 111: 309-316.
- [162] LIETZKE, R. and K. UNSICKER (1985). A statistical approach to determine monoclonality after limiting cell plating of a hybridoma clone. *J. Immunol. Methods*, 76: 223-228.
- [163] LIN, Y.-S.; M.T. LARGEN; J.R. NEWCOMB and T.J. ROGERS (1988). Production and characterization of monoclonal antibodies specific for staphylococcal enterotoxin B. *J. Med. Microbiol.*, 27: 263-270.
- [164] LITTLEFIELD, J.W. (1964). Selection of hybrids from matings of fibroblasts *in vitro* and their presumed recombinants. *Science*, 145: 709-710.
- [165] LITTLEFIELD, J.W. (1966). The use of drug-resistant markers to study the hybridization of mouse fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 41: 190-196.
- [166] LIU, C.T.; R.T. DELAUIER and R.T. FAULKNER (1977). Cardiovascular and hepatic responses of rhesus macaques to staphylococcal enterotoxin B. *Am. J. Vet. Res.*, 38: 1849-1854.
- [167] LO, M.H.S.; T.Y. TSONG; H.K. CONRAD; S.H. STRITTMAYER; L.D. HESTER and S.H. SHYDER (1984). Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion. *Nature*, 310: 792-794.
- [168] MANIL, L.; P. MOTTÉ; P. PERNAS; F. TROALEN; C. BOHUON and D. BELLET (1986). Evaluation of protocols for purification of mouse monoclonal antibodies. Yield and purity in two-dimensional gel electrophoresis. *J. Immunol. Methods*, 99: 25-37.
- [169] MAD, S.J.T. and D.S. FRAWCE (1984). Enhancement of limiting dilution in cloning mouse myeloma-spleen hybridomas by human low density lipoproteins. *J. Immunol. Methods*, 75: 309-316.
- [170] MARGULIES, D.H.; M. KUHL and M.D. SCHARFF (1976). Somatic cell hybridization of mouse myeloma cells. *Cell*, 8: 405-415.
- [171] MATEO, A.; M.L. ARIAS y J.M. SANCHEZ-VIZCAINO (1985). Anticuerpos monoclonales I. Producción

y caracterización. *Med. Vet.*, 5-6: 261-279.

- [172] MENOZZI, F.D.; P. VANDERPOORTEN; C. DEJALFFE and A.O.A. MILLER (1987). One-step purification of mouse monoclonal antibodies by mass ion exchange chromatography on Zetaprep. *J. Immunol. Methods*, 92: 229-233.
- [173] MEYER, R.F.; L. MILLER; R.W. BENNETT and J.D. MACMILLAN (1984). Development of a monoclonal antibody capable of interacting with five serotypes of *Staphylococcus aureus* enterotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 283-287.
- [174] MEYER, R.F. and M.J. PALMIERI (1980). Single radial immunodiffusion method for screening staphylococcal isolates for enterotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40: 1080-1085.
- [175] MIERT, A.S.J.P.A.N. Van; C.T.M. Van DUIN; J.W.M. VERHEIJDEN and A.J.N. SCHOTMAN (1983). Staphylococcal enterotoxin B and *Escherichia coli* endotoxins: comparative observations in goats on fever and associated clinical hematologic and blood biochemical changes after intravenous and intramammary administration. *Am. J. Vet. Res.*, 44: 955-963.
- [176] MILSTEIN, C. (1986). From antibody structure to immunological diversification of immune responses. *Science*, 231: 1261-1268.
- [177] MILSTEIN, C. and A.C. CUELLO (1983). Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature*, 305: 537-540.
- [178] MILLER, K.F., D.J. BOLT and R.A. GOLDSBY (1983). A rapid solution-phase screening technique for hybridoma culture supernatants using radiolabeled antigen and a solid-phase immunoadsorbent. *J. Immunol. Methods*, 50: 277-280.
- [179] MISRA, D.N.; S.A. HOEMAN; H.W. KUNZ and T.J. GILL III (1986). Growth of rat-mouse hybridomas in nude mice and nude rats. In "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part 1. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 386-411. Academic Press (Nueva York).
- [180] MONET, B. (1971). Immunoglobulin G and free kappa-chain synthesis in different clones of a hybrid cell line. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 68: 3045-3048.
- [181] MOLINARD, G.A.; V.C. EBY and C. REIMER (1987). A monoclonal antibody may show cross-reactivities in Ouchterlony assays but not in other assays. *J. Immunol. Methods*, 96: 219-224.
- [182] MONESTIER, M. et C. BONA (1986). Anticorps contre anticorps: les anti-idiotypes. *Biofutur*, 44: 65-66.
- [183] MORISSETTE, C.; J. GOULET and G. LAPOUREUX (1990). Production of avid rabbit antibodies against staphylococcal enterotoxins A and B. *J. Food Prot.*, 33: 782-785.
- [184] MORITA, T.W. and M.J. WOODBURN (1978). Homogeneous enzyme immune assay for staphylococcal enterotoxin B. *Infect. Immun.*, 21: 666-668.
- [185] NOSHMAN, T.R.; M. GALLATIN and E.H. LONGENECKER (1980). Alteration of apparent specificity of monoclonal (hybridoma) antibodies recognizing polymorphic histocompatibility and blood group determinants. *J. Immunol.*, 125: 1152-1156.
- [186] NOUDALLAL, Z. AI; D. ALTSCHUN, J.P. BRIAND and M.H.V. Van REGENMORTEL (1984). Comparative sensitivity of different ELISA procedures for detecting monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods*, 68: 35-43.

- [187] MOURIK, P. Van; R.A. RIVERO; Th.h. Van der KWAST; P.M. LANSDORP and V.P. ZEIJLEMAKER (1984). Density separation of spleen cells increases fusion frequency and yield of Ig-producing hybridomas. *J. Immunol. Methods*, **68**: 45-53.
- [188] MOURIK, P. Van and V.P. ZEIJLEMAKER (1986). Improved hybridoma technology: spleen cell separation and soluble growth factors. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), **121**: 174-182. Academic Press (Nueva York).
- [189] MOYLE, W.R.; C. LIM; R.L. CORSON and P.H. EHRLICH (1983). Quantitative explanation for increased affinity shown by mixtures of monoclonal antibodies: Importance of a circular complex. *Mol. Immunol.*, **20**: 439-452.
- [190] MUELLER, U.W.; C.S. HAMES and W.R. JONES (1986). Monoclonal antibody production by hybridoma growth in Freund's adjuvant primed mice. *J. Immunol. Methods*, **87**: 193-196.
- [191] MURAKAMI, H.; H. MASUI; G.H. SAHO; M. SUEOKA; T.P. CHOW and T. KANO-SUEOKA (1982). Growth of hybridoma cells in serum-free medium: ethanolanine is an essential component. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **79**: 1158-1162.
- [192] NAKANE, P.K. and A. KAWAI (1974). Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, **22**: 1084-1091.
- [193] NAOT, Y. and J.S. RENINGTON (1981). Use of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for detection of monoclonal antibodies: experience with antigens of Toxoplasma gondii. *J. Immunol. Methods*, **43**: 333-341.
- [194] NEON, S.H.; C. GORDON; A. POTIER and H. ZOLA (1986). The purification of mouse monoclonal antibodies from ascitic fluid. *J. Immunol. Methods*, **91**: 231-235.
- [195] NEUBERGER, M.S.; G.T. WILLIAMS and R.O. FOX (1984). Recombinant antibodies possessing novel effector functions. *Nature*, **312**: 604-608.
- [196] NEUBERGER, M.S.; G.T. WILLIAMS; E.B. MITCHELL; S.S. JOUHAL; J.G. FLANAGAN and T.H. RABBITTS (1985). A hapten-specific chimeric IgE antibody with human physiological effector function. *Nature*, **314**: 268-270.
- [197] NILSSON, K.; W. SCHEIDER; H.W.D. KATINGER and K. MOSBACH (1986). Production of monoclonal antibodies by agarose-entrapped hybridoma cells. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), **121**: 352-360. Academic Press (Nueva York).
- [198] NORMANN, S.J.; R.F. JAEGER and R.T. JOHNSEY (1969). Pathology of experimental enterotoxemia. The "in vitro" localization of staphylococcal enterotoxin B. *Lab. Invest.*, **20**: 17-25.
- [199] NOSKOVA, V.P.; Y.V. EZEPCHEUK and A.N. NOSKOV (1984). Topology of the functions in molecules of staphylococcal enterotoxin type A. *Int. J. Biochem.*, **16**: 201-206.
- [200] NOTEBOOM, W.D.; K.E. KNURR; H.S. KIM; W.G. RICHMOND; A.P. MARTIN and M.L. VORBECK (1984). An ELISA for screening hybridoma cultures for monoclonal antibodies against a detergent solubilized integral membrane protein. *J. Immunol. Methods*, **75**: 141-148.
- [201] NOTERMANS, S.; M.L. VERJANS; J. BOL and H. SCHOTHORST (1978). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of Staphylococcus enterotoxin type B. *Health Lab. Sci.*, **15**:

28-31.

- [202] OI, V. T. and L.A. MERZENBERG (1980). Immunoglobulin-producing hybrid cell lines. En "Selected Methods in Cellular Immunology" (Eds. B.B. MISHEL and S.H. SHIIGI), pp. 351-372, Freeman (San Francisco).
- [203] OI, V.T.; P.P. JONES; J.W. GOOING; L.A. MERZENBERG and L.A. MERZENBERG (1978). Properties of monoclonal antibodies to mouse Ig allotypes, H-2 and Ia antigens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 81: 115-129.
- [204] OKADA, Y. (1962). Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascites tumor cells. I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. *Exp. Cell Res.*, 26: 98-107.
- [205] ORDEN, J.A.; J. GOYACHE; J.L. BLANCO; F.J. HERNANDEZ; A. DOMENECH; G. SUAREZ and E. GOMEZ-LUCIA (1989). Growth of Staphylococcus aureus and synthesis of enterotoxins in home-made yoghurt. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 189: 16-20.
- [206] PARSONNET, J.; Z.A. GILLIS; M.R. THOMPSON; L. ADINOLFI and P.F. BONVENTRE (1989). Effects of monoclonal antibody on biologic function of Toxic Shock Syndrome Toxin 1 in vitro and in vivo. *Reviews of Infectious Diseases*, 11: S318-S319.
- [207] PATEL, R. and J.C. BROWN (1984). Hybridoma preservation at -70°C: a simple and economical procedure for the short-term storage and individual recovery of hybridomas. *J. Immunol. Methods*, 71: 211-215.
- [208] PAYNE, Jr., W.J.; D.L. MARSHALL; R.K. SHOCKLEY and W.J. MARTIN (1988). Clinical laboratory applications of monoclonal antibodies. *Clinical Microbiol. Reviews*, 1: 313-329.
- [209] PERIMAN, P. (1970). IgG synthesis in hybrid cells from an antibody-producing mouse myeloma and an L cell substrain. *Nature*, 228: 1086-1087.
- [210] PETERFY, F.; P. XUUSELA and O. MAKELA (1983). Affinity requirements for antibody assays mapped by monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 130: 1809-1813.
- [211] PHILLIPS, A.P.; K.L. MARTIN and W.H. HORTON (1984). The choice of methods for immunoglobulin 19G purification: yield and purity of antibody activity. *J. Immunol. Methods*, 74: 385-393.
- [212] PLISZKA, A. and B. WINDYGA (1972). Detection of staphylococcal enterotoxin B in foods by immunofluorescence method. Part I. Detection. *Roczn. Pzh.*, 23: 565-574.
- [213] POTTER, M. and C.R. BOYCE (1962). Induction of plasma-cell neoplasms in strain BALB/c mice with mineral oil and mineral oil adjuvants. *Nature*, 193: 1086-1087.
- [214] RANSON, J.K. (1986). Endothelial cell growth supplements for promoting the growth of monoclonal antibody-producing hybridoma cells. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. VAN VUNAKIS), 121: 293-295, Academic Press (Nueva York).
- [215] RAYBOULD, T.J.G.; C.F. CROUCH; L.J. McDOUGALL and T.C. WATTS (1985). Bovine-murine hybridoma that secretes bovine monoclonal antibody of defined specificity. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 426-427.
- [216] READING, C.L. (1982). Theory and methods for immunization in culture and monoclonal antibody production. *J. Immunol. Methods*, 53: 261-291.

- [217] READING, C.L. (1986). *In vitro* immunization for the production of antigen-specific lymphocyte hybridomas. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 18-27. Academic Press (Nueva York).
- [218] RECK, B.; P.H. SCHEUBER; W. LONDONG; B. SÄLLER-KRAMER; K. BARTSCH and D.K. HAMMER (1988). Protection against the staphylococcal enterotoxin-induced intestinal disorder in the monkey by anti-idiotypic antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 3170-3174.
- [219] REID, L.C.M. (1979). Cloning. En "Methods in Enzymology. Cell Culture" (Eds. W.B. JAKOBY and I.H. PASTAN), 58: 152-164. Academic Press (Nueva York).
- [220] REISER, R.F.; D. CONWAY and H.S. BERGDOLL (1974). Detection of staphylococcal enterotoxin in food. Appl. Microbiol., 27: 83-85.
- [221] REISER, R.F.; R.N. ROBBINS; A.L. NOLTO; G.P. KHOE and H.S. BERGDOLL (1984). Identification, purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C₃. Infect. Immun., 45: 625-630.
- [222] REUVENY, S.; D. VELEZ; J.D. MADMILLAN and L. MILLER (1986). Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. J. Immunol. Methods, 86: 53-59.
- [223] RITS, M.; F. CORMONT; H. BAZIN; R. MEYKENS and J.P. VAERHAN (1986). Rat monoclonal antibodies. VI. Production of IgA secreting hybridomas with specificity for the 2,4-dinitrophenyl (DNP) hapten. J. Immunol. Methods, 89: 81-87.
- [224] ROBBINS, R.N. and H.S. BERGDOLL (1984). Production of rabbit antisera to the staphylococcal enterotoxins. J. Food Prot., 47: 172-176.
- [225] ROBBINS, R.N.; S. GOULD and H.S. BERGDOLL (1974). Detecting the enterotoxigenicity of ~~Staphylococcus aureus~~ strains. Appl. Microbiol., 28: 946-950.
- [226] ROEDER, J.C.; S.P.C. COLE and D. KOZBOR (1986). The EBV-hybridoma technique. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 140-167. Academic Press (New York).
- [227] ROGERS, T.J. and K. O'DAY (1981). A rapid and highly sensitive method of identifying lymphocyte hybridomas by electrophoresis of glucose-phosphate isomerase isozymes. Analytical Biochemistry, 116: 389-392.
- [228] ROIZMAN, B. (1962). Polykaryocytosis induced by viruses. Proc. Natl. Acad. Sci., 48: 228-234.
- [229] RUSSO, C.; L. CALLEGARO; E. LANZA and S. FERRONE (1983). Purification of IgG monoclonal antibody by caprylic acid precipitation. J. Immunol. Methods, 65: 269-271.
- [230] SANCHEZ-MADRID, F. and T.A. SPRINGER (1986). Production of syrian and armenian hamster monoclonal antibodies of defined specificity. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 239-244. Academic Press (Nueva York).
- [231] SCOTT, D.F.; G.K. BEST; J.M. KLING; M.R. THOMPSON; L.E. ADINOLFI and P.F. BONVENTRE (1989). Passive protection of rabbits infected with Toxic Shock Syndrome by monoclonal antibody to Toxic Shock Syndrome Toxin 1. Reviews of ~~Staphylococcus aureus~~ Infectious Diseases, 11: S214-S218.

12321 SCHAEFF, M.H. and S. ROBERTS (1981). Present status and future prospects for the hybridoma technology. *In Vitro*, 17: 1072-1077.

12322 SEHNE-IBARRA, O.A.; W.-O. PAN; R. WILSNACK and M. STRAND (1983). Rapid screening of monoclonal antibodies: new H-antigenic radioimmunoassay. *J. Immunol. Methods*, 58: 285-292.

12323 SEHNE-IBARRA, J.V. and L. SPEDS (1983). The complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin C. *J. Biol. Chem.*, 258: 6300-6305.

12324 SEHNE-IBARRA, M. and P. ANDERSEN (1984). Effects of bovine serum albumin on antibody generation by the enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods*, 72: 251-259.

12325 SEHNE-IBARRA, M.; J.J. HARTMAN; R. MELBRACK; J. MULSINTVELD; S. NOTERMANS; I.H. SCHAFFERS and R. ZSCHALER (1983). A collaborative study comparing three ELISA systems for detecting ~~Staphylococcus aureus~~ enterotoxin A in sausage extracts. *J. Food Prot.*, 6: 680-684.

12326 SEHNE-IBARRA, J. and E.P. SOREN (1983). Human x mouse somatic cell hybrid clone secreting immunoglobulins of both parental types. *Nature*, 304: 444-447.

12327 SEHNE-IBARRA, J. and E.P. SOREN (1979). Pattern of immunoglobulin synthesis and assembly in a human-mouse somatic cell hybrid clone. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76: 2203-2207.

12328 SEIBERTON, J.D. and P.O. MOLT (1984). The ELISA-plateau assay for detection and enumeration of antibody-secreting cells. *J. Immunol. Methods*, 67: 37-44.

12329 SEIDMAN, J.; S.C. HERRISON and S.A. KABAT (1980). Formation of hybridoma clones in soft agarose: effect of pH and of sodium. *Somat. Cell Genet.*, 3: 435-441.

12330 SELKOVIC, M.; T.D. WELSH and G. KOHLER (1978). A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature*, 273: 269-270.

12331 SELVING, K. (1984). Human monoclonal antibodies. *British Medical Bulletin*, 40: 209-212.

12332 SELVING, S.; A.R. KINSFORD and S. EDWARDS (1966). Rapid, sensitive assay for staphylococcal enterotoxins and a comparison of serological methods. *Appl. Microbiol.*, 14: 1019-1023.

12333 SELVING, S.; S. EDWARDS; K. TALMAGE and G. GAROTTA (1965). A sensitive and quantitative microassay for the detection of mycoplasma contamination: inhibition of IL-2 dependent cell line proliferation. *J. Immunol. Methods*, 7: 85-92.

12334 SELVING, S.; G. EDWARDS and S. KORN (1984). Assay for the specificity of monoclonal antibodies in processed immunoelectrophoresis. *J. Immunol. Methods*, 72: 243-249.

12335 SELVING, S. and G. EDWARDS (1984). Anticorps monoclonaux en virologie. *Biofutur*, 11: 67-89.

12336 SELVING, S.; E.T. GRIFFIN; A.G. NYSTULBERG and J.F. METZGER (1976). Effect of single and double bond scission by trypsin on the structure and activity of staphylococcal enterotoxin C. *J. Biol. Chem.*, 251: 3380-3388.

12337 SELVING, S.; J.R. HARRER and J.F. METZGER (1973). Effect of single bond scission by trypsin on the structure and activity of staphylococcal enterotoxin B. *J. Biol. Chem.*, 248: 7289-7294.

12338 SELVING, S.; M.L. KOSIYAN; E. FISCHBERG and M.D. SERRA (1987). Generation of mutant monoclonal antibodies. In: *Methods of hybridoma formation* Eds. A.H. BARTAL and V. KILSHAUT, pp. 379-387. Plenum Press (New York, Jersey).

- [250] SPITZ, M. (1984). "Single-shot" intrasplenic immunization for the production of monoclonal antibodies. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUAKIS), 121: 33-41. Academic Press (Nueva York).
- [251] SPITZ, M.; L. SPITZ; R. THORPE and E. EUGUI (1984). Intrasplenic primary immunization for the production of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods*, 70: 39-43.
- [252] SRIKUMARAN, S.; A.J. GUIDRY and R.A. GOLODSBY (1983). Bovine x mouse hybridomas that secrete bovine immunoglobulin G. *Science*, 220: 522-524.
- [253] STAERZ, U.D. and M.J. BEVAM (1986). Hybrid hybridoma producing a bispecific monoclonal antibody that can focus effector T-cell activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 1453-1457.
- [254] STANKER, L.H.; M. VANDERLAAN and H. JUAREZ-SALINAS (1985). One-step purification of mouse monoclonal antibodies from ascites fluid by hydroxylapatite chromatography. *J. Immunol. Methods*, 76: 157-169.
- [255] STEINITZ, M. and E. KLEIN (1981). Human monoclonal antibodies produced by immortalization with Epstein-Barr virus. *Immunol. Today*, 2: 38-39.
- [256] STEINITZ, M.; G. KLEIN; S. KOSKIMIES and O. MAKEL (1977). EB-virus-induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature*, 269: 420-422.
- [257] STELMA, G.W. and M.S. BERGDOLL (1982). Inactivation of staphylococcal enterotoxin A by chemical modification. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 105: 121-126.
- [258] STEWARD, M.W. and A.H. LEW (1985). The importance of antibody affinity in the performance of immunoassays for antibody. *J. Immunol. Methods*, 78: 173-190.
- [259] STORCH, M.-J. and H.-L. LOHMANN-HATTHES (1984). A new and rapid method for immunoglobulin class and subclass determination of mouse monoclonal antibodies using a solid-phase immunoradiometric assay. *J. Immunol. Methods*, 68: 305-309.
- [260] STROSBERG, A.D.; J.J. COLLINS; P.H. BLACK; D. MALAMUD; S. WILBERT; K.J. BLOCH and E. HABER (1974). Transformation by simian virus 40 of spleen cells from a hyperimmune rabbit: demonstration of production of specific antibody to the immunizing antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71: 263-264.
- [261] STYA, M.; R. WAHL and W.H. BEIERWALTES (1984). Dot-based ELISA and RIA: two rapid assays that screen hybridoma supernatants against whole live cells. *J. Immunol. Methods*, 73: 75-81.
- [262] SUGIYAMA, K. and T. HAYASHI (1965). Abdominal viscera as site of emetic action for staphylococcal enterotoxin in the monkey. *J. Infect. Dis.*, 113: 330-336.
- [263] SURESH, M.R.; A.C. CUELLO and C. MILSTEIN (1984). Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUAKIS), 121: 210-228. Academic Press (Nueva York).
- [264] TAGGART, R.T. and I.M. SAMLOFF (1983). Stable antibody-producing murine hybridomas. *Science*, 219: 1228-1230.
- [265] TAKAHASHI, M.; S.A. FULLER and J.G.R. MURREL (1987). Production of IgG-producing hybridomas by in vitro stimulation of murine spleen cells. *J. Immunol. Methods*, 96: 247-253.

- [2662] THARAKAN, J.P.; A. LUCAS and P.C. CHAU (1986). Hybridoma growth and antibody secretion in serum supplemented and low protein serum-free media. *J. Immunol. Methods*, **94**: 225-235.
- [2671] WATCHEE, F.S. (1968). Food borne bacterial toxins. *Can. Med. Assoc. J.*, **96**: 582-590.
- [2681] THOMPSON, W.E.; M.S. BERGDOLL; R.F. MEYER; R.W. BENNETT; L. MILLER and J.C. MACKILLAN (1985). Monoclonal antibodies to the enterotoxins and to the Toxic Shock Syndrome Toxin produced by *Staphylococcus aureus*. In "Monoclonal antibodies against bacteria" (Eds. A.J.L. MACARIO and E.G. de MACARIO), **2**: 23-59. Academic Press (New York).
- [2692] THOMPSON, W.E.; M.J. KETTERHAGEN and M.S. BERGDOLL (1984). Monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxin B and C: cross-reactivity and localization of epitopes on tryptic fragments. *Infect. Immun.*, **51**: 281-285.
- [2736] THOMPSON, W.E.; M. RAZDAN; G. KUMTSMANN; J.M. ASCHENBACH; M.L. EVENSON and M.S. BERGDOLL (1985). Detection of staphylococcal enterotoxins by enzyme-linked immunosorbent assays and radioimmunoassays: comparison of monoclonal and polyclonal antibody systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**: 885-890.
- [2751] TIFFE, A.T. (1987). Monoclonal antibodies and their use in microbiology. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement*, pp. 1278-1295.
- [2772] TOWLE, M.; T. STAEHELIN and J. GORDON (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**: 4350-4354.
- [2773] TWETEN, R.K. and J.J. LANGDOL (1981). Purification and partial characterization of a putative precursor to staphylococcal enterotoxin B. *Infect. Immun.*, **34**: 900-907.
- [2774] TWETEN, R.K. and J.J. LANGDOL (1983). Transport and processing of staphylococcal enterotoxin B. *J. Bacteriol.*, **153**: 297-303.
- [2775] UNDERWOOD, P.A. (1986). Removal of bovine immunoglobulin from serum in hybridoma culture media using protein A. In "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGDOL and M. Van VLIET), **121**: 301-306. Academic Press (New York).
- [2783] UNDERWOOD, P.A. and P.A. BEAN (1985). The influence of methods of production, purification and storage of monoclonal antibodies upon their observed specificities. *J. Immunol. Methods*, **88**: 189-197.
- [2777] VATTAKATIS, J.; J.B. ROBBINS; E. NISSENBLAG and G.T. ROSS (1971). A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. Clin. Endocrinol.*, **33**: 988-991.
- [2788] VEIT, B. and J.G. MICHAELE (1973). Characterization of an immunosuppressive factor present in mouse serum. *J. Immunol.*, **111**: 341-351.
- [2799] WELLS, D.; S. ROUVENY; L. MILLER and J.C. MACKILLAN (1986). Kinetics of monoclonal antibody production in low serum growth medium. *J. Immunol. Methods*, **89**: 45-52.
- [2809] WALKER, M.Z.; J. ZIBSON; S.M. AXIAR and R.L. PRENTICE (1986). Potentiation of hybridoma production by the use of mouse fibroblast conditioned media. *J. Immunol. Methods*, **88**: 75-81.
- [2811] WELLS, D.E. and W.F. BISH (1986). A method for freezing hybridoma clones in 96-well microculture plates. In "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part I. Hybridoma

- Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 417-422. Academic Press (Nueva York).
- [282] WELLS, D.E. and P.J. PRICE (1983). Simple rapid methods for freezing hybridomas in 96-well microculture plates. *J. Immunol. Methods*, 59: 49-52.
- [283] WELLS, D.E.; M.W. REEVES; R.M. MCKINNEY; L.M. GRAVES; O. OLSVICK; T. BERGAN and J.C. FEELEY (1987). Production and characterization of monoclonal antibodies to Toxic Shock Syndrome Toxin 1 and use of a monoclonal antibody in a rapid, one-step enzyme-linked immunosorbent assay for detection of picogram quantities of Toxic Shock Syndrome Toxin 1. *J. Clinical Microbiol.*, 25: 516-521.
- [284] WESTERMOUDT, R.J. (1985). Improved fusion methods. IV. Technical aspects. *J. Immunol. Methods*, 77: 181-196.
- [285] WESTERMOUDT, R.J. (1986). Factors affecting production of monoclonal antibodies. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part 1. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 3-18. Academic Press (Nueva York).
- [286] WESTERMOUDT, R.J.; J. BLOM; A.M. NAIPAL and J.J. Van ROOD (1983). Improved fusion technique. I. Human umbilical cord serum, a new and potent growth promoter compared with other B cell and hybridoma activators. *J. Immunol. Methods*, 62: 59-67.
- [287] WESTERMOUDT, R.J.; A.M. NAIPAL and C.H.H. HARRISON (1984). Improved fusion technique. II. Stability and purity of hybridoma clones. *J. Immunol. Methods*, 68: 89-101.
- [288] WITTE, P.L. and R. BER (1983). Improved efficiency of hybridoma ascites production by intrasplenic inoculation in mice. *Journal of National Cancer Institute*, 70: 575-577.
- [289] WITTE, P.L. and R. BER (1986). Production of ascites and rescue of hybridomas by intrasplenic inoculation. En "Methods in Enzymology. Immunochemical Techniques. Part 1. Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies" (Eds. J.L. LANGONE and H. Van VUNAKIS), 121: 381-385. Academic Press (Nueva York).
- [290] WOJCHOWSKI, D.H. and A.J. SYTKOWSKI (1986). Hybridoma production by simplified avidin-mediated electrofusion. *J. Immunol. Methods*, 90: 173-177.
- [291] YARMUSH, M.L.; F.T. GATES III; D.R. WEISFOGEL and T.J. XINDT (1980). Identification and characterization of rabbit-mouse hybridomas secreting rabbit immunoglobulin chains. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 2899-2903.
- [292] YELTON, D.E.; B.A. DIAMOND; S.-P. KWAN and M.D. SCHARFF (1978). fusion of mouse myeloma and spleen cells. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.*, 81: 1-7.
- [293] ZIMMERMANN, U. (1987). Electrofusion of cells. En "Methods of hybridoma formation" (Eds. A.H. BARTAL and Y. HIRSHAUT), pp. 97-149, Humana Press (Nueva Jersey).
- [294] ZIMMERMANN, U.; P. SCHEURICH; G. PILWAT and R. BENZ (1981). Cells with manipulated functions: new perspectives for cell biology, medicine, and technology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 20: 325-344.
- [295] ZIMMERMANN, U.; J. VIENKEN and G. PILWAT (1982). Electric-field-induced fusion of cells. *Studia Biophysica*, 90: 177-184.
- [296] ZOLA, M. and D. BROOKS (1982). Techniques for the production and characterization of

monoclonal hybridoma antibodies. En "Monoclonal hybridoma antibodies: techniques and applications" (Ed. J.G.R. MURRELL), pp. 1-57, CRC Press (Florida).