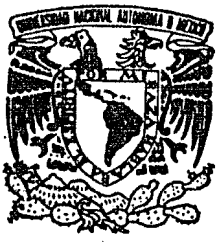


17
2 E

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES - CUAUTITLAN



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

SECCION DE EXAMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

VALORES DE REFERENCIA EN POBLACION
PEDIATRICA PARA PROTEINAS SERICAS DEL TIPO
IgG, IgA, IgM, C3 Y C4 POR NEFELOMETRIA DE
RAYO LASER

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ELIA GRANADOS ENRIQUEZ

DIRECTOR DE TESIS
Q. F. B. MARIA LOPEZ ROMAN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

#pag.

CAPITULO 1.- INTRODUCCION

- 1.1.- Papel, desarrollo, e importancia de la determinación de IgG, IgA, IgM, C3 y C4 en el diagnóstico ----- 1
- 1.2.- Métodos de cuantificación de IgG, IgA, IgM, C3-C4 ----- 6
- 1.3.- Antecedentes Históricos del Método nefelométrico laser ----- 9
- 1.4.- Fundamento del sistema nefelométrico laser----- 11
- 1.5.- Estándares de referencia ----- 16

CAPITULO 2.- OBJETIVOS ----- 17

CAPITULO 3 .-MATERIALES Y METODOS

- 3.1.- Grupos de estudio ----- 18
- 3.2.- Aparatos y reactivos ----- 19
- 3.3.- Operaciones del procedimiento ----- 21
- 3.4.- Métodos estadísticos ----- 24

CAPITULO 4.- RESULTADOS

- 4.1.- Curvas de calibración ----- 26
- 4.2.- Exactitud y sensibilidad del método nefelométrico laser ----- 36
- 4.3.- Precisión del método nefelométrico laser ----- 37
- 4.4.- Valores de referencia.- Niveles de IgG, IgA, IgM, C3 y C4 por edad ----- 38

CAPITULO 5.- DISCUSION ----- 49

CAPITULO 6.- CONCLUSIONES ----- 53

CAPITULO 7.- BIBLIOGRAFIA ----- 54

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	anticuerpo.
Ag	antígeno.
C.M.N.	Centro Médico Nacional.
C3	factor #3 del complemento sérico humano.
C4	factor #4 del complemento sérico humano.
C.V.	coeficiente de variación.
d.e.	desviación estandar.
Est.	estandar.
g	Fuerza centrífuga relativa.
I	Intensidad en voltios.
IDR	Inmunodifusión radial.
IgA	inmunoglobulina tipo A humana.
IgG	inmunoglobulina tipo G humana.
IgM	inmunoglobulina tipo M humana.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ONS	Servicio de Oído-Nariz y Garganta.
U.I.	Unidades Internacionales.

I N T R O D U C C I O N

1.1 .- PAPEL, DESARROLLO E IMPORTANCIA DE LA DETERMINACION DE INMUNOGLOBULINAS (I_GG, I_GA, I_GM, C₃ y C₄) EN EL DIAGNOSTICO CLINICO.

1.1.1 .- INMUNOGLOBULINAS.- La Inmunología estudia los mecanismos que permiten al huésped proteger su medio interno frente a sustancias que se identifican como extrañas, producidas dentro del propio huésped o introducidas del ambiente externo. Por tanto la respuesta inmune específica se relaciona con la identificación del carácter extraño, en forma altamente específica. La reacción entre las proteínas sintetizadas por el huésped y la configuración extraña (conocida como antígeno) depende de las características de ésta (tamaño, estructura y -- cantidad) y de las del huésped (edad, constitución, genética). La respuesta inmune depende de dos tipos de mecanismos efectivos:

1).- Intervención de proteínas producidas por células plasmáticas, llamadas anticuerpos, inmunoglobulinas o gammaglobulinas; y de sustancias que potencian su acción (RESPUESTA HUMORAL).

2).- Intervención directa de células (RESPUESTA CELULAR).

Así un anticuerpo (Ac) reacciona con la configuración que dif -

lugar a su producción. En el hombre, los anticuerpos corresponden - a cinco clases principales de proteínas, denominadas IgG, IgA, IgM, - IgE e IgD (1)(3)(12)(29).

Por otro lado, dado que el feto recibe de la madre las inmunoglobulinas del tipo IgG(ya que la barrera placentaria no permite el - paso de las otras inmunoglobulinas), ésta provisión de inmunoglobulinas), es la única protección que posee contra las infecciones(3)-(30). Solo en el curso de las primeras semanas y meses de vida se - forasan por el propio lactante IgA, IgM, e IgG, evolucionando con la edad, hasta alcanzar las concentraciones del adulto. La rapidez con que se alcanzan estos niveles dependen de la clase de inmunoglobulina y de los estímulos antigénicos apropiados(24).

Aunque la capacidad de síntesis de inmunoglobulinas está determinada por el potencial genético(que parece ser el mismo para los varios grupos raciales), las diferencias que se observan entre diversas poblaciones, se explican basandose en VARIACIONES EN EL RIESGO- DE INFECCION(24).

La mayor parte de la información sobre el desarrollo de las inmunoglobulinas se ha derivado de estudios realizados en otros países, conociendose poco sobre el fenómeno en México.

Junto con el historial clínico, las determinaciones de IgG, IgA, - IgM, tienen utilidad en los siguientes parámetros :

- Determinación temprana de un proceso infeccioso.
- Seguimiento o monitoreo del desarrollo de una enfermedad infecciosa en un paciente.

-- Evaluar la inmunidad humoral en casos de inmunodeficiencias.

Para éstos propósitos es extremadamente importante disponer de los valores de referencia que se pueden aplicar a la práctica clínica rutinaria.

1.1.2.- EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO.- El sistema del complemento (C), es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo. Consiste de cuando menos 19 proteínas séricas con actividad enzimática y tres reguladoras de su actividad, química e inmunológica, que son capaces de actuar de manera recíproca una con otra, con el anticuerpo y con las membranas celulares. Estas acciones recíprocas conducen a la generación de la actividad biológica. Las secuelas biológicas de la activación de éste sistema fluctúan desde la lisis de diferentes clases de células, bacterias y virus, hasta la mediación directa de los procesos inflamatorios. Además el complemento está capacitado para atraer otros sistemas efectores humorales y celulares, conseguir participación de ellos induciendo la liberación de histamina de las células cebadas, la emigración dirigida de los leucocitos, la fagocitosis y la liberación de los constituyentes lisosómicos de los fagocitos.

Las proteínas individuales de éste sistema se encuentran normalmente en la circulación como moléculas precursoras inactivas. En conjunto ellas comprenden alrededor de 15% (p/p) de la fracción globulínica del plasma. Las moléculas precursoras nativas se designan con símbolos numéricos: C1, C2, C3, etc. o en el caso de algunos componentes por símbolos o nombres triviales: Properdina, factor B, Factor D, etc. Cada componente debe ser activado sucesivamente en condiciones apropiadas para que progrese una reacción del complemento (3)(12).

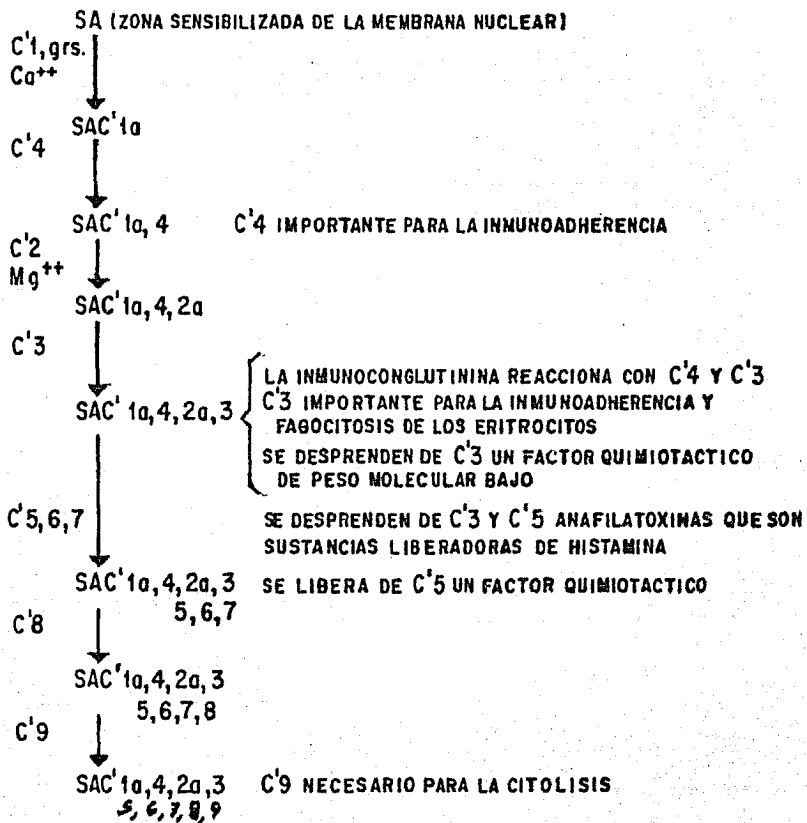


Fig. 1.- FUNCIONES BIOLÓGICAS DEL COMPLEMENTO

En cuanto a su desarrollo por edad, existe poca información (hasta el momento), sin embargo reportes previos (16)(28), revelan concentraciones mínimas al nacimiento y un desarrollo rápido desde el primer año de vida, alcanzándose prácticamente durante éste, los niveles adultos.

Se ha descrito la disminución en la concentración del complemento en suero, en una diversidad de enfermedades, pudiéndose deber a cualquiera de los factores siguientes o a una combinación de los mismos (12): 1.- Consumo del complemento por la formación in vivo de complejos antígeno-anticuerpo, 2.- Disminución en la síntesis del complemento, 3.- Aumento del catabolismo del complemento, 4.- Formación de un inhibidor.

Aunque los niveles del complemento estén elevados en diversas enfermedades, el significado de ésta observación no ha sido aclarado todavía. El mecanismo más verosímil es su síntesis acelerada.

Junto con el historial clínico, las determinaciones de C3 y C4 -- tienen utilidad en los siguientes parámetros:

- Identificar inmunodeficiencia a éstos componentes.
- En su alteración en inmunopatologías por depósito de complejos inmunes.
- Apoyo al diagnóstico de enfermedades asociadas a concentraciones elevadas del complemento en el suero.
- En rechazos de aloinjertos.

1.2 .- MÉTODOS DE CUANTIFICACION DE INMUNOGLOBULINAS, C3 y C4.

1.2.1 .- INMUNODIFUSION RADIAL.

En 1965 Mancini (12) introdujo una técnica nueva empleando la difusión sola para la determinación cuantitativa de los antígenos. Está basada en el principio de que existe una relación cuantitativa entre la cantidad de antígeno colocado en un pozo horadado sobre la placa de agar-anticuerpo y el anillo resultante de precipitación.

En el método descrito originalmente por Mancini el área circunscrita por el anillo de precipitación era proporcional a la concentración del antígeno. Este método de viraje requiere que los anillos de precipitación alcancen el mayor tamaño posible, lo cual a menudo requiere de 48-72 horas de difusión. Alternativamente, el método de difusión radial única de Fehey (12) permite la medición de los anillos antes del desarrollo completo. En esta modificación, el logaritmo de la concentración del antígeno es proporcional al diámetro del anillo.

Se determina la curva patrón con estandares de antígenos conocidos y la ecuación que describe ésta curva puede ser usada para la determinación de la concentración del antígeno correspondiente a cualquier tamaño de diámetro: $\text{Log } C = \frac{D - D_0}{K}$

donde C = concentración de antígeno

D_0 = distancia del origen.

D = diámetro del anillo.

K = pendiente de la línea.

La sensibilidad de éstos métodos es del orden de 1-3 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno(2)(12).

1.2.2.- INMUNOFLUORESCENCIA CUANTITATIVA.

Los análisis inmunológicos cuantitativos empleando antígenos y anticuerpos marcados con fluorocromo han sido desarrollados recientemente(37). La cantidad de luz en una onda determinada de longitud emitida a partir de una muestra fluorescente puede medirse con precisión mediante un microfluorómetro. Los sistemas de análisis fluorescente(FIAX) pueden ser usados para medir IgG, IgA, IgM, C3 y C4 y los anticuerpos anti nucleares y anti-DNA. La medición de las inmunoglobulinas, C3 y C4 se hacen mediante el enlace competitivo del anticuerpo específico marcado con el antígeno libre y de fase sólida, mientras que la inmunoglobulina ligada se fija a la superficie hidrofóbica polimérica. La cantidad de anticuerpo fluorescente ligado al antígeno de fase sólida se mide con un fluorómetro especialmente diseñado y convertido a mg/ml con referencia a una curva estándar. La sensibilidad del método se reporta como menos de un picogramo/100 ml(12)(30).

1.2.3.- ANALISIS INMUNITARIO ENZIMATICO CUANTITATIVO(ELISA).

Ha surgido, recientemente, una técnica cuantitativa para la detección de antígenos, haptenos y anticuerpos. Todos emplean enzimas diversas ligadas al antígeno o al anticuerpo como una etiqueta que puede ser hallada con facilidad mediante la medición de la actividad enzimática, el análisis ELISA puede ser empleado para medir antígenos o anticuerpos(12).

Para medir el antígeno, el anticuerpo se enlaza a una fase sólida, se añade una solución de prueba que contiene antígeno y luego un segundo anticuerpo marcado con enzima. Esta prueba

requiere cuando menos que dos sitios de combinación estén presentes sobre el antígeno. Luego se añade el sustrato y se relaciona la actividad enzimática con la concentración del antígeno.

Las ventajas de los inmunoanálisis enzimáticos incluyen la -- sensibilidad (en el orden de ng/ml), su simplicidad y equipo relativamente barato.

1.2.4.- NEFELOMETRIA.

La nefelometría es un método simple y rápido para la medición de muchos antígenos en líquidos biológicos, y se refiere a la medición de la turbidez o nebulosidad de un líquido. La determinación se realiza por la adición de cantidades constantes de anticuerpo específico altamente purificado y ópticamente claro a cantidades variables de antígeno. Los complejos antígeno-anticuerpo resultantes y preparados en celdas especiales, se colocan frente a un haz de luz y el grado de dispersión de luz es medido en una celda fotoeléctrica, relacionándose éste, directamente con la -- concentración del complejo antígeno-anticuerpo en solución (9) - (11)(23)(32)(34) mediante una curva estándar(12).

La sensibilidad reportada para éste método es de un $\mu\text{g/ml}$ (11) (12)(30).

1.3 .- ANTECEDENTES HISTORICOS DEL METODO NEFELOMETRICO.

Nefelometría es la medición de la turbidez o nebulosidad de un líquido. En solución, la reacción entre el antígeno y el anticuerpo producen turbidez que puede medirse por la dispersión de una luz incidente.(12)(15).

El método nefelométrico se ha descrito desde 1914, pero los resultados obtenidos con la instrumentación de la época disminuyen en su uso(4).

Desde 1940 los métodos de difusión de luz han sido utilizados en Inmunología y el número de procedimientos descritos han ido aumentando(4). Así en 1947 Bayden mostró la curva de precipitación midiendo la turbiedad desarrollada en mezclas de antígeno y anticuerpo(18).

En 1950Schultze y Suhwich describieron mediciones turbidimétricas de varias proteínas plasmáticas(18). Ritchie, también en los 50as., desarrolló métodos para la cuantificación de albúmina e inmunoglobulinas totales en soluciones diluidas y sugiere que éstos procedimientos pueden ser adaptados a la estimación de IgG, IgA, - IgM en suero humano(18).

Bajo éstos mismos procedimientos Alper adaptó la técnica de Bayden para la cuantificación de tres componentes del complemento en suero humano(33).

En 1967 algunos reportes demostraron la eficacia de éste método en cuantificaciones inmunoquímicas de soluciones a baja concentración(4), por lo cual las operaciones principales y características del sistema nefelométrico pueden ahora ser descritas(4).

Más recientemente estudios hechos por Buffone, Hrintges, Savoy y Killingworth (4)(6)(18), involucran la cuantificación de inmuno

globulinas utilizando un laser como fuente de luz en las cuantificaciones nefelométricas pudiendo ser " empleado para el desarrollo de un método sensible para cuantificaciones de albumina e inmunoglobulinas en suero y líquido cefalorraquídeo.... vía difusión de luz" (6)(8)(19)(33).

Posteriormente en el Laboratorio Nacional de Ochridge, en la Universidad de Carolina del Norte y un grupo de los Laboratorios Hayland-Travenol dieron a conocer un instrumento nefelométrico laser (33) cuya fuente de luz es un laser de Helio-Neón, con el sistema mencionado se puede detectar un número muy grande de antígenos usando el principio de dispersión de luz. Actualmente se están estudiando nuevas aplicaciones de la nefelometría laser(11).

1.4.- FUNDAMENTO DEL SISTEMA NEFELOMETRICO.

1.4.1.- FUNDAMENTO QUIMICO .- El sistema tiene como fuente de luz un laser Helio-Neón con una longitud de onda de 632.8 nm, el rayo pasa a través de una barrera óptica hacia la celda en donde se encuentran las partículas(complejos inmunes) que van a ser cuantificadas, la luz espercida por ellas es dirigida por un -- sistema de lentes hacia un fotodetector(5)(11)(23). El rayo laser es monocromático, unidireccional y extremadamente intenso(11).

EFFECTO DE LA CONCENTRACION EN LA DIFUSION.-

En una suspensión diluida la difusión de un haz de radiación se da por la siguiente relación : $I_{\alpha} = K_{\alpha} C I_0$; donde K es una constante empírica para el sistema y dada en el ángulo α de medida; C es la concentración de las partículas dispersantes; I_{α} es la intensidad de luz desviada medida al ángulo dado e I_0 es la intensidad inicial del haz. En estas circunstancias, se puede establecer que: La intensidad de luz desviada es proporcional a la concentración de partículas dispersantes en la muestra(9)(11).

1.4.2 .- FUNDAMENTO INMUNOLOGICO.

1.4.2.1 .- PAPEL DE LOS COMPLEJOS INMUNES .- Cuando un rayo de luz penetra en un líquido en donde se encuentren en suspensión partículas coloidales, éste sufrirá una desviación con respecto al ángulo de incidencia y dependiendo de las características físicas(forma y tamaño) de las partículas, será el comportamiento de la desviación luminosa. Si la partícula tiene un diámetro menor a la longitud de onda, la desviación

de la luz se efectuará hacia todas direcciones(ley de Rayleigh) (32), si el rayo incidente tiene una longitud de onda aprox. igual o ligeramente menor al diámetro de la partícula, la mayor-

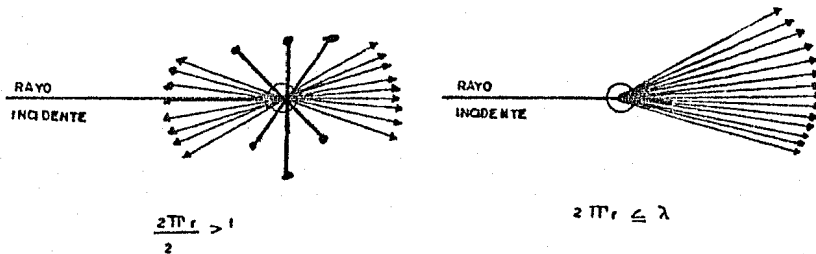


FIGURA No 2.- FORMAS DE DIFUSION SEGUN EL DIAMETRO DE PARTICULA.

parte de la luz se desviará hacia adelante(con respecto al ángulo del incidencia)(ley de Mie)(11).

En el caso de los complejos inmunes éstos estarán formados por las proteínas del suero o líquidos biológicos(líquido cefalorraquídeo, jugo gástrico, saliva, etc.) a cuantificar y el antígeno específico. Al incidir el laser sobre ellos éste modificará su trayectoria de acuerdo a la ley de Mie(debido al diámetro de dichos complejos.

1.4.2.2.- REACCIONES DE INMUNOPRECIPITACION Y CURVA DE HEIDELBERGER.

Una reacción de inmunoprecipitación ocurre cuando un suero -
inmune se pone en contacto con el antígeno inmunizante.

Las primeras observaciones fueron hechas alrededor del año-
de 1897, desde entonces muchos investigadores han desarrollado-
métodos analíticos en base a éstas observaciones, entre ellos -
se pueden citar a Erlich, Pauling, Nuttal, Landstainer y Heide-
lberger, éste último ocupa un lugar importante en ésta área(14)-
(30).

Las reacciones de inmunoprecipitación solo pueden ocurrir --
cuando las concentraciones de antígeno y anticuerpo están con--
troladas, el comportamiento inmunológico está descrito por una-
gráfica conocida como curva de Heidelberger(figura no. 3), y cu-
ya descripción es la siguiente: Si en una serie de tubos de en-
saye colocamos concentraciones aumentadas de antígeno y poste-
riormente agregamos una cantidad constante de anticuerpo a to--
dos, observamos que en los tubos de los extremos hay ausencia -
de precipitados, mientras que en los tubos centrales si lo pre-
sentan, los tubos de la izquierda presentan el fenómeno conoci-
do como exceso de anticuerpo, pues, el anticuerpo está muy con-
centrado en relación con el antígeno, los tubos de la derecha -
presentan una proporción de antígeno-anticuerpo muy alta y los-
tubos centrales presentan una proporción equivalente de Ag/Ac -
lo que permite lograr un máximo de precipitación(la proporción-
molar entre el antígeno y el anticuerpo varía en la equivalencia

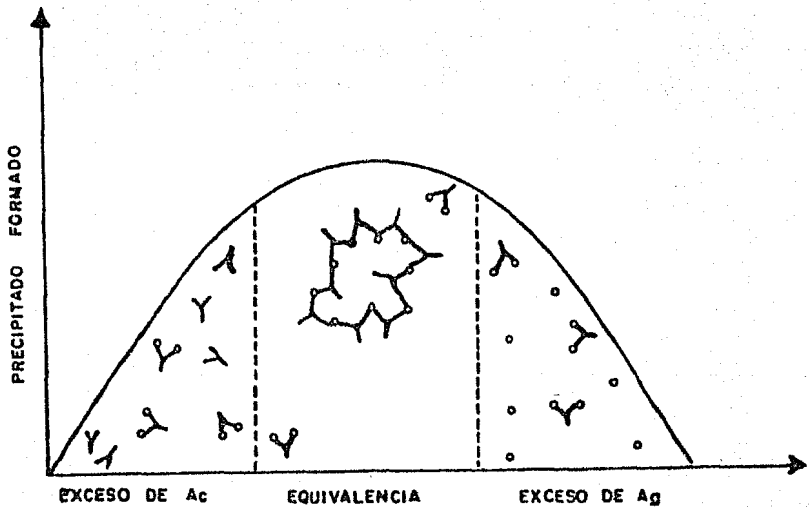


FIGURA No 3.- CURVA DE HEIDELBERGER

de acuerdo a la valencia del anticuerpo y con el número de determinantes antigénicos por molécula que hay en el antígeno)(14)(29)(30). En la zona de exceso de anticuerpo los antígenos son bloqueados a su totalidad quedando libre el anticuerpo el cual compete por los antígenos de tal forma que la precipitación no es óptima.

En la zona de exceso de antígeno los anticuerpos son bloqueados completamente evitando la formación de mallas entre antígeno

y anticuerpo, el sobrenadante queda casi exento de anticuerpo antigénico.

La zona de exceso de anticuerpo es la que se usa para las determinaciones por nefelometría laser puesto que en ésta zona se puede observar que el incremento de precipitado es proporcional a la concentración de antígeno en la muestra, cuando el anticuerpo es constante, obteniéndose por lo tanto valores de lectura más altos cuanto más altas sean las concentraciones antigénicas, (12).

Para asegurarnos que trabajamos en el exceso de anticuerpo, se fijan títulos altos de antisuero y se trabaja con bajas concentraciones del antígeno (diluciones).

Resumiendo; para el sistema nefelométrico se emplee como una buena técnica de cuantificación es requisito que las condiciones de trabajo se ajusten a los requisitos dados por el fundamento de la metodología esto es :

- a).- Trabajar con un tamaño de partícula adecuado.
- b).- Tener condiciones en exceso de anticuerpo.

1.5 .- ESTANDARES DE REFERENCIA.

Hasta ahora las concentraciones de las inmunoglobulinas, C3 y C4 han sido expresados siempre en mg/ml. Para controlar la -- confiabilidad de éstos valores, el laboratorio de referencia In ternacional de la Organización Mundial de la Salud(OMS) ha envia do una muestra de un suero seleccionado a 10 laboratorios pidién doles que dosificaran las inmunoglobulinas, C3 y C4 con sus prepa-- rados estandares. La relación entre los valores más elevados y - los más bajos fue extraordinariamente grande. Sin embargo utili zando el estandar(contraste o patrón) de referencia Internacional de la OMS, los factores respectivos descendieron. Con ello se -- hace comprensible la necesidad de utilizar un estandar único de referencia para alcanzar resultados confiables. Este estandar de referencia es en la actualidad el suero 67/86 de la OMS.

Cada ampollita contiene 81.47 mg de suero de referencia liofi-- lizado que por definición comprende a 100 Unidades Internaciona les(UI) de IgG, IgA, IgM, C3 y C4. Los estandares utilizados en és te trabajo están contrastados con el suero de referencia Internac ional 67/86 (5)(22)(31).

Los factores de conversión para las proteínas mencionadas son los siguientes :

1 mg de IgG	equivale a	11.5 UI de IgG (OMS).
1 mg de IgA	"	59.9 " IgA "
1 mg de IgM	"	115 " IgM "
1 mg de C3	"	128 " C3 "
1 mg de C4	"	320 " C4 " .

O B J E T I V O S

Debido a las características metodológicas descritas anteriormente, para el método nefelométrico, siendo este de reciente adquisición en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional-IMSS y considerando que antes de hacer uso del mismo es requisito de control de calidad evaluarlo, así como al introducirlo a de terminaciones rutinarias, obtener valores de referencia, puesto - que su uso de las concentraciones para IgG, IgA, IgM, C3 y C4 como - parámetros de diagnóstico implica un conocimiento previo de éstos en niños sanos, se procedió a diseñar el presente trabajo, planteándonos los siguientes objetivos:

2.1- Evaluar el método nefelométrico (Behring) laser en tres criterios de confiabilidad:

Exactitud

Presición

Sensibilidad

2.2- Establecer los valores de referencia, por nefelometría laser, para IgG, IgA, IgM, C3 y C4 en una población pediátrica sana.

MATERIALES Y METODOS

3.1.- GRUPOS DE ESTUDIO.

Se tomaron muestras de 138 niños, divididos en seis grupos por edades: 30 recién nacidos; 20 de 1-6 meses; 20 de 6-12 meses; 26 de 1-4 años; 21 de 4-8 años; 21 de 8-15 años, de la consulta externa del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional-IMSS, de los servicios de Oído-Nariz y Garganta, Labio-Paladar-Hendidado, Ortopedia y Cirugía Reconstructiva, con los siguientes criterios de selección :

- En ayunas.
- Sin padecimiento infeccioso durante la toma de muestra.
- Que no halla presentado proceso infeccioso, clínicamente detectable, por historia clínica o examen físico en un período de treinta días previos a la toma de muestra.
- Sin padecimiento inmunológico.
- Sin tendencia a presentar infecciones frecuentemente.
- Los recién nacidos se seleccionaron hasta de 24 horas de nacidos de madres sin antecedentes infecciosos e inmunológicos durante el embarazo y el parto.

3.1.1. - COLECCION Y MANEJO DE MUESTRAS.

Se tomaron 2 ml de sangre sin anticoagulante, colectada por punción venosa y de talón(en recién nacidos), dejándose reposar diez minutos, éstas muestras se centrifugan, para separar el suero, a 2100 g/10 min.(moderada hemólisis o lipemia leve no afec

tan los resultados(4)).

Después de separado el suero, se etiqueta en tubos 12X75mm, debidamente sellados y congelándose a -20°C , hasta el momento de su uso.

3.2.- APARATOS Y REACTIVOS.

NEFELOMETRO.- Se utilizó un nefelómetro de rayo laser(Behring) modulo I 27109/310 MESSER GRIESHEIM GMBH, con una emisión de 633 nm; con un ángulo de medición de 5° relativo a la posición con la muestra.

ESTANDARES.- Se usaron estandares comerciales Behring LN(lote 153226 C), con las siguientes indicaciones:

- IgG 11.35 mg/ml.
- IgA 0.96 mg/ml.
- IgM 0.96 mg/ml.
- C3 0.63 mg/ml.
- C4 0.125 mg/ml.

ANTISUEROS.- Se usaron antisueros específicos anti-cadena Humana para cada proteína(IgG,IgA,IgM,C3 y C4) Behring, provenientes de conejo su especificidad fue confirmada por inmunoprecipitación simple de Duchterlony, con el siguiente contenido:

- anti-IgG humana conteniendo 2.1 mg/ml lote 153017-A.
- anti-IgA humana conteniendo 2.4 mg/ml lote 153121-A.
- anti-IgM humana conteniendo 9.1 mg/ml lote 15321 -B.
- anti- C3 humana conteniendo 2.2 mg/ml lote 153310-F.
- anti- C4 humana conteniendo 3.4 mg/ml lote 153510-E.

CONTROLES.- Se utilizó suero control LN comercial(Behring) lote - 065112 conteniendo:

- IgG 11.78 mg/ml con un rango de variación de 1000-1355 mg/dl.
- IgA 2.4 mg/ml con un rango de variación de 204-276 mg/dl.
- IgM 0.95 mg/ml con un rango de variación de 78-106 mg/dl.
- C3 0.75 mg/ml con un rango de variación de 63.5-83.5 mg/dl.
- C4 0.18 mg/ml con un rango de variación de 15.3-20.7 mg/dl.

OTROS.- Se usaron celdas LN(Behrinwerke) 10105-E, especiales para determinaciones nefelométricas, rectangulares con un máximo de capacidad de un ml y un mínimo de 200 μ l. Nuevas y con un máximo de lectura de 0.25 V de Intensidad.

3.3 .- OPERACIONES DEL PROCEDIMIENTO .

- Encender el nefelómetro 15 minutos antes de iniciar la lectura.
- Medir la Intensidad de las celdas soles.
- Efectuar las diluciones, por duplicado, de los estándares, anti-sueros, controles y muestras con solución salina estéril (ver cuadro I y II).
- Pipetear en las celdas de reacción las cantidades adecuadas --- (ver cuadro I y II) del antisuero diluido y las diluciones de estándares, controles o muestras respectivas.
- Mezclar suavemente(evitando producir burbujas) y tapar.
- Incubar a temperatura ambiente durante una hora.
- Leer en el nefelómetro la Intensidad correspondiente.
- Sacar la diferencia entre el valor de la lectura final y la inicial(de la celda sola).
- Graficar en papel log-log I(v)/ concentración del estándar correspondiente, para obtener las curvas de calibración de cada una de las proteínas determinadas (verificar su correlación).
- Interpoler los valores en Intensidad de los controles y muestras en la curva correspondiente para obtener la concentración de éstos. (Si es posible efectuase la regresión lineal correspondiente y si la correlación es muy buena se puede interpolar en ella los valores de Intensidad de los controles y muestras obtenidos).

CUADRO I

Diluciones de los sueros estandares y antisueros para obtener las curvas de calibración de las proteínas determinadas.

PROTEINA	DIL. DEL SUERO ESTANDAR(V/V).	DIL. DEL ANTI SUERO (V/V) .	VOL. DEL SUERO EST. SIL.(μ l)	VOL. DEL ANTISUERO DIL.(μ l)
IgG	1:20	1: 5	10	200
	1:40			
	1:80			
	1:160			
	1:320			
1:640				
IgA	1:20	1:5	100	200
	1:40			
	1:80			
	1:160			
	1:320			
IgM	1:10	1:5	100	200
	1:20			
	1:40			
	1:80			
	1:160			
C3	1:10	1:5	100	200
	1:20			
	1:40			
	1:80			
	1:160			
C4	1:2.5	1:5	100	200
	1:5			
	1:10			
	1:20			
	1:40			
1:80				

Los volúmenes de cada una de las diluciones de antisueros específico más suero estandar se incuban una hora, leyendo el al nefelómetro las Intensidades correspondientes para así obtener las curvas de calibración de las 5 proteínas estudiadas.

CUADRO IIDiluciones de muestras y controles.

PROTEINA	DIL. DEL SUERO DEL PACIENTE Y CONTROLES. (v/v)	DILUCION DEL ANTISUERO (v/v)	*VOL. DEL SUERO DEL PACIENTE Y CONTROLES. (μ l)	*VOLUMEN DEL ANTISUERO ESPECIFICO. (μ l)
IgG	1:101	1:5	10	200
IgA, IgM, C ₃	1:101	1:5	100	200
C ₄	1:21	1:5	100	200
IgA, IgM en reacción ne- gativos.	1:2	1:5	100	200

* Los volúmenes del suero del paciente y controles diluidos se incuban con los volúmenes de antisuero específico correspondientes durante una hora, después de la cual se toman las lecturas de Intensi-
dad, en el nefelómetro, y se interpola éste valor en las curvas es-
tandares de las distintas proteínas, para obtener su concentración-
(mg/dl).

3.4 .- MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

3.4.1 .- ESTUDIO DE PRECISIÓN INTRA E INTERENSAYO DEL MÉTODO NEFELOMÉTRICO USADO (7).

Se determinó por la cuantificación de cada una de las proteínas (I_{G3} , I_{G1} , I_{G2} , C3 y C4) en el suero control, efectuados en series (por duplicado) un número de 15 veces en el mismo día (intraensayo) y un ensayo duplicado día a día hasta completar 15 ensayos (interensayo). La precisión se calculó mediante la media y la desviación estándar de los resultados obtenidos, en un rango de concentración fisiológicamente normal de cada una de las proteínas mencionadas. Se utilizó como medida de variación un COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%) = $\frac{\text{desviación estándar}}{\text{media arit.}} \times 100$, para los dos tipos de ensayo efectuados.

3.4.2 .- ESTUDIO DE EXACTITUD INTRA E INTERENSAYO DEL MISMO MÉTODO. (7).

Se obtuvo mediante 10 ensayos repetidos dobles del suero estándar para cada una de las proteínas determinadas, en un interensayo y un-intraensayo.

La exactitud se determinó mediante el uso de la media aritmética y desviación estándar de tres concentraciones distintas, de valor conocido uno alto uno medio y uno bajo. Se empleó como medida de exactitud el COEFICIENTE DE VARIACIÓN, calculándose de igual forma que en el estudio de precisión.

3.4.3 .- ANÁLISIS DE REGRESIÓN LINEAL.- Aplicado a los datos de las curvas de calibración (método de mínimos cuadrados). (21).

3.4.4.- COEFICIENTE DE CORRELACIÓN de Pearson.- Para verificar la buena linealidad de las curvas de calibración. (26).

3.4.5 -- METODOS ESTADISTICOS APLICADOS A LOS DATOS DE LOS VALORES DE LA POBLACION PEDIATRICA TRABAJADA.

- Analisis de Frecuencias, o Histogramas (10)(26) para visualizar mejor el comportamiento de la población estudiada por grupo de edad y para cada una de las proteínas determinadas.
- Intervalos de Confianza con un nivel de significancia igual al 95% (Media \pm 2 desviaciones estandaras) para las distintas proteínas en cada uno de los grupos (26). Utilizando la media aritmética en caso de comportamiento normal (distribución) y de la media geométrica en caso de que la distribución se aproximara a la normal.
- Analisis de Varianza.- Método de Fisher. utilizando un nivel de significancia del 5% (21). Para verificar si existe diferencia estadística entre cada uno de los valores promedio obtenidos en los diversos grupos de edad por cada una de las proteínas analizadas y así determinar si la concentración de cada una de las proteínas determinadas varían con la edad o si esas diferencias encontradas se debían únicamente al azar.
- Estudio para valorar los límites de confianza en el coeficiente de variación del estudio de precisión y exactitud. Regla de Tonk y del Colegio de Patólogos Americanos (7).

R E S U L T A D O S

4.1 .- CURVAS DE CALIBRACION.

PROTEINA ESTANDAR(1)	LECTURAS EN INTENSIDAD(V)	CONCENTRACION (mg/dl) DEL EST.
IgG	10.36	56.75
	5.87	28.37
	3.11	14.18
	1.30	7.09
	0.51	3.54
	0.32	1.77

Relación de lecturas I/conc. obtenidas por nefelometria para trazar la curva de calibración de IgG.

El coeficiente de correlación para estos valores es de 0.995. Efectuando la regresión lineal(mínimos cuadrados) de ellos, se puede también obtener las concentraciones de IgG de las muestras y controles sin recurrir a la curva de calibración gráfica.

CURVA DE CALIBRACION PARA IgG

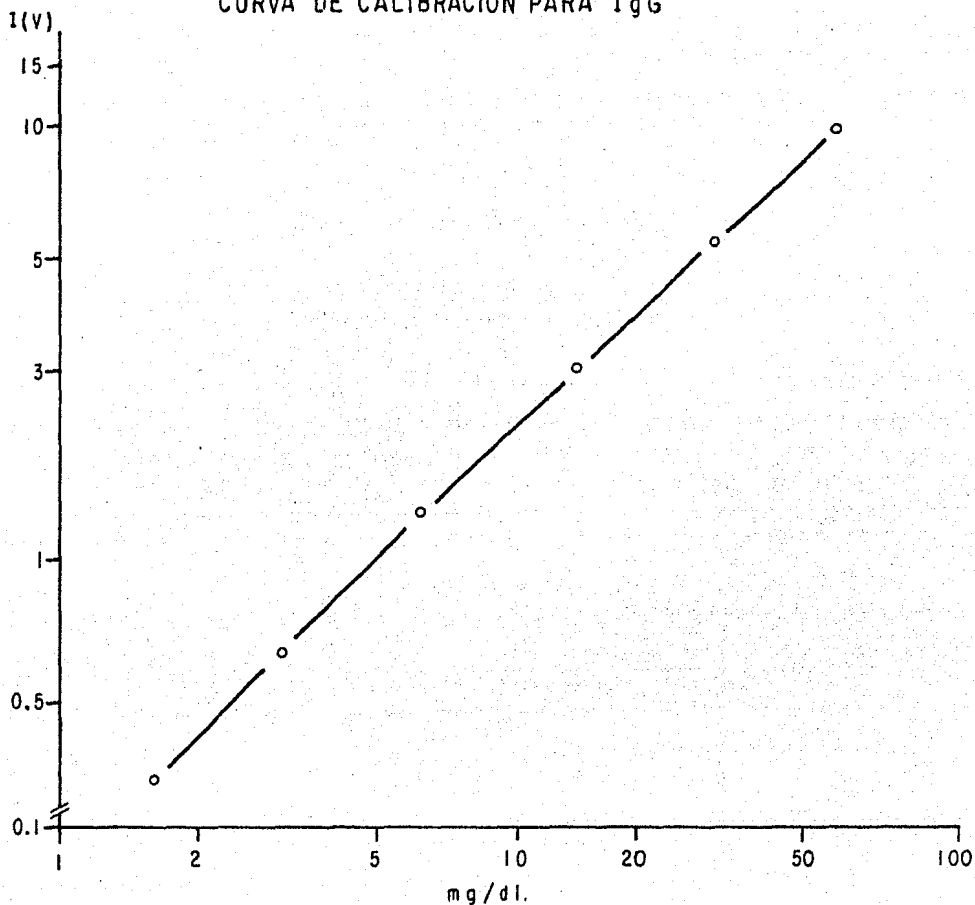


FIGURA # 4.- Curva estandar de IgG.- Se grafica en papel =

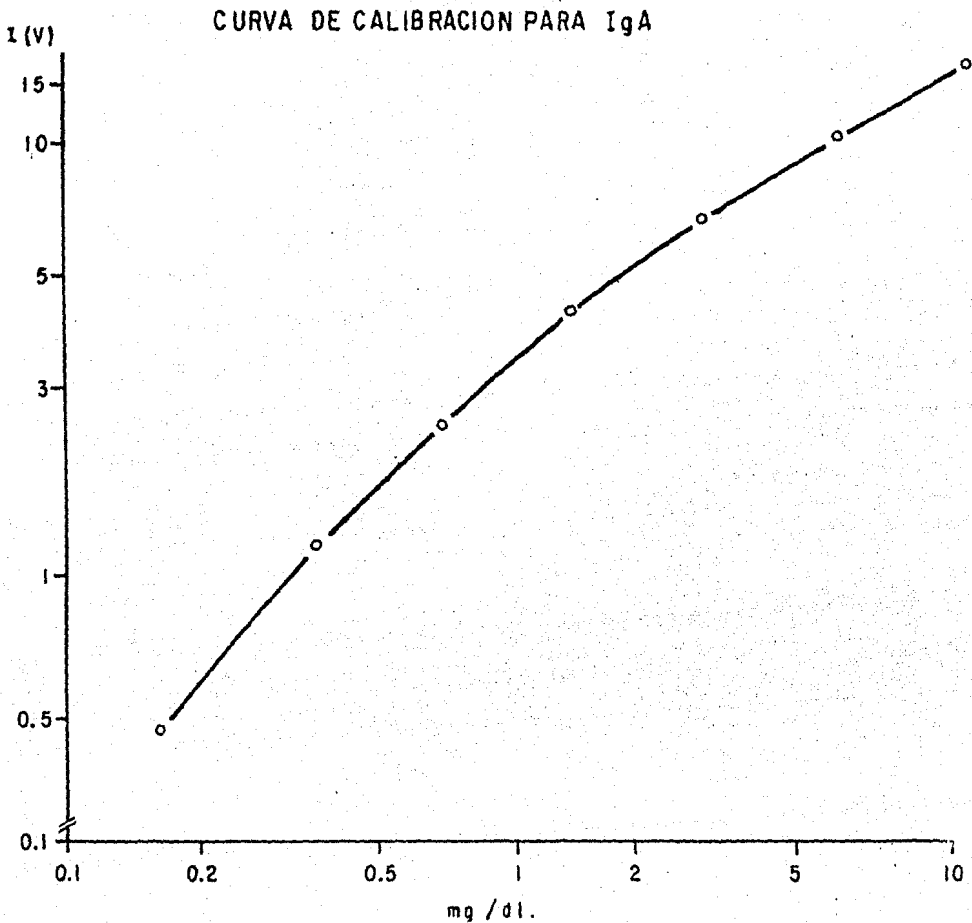
log-log las Intensidades(v) contra las concentra--
ciones correspondientes de las diluciones del sue--
ro estandar de IgG. El coeficiente de correlación--
de Pearson es de 0.995.

CURVA DE CALIBRACION PARA IgA

PROTEINA ESTANDAR(2)	LECTURAS EN INTENSIDAD(V)	CONCENTRACION ⁻ (mg/dl) DEL EST.
IgA	15.90	11
	11.09	5.50
	7.60	2.75
	4.80	1.37
	2.35	0.68
	1.07	0.34
	0.45	0.17

Relación de lecturas I/conc. de IgA, obtenidas por nefelometría para trazar la curva de calibración de IgA.

El coeficiente de correlación de Pearson para ésta - relación es de 0.987. Efectuando la regresión lineal(mínimos cuadrados) de ella, se obtienen las concentraciones de IgA- de las muestras y controles(multiplicando por el factor - de dilución) como forma alternativa a la curva gráfica.



FIGURA# 5.- Curva estandar de IgA. - Se obtiene graficando, en papel log-log las Intensidades(v), de las diluciones- del estandar contra las concentraciones de IgA corres pondientes. El coeficiente de correlación es de 0.987.

CURVA DE CALIBRACION PARA IgM

PROTEINA ESTANDAR(3)	LECTURAS EN INTENSIDAD(V)	CONCENTRACION (mg/dl) DEL EST.
	8.52	9.50
IgM	4.78	4.75
	3.30	2.37
	2.21	1.18
	1.33	0.59

Relación de lecturas I/conc. de IgM, obtenidas por nefelometría laser, para trazar la curva de calibración de IgM.

El coeficiente de correlación de Pearson para éstos valores es de 0.997. Efectuando la regresión lineal(mínimos cuadrados) de éstos, se obtienen las concentraciones de muestras y controles, en ella como forma alternativa al uso de la curva de calibración gráfica.

CURVA DE CALIBRACION PARA IgM

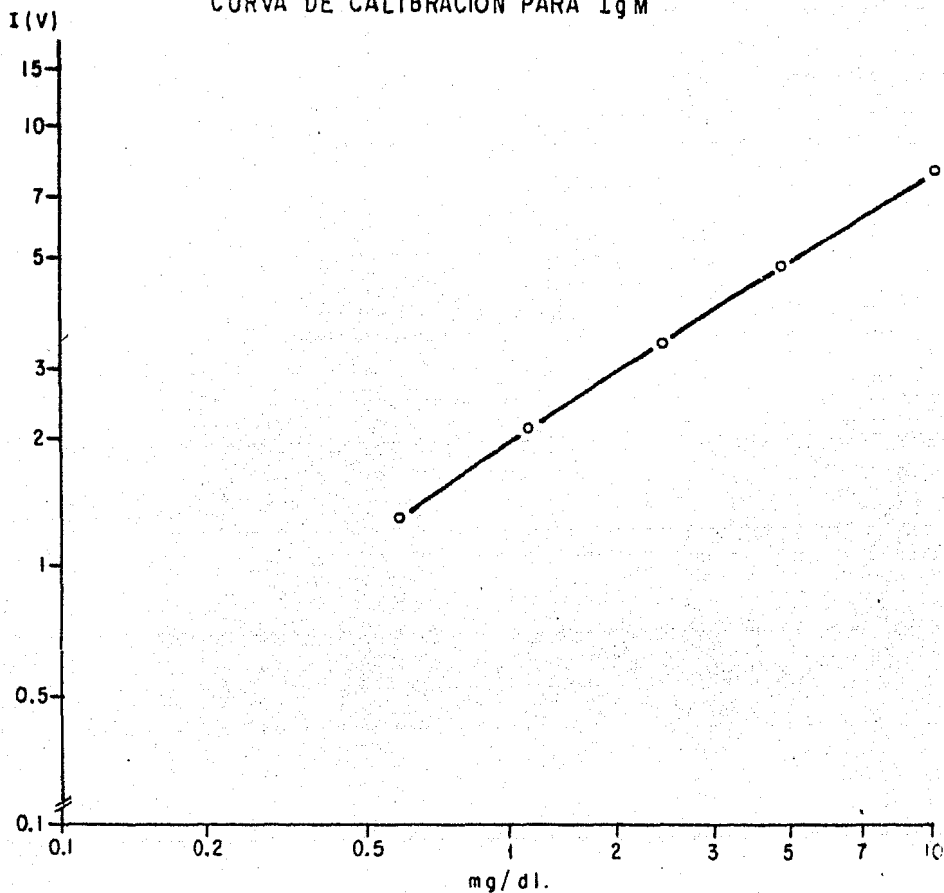


FIGURA # 6.- Curva estandar de IgM. - Se obtiene graficando en papel log-log las lecturas de intensidades correspondientes a las distintas diluciones del suero estandar de IgM contra las concentraciones de las mismas. El coeficiente de correlación de 0.997 para ésta curva.

CURVA DE CALIBRACION PARA C3.

PROTEINA ESTANDAR(4)	LECTURAS EN INTENSIDAD(V)	CONCENTRACION (mg/dl) DEL EST.
C3	14.53	6.30
	10.56	3.15
	7.64	1.57
	4.72	0.78
	2.82	0.39

Relación de lecturas I/conc. de C3, obtenidas por nefelometría laser, para trazar la curva de calibración de C3.

El coeficiente de correlación de Pearson para éstos es de 0.993. Efectuando la regresión lineal(mínimos cuadrados) de los valores anteriores se puede interpolar en ella las concentraciones de las muestras y controles alternativamente al uso de la curva de calibración gráfica.

CURVA DE CALIBRACION PARA C3

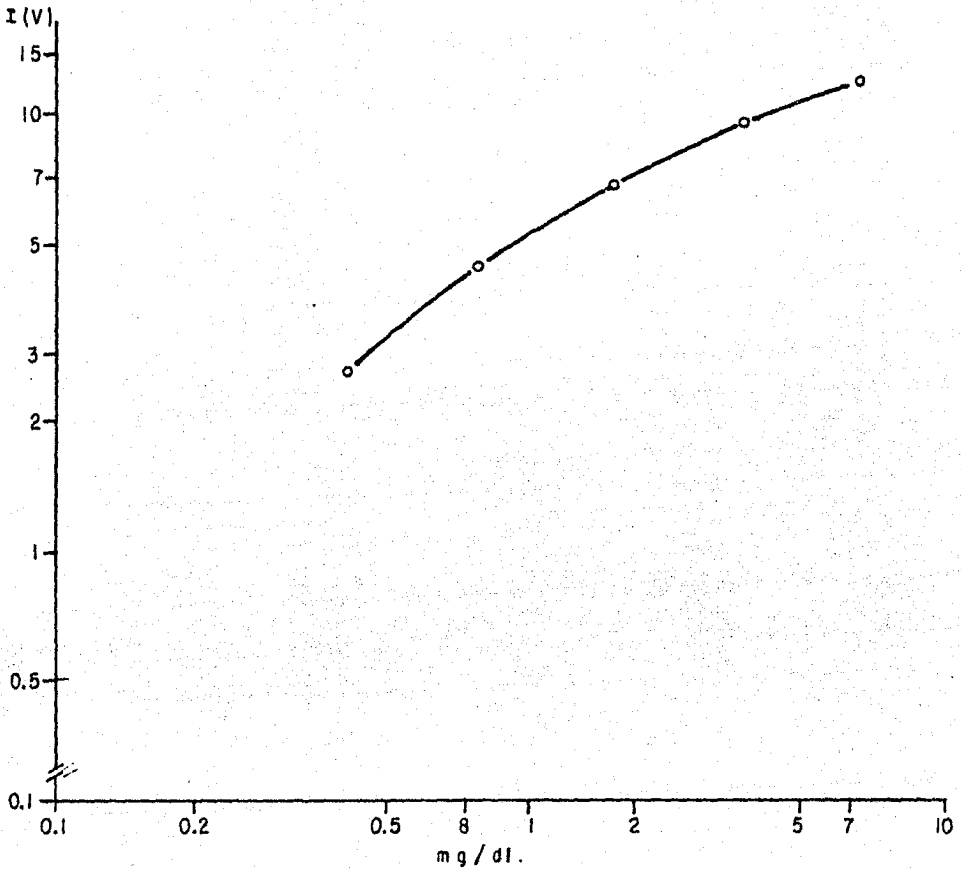


FIGURA # 7.- Curva estandar de C3.- Se grafica en papel log-log las lecturas de las intensidades correspondientes a las diluciones del suero estandar de C3, contra las concentraciones de las mismas. El coeficiente de correlación para esta es de 0.993.

CURVA DE CALIBRACION PARA C4

PROTEINA ESTANDAR(5)	LECTURAS EN INTENSIDAD(V)	CONCENTRACION (mg/dl) DEL EST.
	13.13	5.00
C4	9.45	2.50
	6.76	1.25
	4.11	0.625
	2.34	0.31

Relación de lecturas I/conc. de C4, obtenidas por nefelometría laser, para trazar la curva de calibración de C4.

El coeficiente de correlación de Pearson usó un valor de 0.992. Efectuando la regresión lineal(mínimos cuadrados) - de los valores anteriores se puede interpolar en ella las concentraciones de las muestras y control de forma alternativa al uso de la curva de calibración gráfica.

CURVA DE CALIBRACION PARA C 4

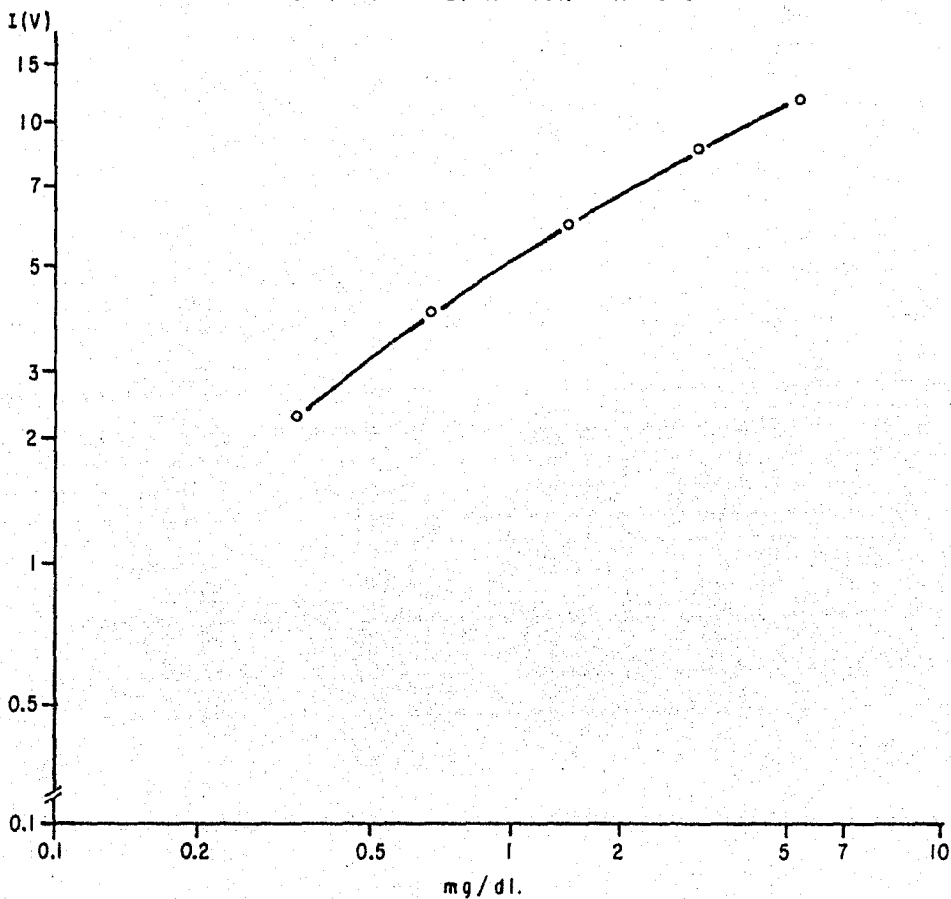


FIGURA # 8.- Curva estandar de C4 . Se obtiene graficando en -
papel log-log las intensidades correspondientes a las
distintas diluciones del suero estandar de C4 contra-
las concentraciones de las mismas. El coeficiente de
correlación para la curva es de 0.992.

4.2 .- EXACTITUD Y SENSIBILIDAD DEL METODO NEFELOMETRICO LASER.

PROTEINA	CONCENTRACION (mg/dl)	C.V.(%) INTRAENSAYO	C.V.(%) INTERENSAYO
IgG	56.75	3.00	7.50
	14.18	13.00	17.00
	* 1.77	30.00	38.00
IgA	11.0	2.50	7.0
	2.75	6.0	11.0
	* 0.68	8.00	20.0
IgM	9.50	3.58	9.20
	2.37	3.64	19.00
	* 0.59	6.70	21.00
C3	6.30	6.0	12.0
	1.57	5.60	10.0
	* 0.30	5.46	16.0
C4	5.00	7.50	18.0
	1.25	8.00	19.0
	* 0.31	7.30	20.0

Coefficientes de variación intra e interensayo del estudio de exactitud y sensibilidad para las cuantificaciones por nefelometría laser.

Se reportan los valores calculados como un cociente entre la desviación estandar de las Intensidades leídas y la media aritmética de las mismas X 100, obtenidas para tres concentraciones distintas (alta, media y baja) de cada una de las proteínas determinadas, la sensibilidad se dá con el valor de la concentración más baja* en la cual no hay desviaciones en la curva de calibración correspondiente y verificada por el coeficiente de variación correspondiente.

4.3.- PRECISION DEL METODO NEFELOMETRICO LASER.

PROTEINA	I N T R A E N S A Y O			I N T E R E N S A Y O		
	\bar{X} (mg/dl)	D.S.	C.V.(%)	\bar{X} (mg/dl)	D.S.	C.V.(%)
IgG	1225.8	103	8.4	1093.30	106	9.7
IgA	225	15	6.6	243	21	8.9
IgM	100.9	6.85	6.8	93.30	6.7	7.5
C3	89.40	3.5	3.9	76.70	4.0	5.30
C4	18.84	2.0	10.80	18.64	2.58	13.85

Resultados del estudio de precisión para el método nefelométrico laser en las cinco proteínas determinadas.

Se reportan los valores del coeficiente de variación para determinaciones en rango de concentración fisiológicamente normales en suero control y obtenidos como un cociente entre la desviación estandar de tales concentraciones y la media de las mismas X 100- para cada una de las proteínas estudiadas.

4.4.- NIVELES DE LAS PROTEINAS DETERMINADAS POR NEFELOMETRIA LASER EN LA POBLACION INFANTIL ESTUDIADA.

(VALORES DE REFERENCIA)

Se determinaron las concentraciones de las cinco proteínas - IgG, IgA, IgM, C₃ y C₄ en las muestras de la población infantil por nefelometría laser, en cada uno de los grupos de las diversas edades, siguiendo el procedimiento indicado anteriormente e interpolando la intensidad obtenida en la curva de calibración correspondiente.

Una vez obtenida la concentración por muestra de las cinco -- proteínas se sacó el promedio de la concentración por cada uno de los grupos. Debido a la distribución normal que se observó (mediante histogramas) en todos los grupos para IgG, C₃ y C₄ el valor promedio en concentración se calculó mediante la media aritmética (21,26) y el intervalo de confianza para ellos se determinó con ± 2 desviaciones estandares de la media.

Para IgA e IgM, como se obtuvo una distribución semejante a la normal se calculó la media geométrica (mediante el logaritmo de los valores) (24) y el intervalo de confianza se calculó por el antilogaritmo del valor promedio ± 2 desviaciones estandares.

Se reportan también los valores de concentraciones en todos los casos en Unidades Internacionales por ml, siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud.

Los VALORES DE REFERENCIA se dan para cada proteína y por grupo de edad como el Intervalo de confianza calculado con ± 2 desviaciones estandares (95% de la población) en cada caso (7).

CUADRO 3.- Niveles de IgG con la edad.

EDAD	No. DE MUESTRAS	UI/ml* \bar{x}	mg/dl \bar{x}	INTERVALO (mg/dl)
A1 Nac.	30	232.8	2024	550-3450
1-6 meses	20	84	730	336-1120
6-12 meses	20	216	1878	890-2860
1-4 años	26	167	1360	672-2040
4-8 años	21	198	1723	880-2600
8-15 años	21	179	1556	800-2400

* Unidades Internacionales según el estandar de la OMS.

Los valores promedio de IgG (concentración) obtenidos en población pediátrica por nefelometría, son reportados en este cuadro junto con los intervalos dados con ± 2 d.s. de la media y cuyos valores se tomaron como referencia en la cuantificación de IgG como parámetro de diagnóstico.

DESARROLLO DE IgG CON LA EDAD

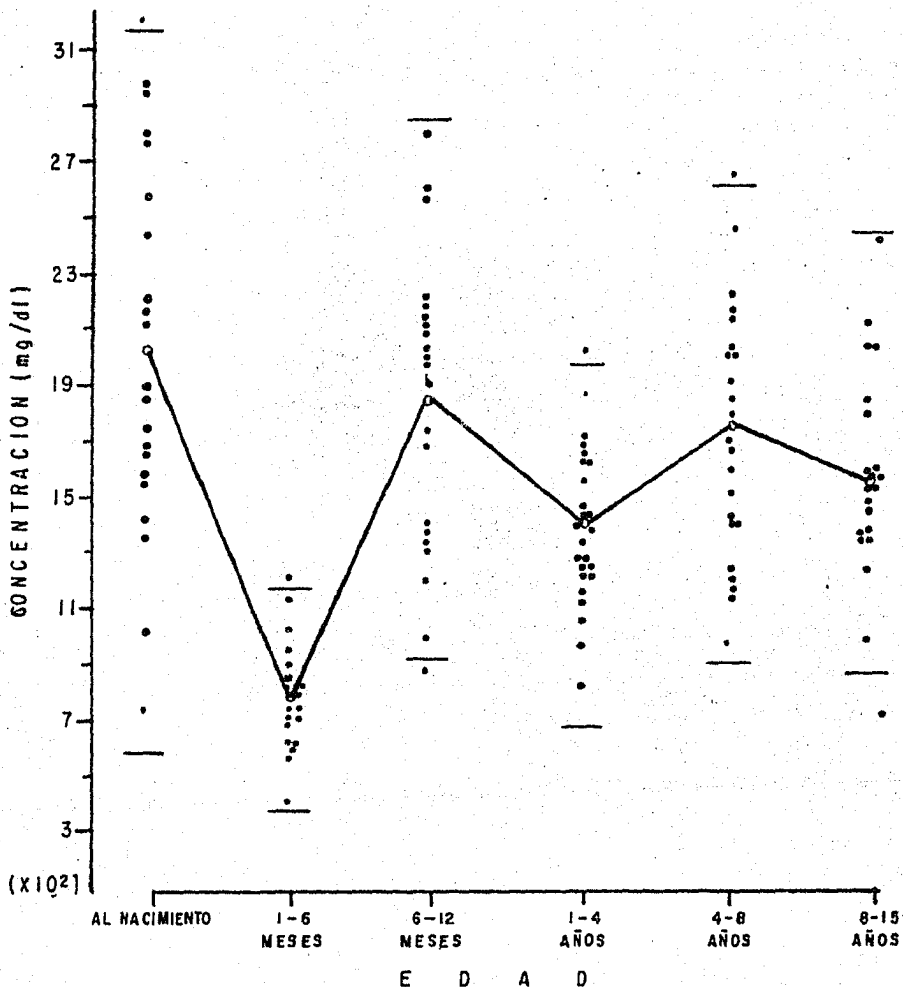


FIGURA # 9.- Desarrollo de IgG con la edad.- Se grafican valores promedio de IgG(mg/dl) contra los distintos grupos de estudio para los valores de referencia y sus valores individuales.

CUADRO 4.- Niveles de IgA por edad.

EDAD	No. DE MUESTRAS	UI/ml* \bar{x} <u>geométrica</u>	mg/dl \bar{x}	INTERVALO (mg/dl)
Al nac.	30	0.30	0.50	0-1.45
1-6 meses	20	21.56	36	14-19
6-12 meses	20	30	49	16-150
1-4 años	26	38	64	20-190
4-8 años	21	58	97	45-200
8-15 años	21	144	240	160-368

* Unidades Internacionales según el estandar de la OMS.

Los valores promedio de IgA (concentración) obtenidos en población pediátrica sana, por nefelometría, son reportados junto con los valores de los intervalos obtenidos con ± 2 - d.s. de la media geométrica, tomándose éstos como referencia en la cuantificación de IgG por éste método.

DESARROLLO DE IgA CON LA EDAD

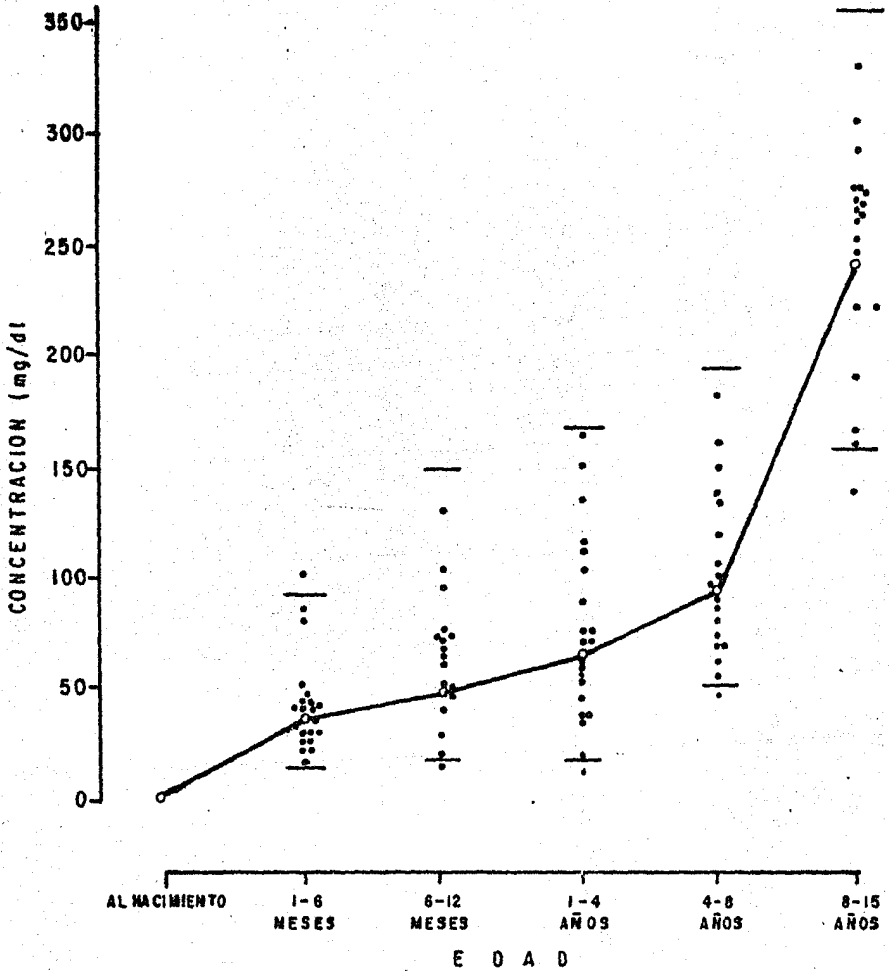


FIGURA # 10.- Desarrollo de IgA con la edad.-Se grafican los valores promedio de IgA(mg/dl) obtenidos en el estudio de valores de referencia contra los distintos grupos de edad(cuadro 4) y los valores individuales.

CUADRO 5 .- Niveles de IgM por edad.

EDAD	No. DE MUESTRAS	UI/ml* \bar{x} geométrica	mg/dl \bar{x}	INTERVALO (mg/dl)
Al Nac.	30	1.41	1.23	0 - 2.18
1-6 meses	20	92	80	38-165
6-12 meses	20	102	89	39-213
1-4 años	26	102	89	38-200
4-8 años	21	109	95	43-209
8-15 años	21	143	125	43-300

* Unidades Internsionales, según el estandar de la OMS.

Los valores promedio de IgM (concentración) obtenidos en niños sanos, por nefelometría, se reportan aquí junto - con los intervalos obtenidos con ± 2 d.s. del promedio geométrico, tomándose éstos valores como referencia en la cuantificación de IgM por éste método.

DESARROLLO DE IgM CON LA EDAD

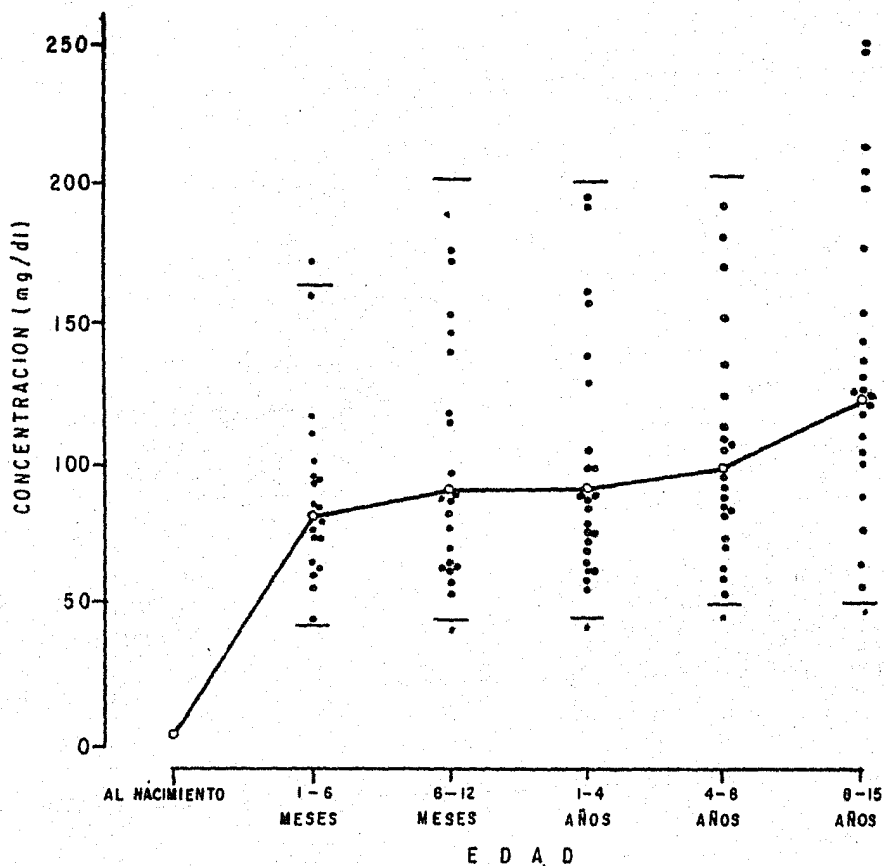


FIGURA # 11.- Desarrollo de IgM con la edad.- Se grafica la concentración de IgM promedio, obtenidas como valores de referencia contra los distintos grupos de edad estudiados (cuadro 5) y los valores individuales con los intervalos (en barras) de ± 2 d.s.

CUADRO 6.- Niveles de C3 con la edad.

EDAD	NO. DE MUESTRAS	UI/ml* X	mg/dl X	INTERVALO (mg/dl)
A1 Nac.	30	78	61	20-100
1-6 meses	20	124	97	45-147
6-12 meses	20	106	83	40-150
1-4 años	26	207	162	95-230
4-8 años	21	230	180	100-256
8-15 años	21	215	168	100-285

* Unidades Internacionales, según el estandar de la O.M.S.

Se reportan los valores promedio en concentración de C3, obtenidos mediante el estudio con niños sanos y por nefelometría laser, también se reportan los intervalos - obtenidos con ± 2 d.s. del promedio por cada grupo, y tomándose éstos valores como referencia en las determinaciones de C3 por éste método.

DESARROLLO DE C3 CON LA EDAD

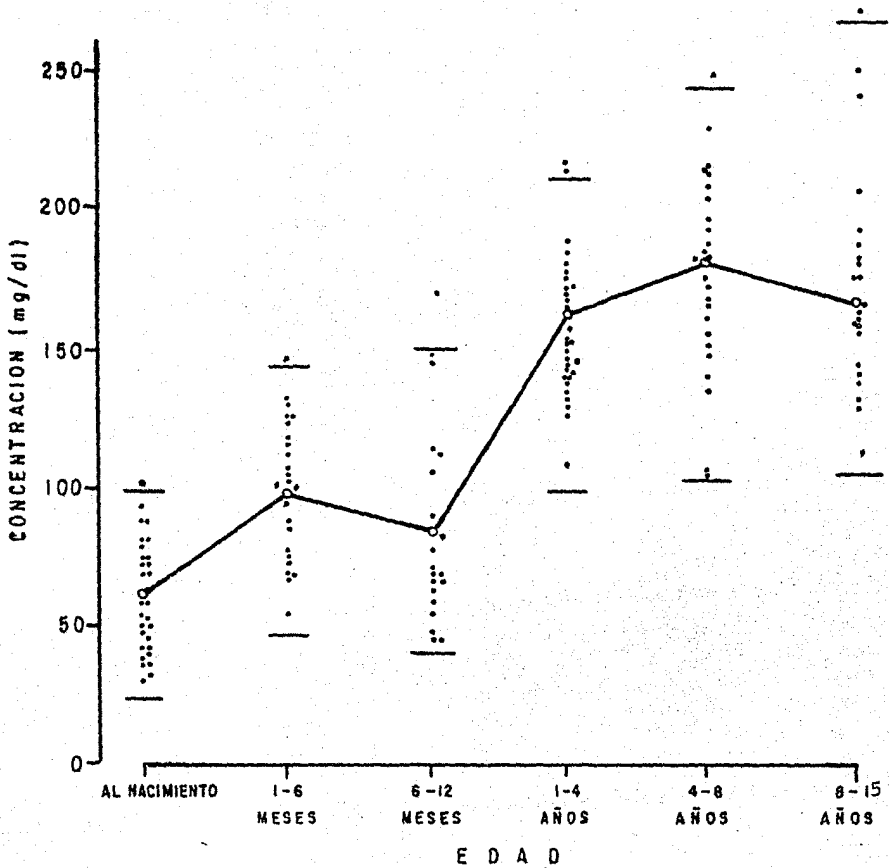


FIGURA 12.- Desarrollo de C3 con la edad.- Se grafican los valores promedio, en concentración, de C3 por cada-uno de los grupos de distintas edades, obtenidos por nefelometria con niños sanos para el estudio de valores de referencia(cuadro 6) y los valores individuales con los intervalos(en barras) con ± 2 d.s.

CUADRO 7 -- Niveles de C4 por edad.

EDAD	No.DE MUESTRAS	UI/ml* \bar{x}	mg/dl \bar{x}	INTERVALO (mg/dl)
A1 Nac.	30	45	14	1-27
1-6 meses	20	70	22	4-60
6-12 meses	20	83	26	6-60
1-4 años	26	150	47	13-82.
4-8 años	21	153	48	20-75
8-15 años	21	144	45	20-70.

* Unidades Internacionales, según el estandar de la OMS.

Se reportan valores promedio en concentración de C4, obtenidos mediante el estudio con niños sanos y por nefelometría laser, junto se reportan los intervalos con $\pm 2d.s.$ del promedio correspondiente y por grupo de edad. Estos valores se tomaron como referencia en las determinaciones de C4 por dicho método.

DESARROLLO DE C₄ CON LA EDAD

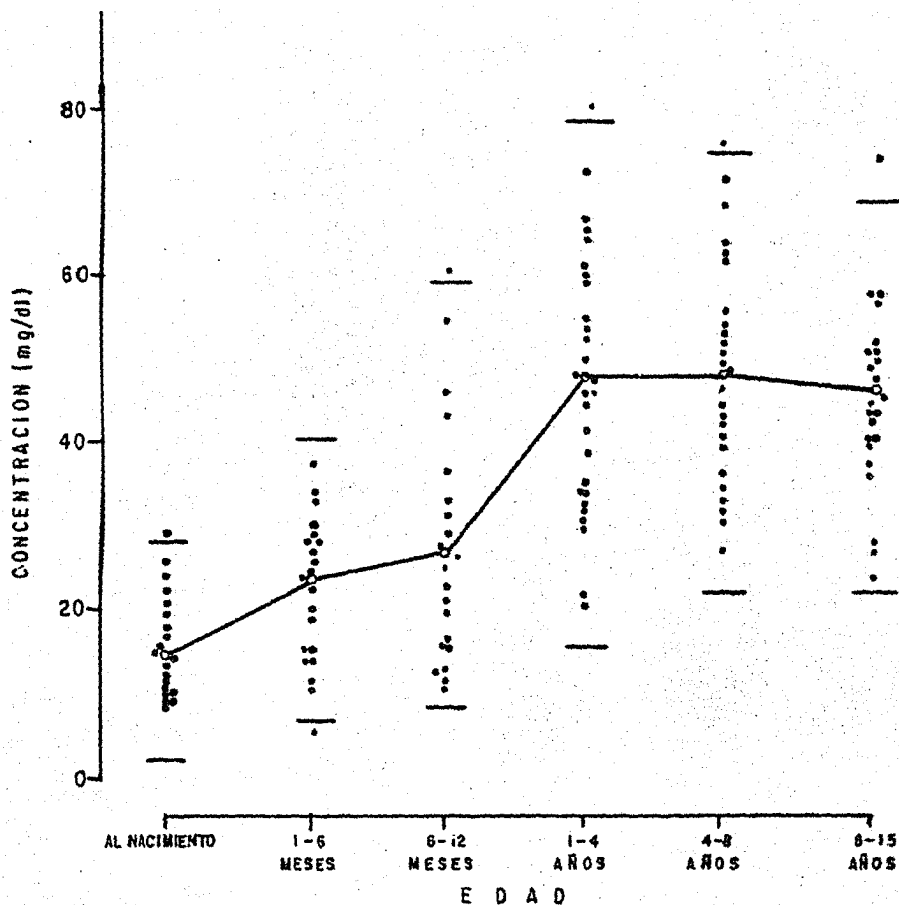


FIGURA # 13 .- Desarrollo de C₄ con la edad. - Se grafican valores promedio de C₄ para cada uno de los grupos de edad, obtenidos en niños sanos para el estudio de valores de referencia (cuadro 7), y los valores individuales con los intervalos (en barras) con ± 2 d.s.

D I S C U S I O N

Los coeficientes de variación intra e interensayo reportados en el presente trabajo como una medida de la sensibilidad, precisión y exactitud del método nefelométrico laser son satisfactorios para hacer uso del método rutinariamente, si se concide ra la regla de Tonk y la del Colegio de Patólogos Americanos(7) utilizadas para evaluar los coeficientes de variación de una medición en particular en la práctica clínica.

En el caso de la sensibilidad y la precisión intra e interensayo dichos valores son muy buenos, dando un ejemplo: Una convi nación de las dos reglas mencionadas nos dice que el coeficiente de variación no debe de ser mayor a $5/32$ del rango normal de la medición, por lo que al calcular $5/32$ del rango normal para IgA en el estudio de precisión a intraensayos el valor en éste caso, es de 9 y el coeficiente de variación para el mismo caso se obtuvo de 6.6, y de ésta misma manera se checkaron los valores restantes.

En el estudio de exactitud la variación en interensayos es elevada por lo que se recomienda preparar una curva estandar - cada vez que se efectúen determinaciones de la proteína a cuantificar.

Los coeficientes de variación pueden ser mejorados aumentando el número de ensayos y efectuandolos por triplicado, ya que en reportes previos se reportan coeficientes de variación hasta de

un 2 %, considerando desde luego que se trabaja con modelos automatizados.

Considerando como sensibilidad, el valor mínimo que puede ser detectado (confiablemente), entonces los valores más bajos (en concentración) de las curvas de calibración para cada proteína estudiada (IgG, IgA, IgM, C3 y C4) nos indica la sensibilidad para ellas - ya que a mayores diluciones la variación es alta a las condiciones metodológicas trabajadas, en todos los casos se tienen valores - bastante aceptables ya que las concentraciones clínicamente importantes, esto es, valores mayores intermedios y menores de los normales (a cualquier edad) pueden ser detectados con éste método. - Debido a lo anterior se puede proponer como una buena técnica alternativa al uso de la IDR, además se reporta previamente (18, 28, - 37) una buena correlación con ésta.

Las ventajas de su uso, para diagnóstico rutinario son:

- El uso de cantidades mínimas de reactantes.
- Poco tiempo de reacción.
- Técnica relativamente sencilla.
- Amplio rango de calibración .
- Buena precisión , exactitud y sensibilidad del método.
- En algunos estudios se reporta la versatilidad del método para determinaciones de otras proteínas y otros fluidos biológicos, y una buena sensibilidad para determinaciones a bajas concentraciones (en otras condiciones de trabajo) (15) (20).

Las limitaciones en su uso serán:

- No se cuantifican proteínas monoclonales por éste método.
- El costo (relativo) del aparato.

Por otro lado, en estudios previos se ha comprendido establecer los valores normales en términos de U.I.(5,22,24), para tener una significancia en relación al sexo, edad, raza, lo que hace -- posible comparar los niveles de diversas áreas geográficas y diferentes grupos raciales pudiéndose así reconocer factores de influencia desconocida en relación al clima, estado nutricional, etc.-- por lo que dichos valores son reportados así en el presente trabajo.

Efectuando un análisis comparativo en el desarrollo de los niveles de las distintas proteínas determinadas en el presente trabajo se puede concluir lo siguiente :

- Un desarrollo de IgG más rápida que en zonas norteamericanas(16, 28,32) y similar a poblaciones latinoamericanas(13,24,25).
- Un desarrollo gradual de IgA a partir de sexto mes de vida hasta los quince años de edad, éste hallazgo descrito por la mayoría de los autores(13,16,24,36) indica que el sistema productor de IgA es mucho más lento en desarrollar su potencial definitivo que los otros sistemas(IgG,IgM).
- Según el cuadro 5 de resultados, el desarrollo de IgM principia los primeros semanas de vida alcanzando a los seis meses un porcentaje alto en su concentración, esto demuestra que la síntesis de IgM se alcanza más rápidamente en nuestro grupo de niños que en otras poblaciones donde esto ocurre después del segundo año de vida(16,25).
- En el caso de C3 y C4 los valores se mantienen practicamente -- constantes a partir del primer año de vida de manera semejante a reportes previos en zonas norteamericanas(16,28)dificultándose su comparación con otras poblaciones,dada la poca información --

al respecto por el mismo método y los pocos trabajos para el -
caso además de un mínimo de trabajos reportados en Unidades In-
ternacionales.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- El método nefelométrico laser resultó con mayor precisión y sensibilidad, para valores clínicamente importantes, de IgG, IgA, IgM, C3 y C4 que otros métodos. Una buena exactitud en intraensayos, lo que hace recomendable su uso como técnica alternativa a la IDR.
- 2.- Se encontraron diferencias en los valores de referencia - para IgG, IgA, IgM, C3 y C4 en los distintos grupos de edad y estas fueron significativas al aplicarse un análisis de varianza con una $p < 0.05$.
- 3.- Se observaron diferencias, en los niveles de las cinco -- proteínas determinadas, con reportes previos de Zonas Nor~~te~~teamericanas y resultados semejantes con publicaciones de Centro y Sudamérica.
- 4.- Se compararon los valores de referencia obtenidos por nefelometría laser con los reportados por IDR(en el mismo Hospital de Pediatría) para IgG, IgA, IgM para las mismas edades y hubo poca diferencia.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Alexander J.W. y Good R.A., 1976, *Inmunología clínica*, Ed. Salvat S.A., pag. 60-76.
- 2.- Alexander R.L. Jr., 1980, Comparison of radial immunodiffusion and laser nephelometric for quantitation some serum proteins. *Clin Chem*, vol. 26(2), pag. 314-317.
- 3.- Bellanti J.A., 1972, *Inmunología*, primera edición en español, - Editorial Interamericana S.A., pag. 60-70.
- 4.- Buffone G.J. y Lewis S.A. y Jollif C.R., 1979, Manual Immunochemistry nephelometric assays for serum immunoglobulins IgG, IgA, IgM. *Clin Chem*. vol. 25(6), pag. 1000-1012.
- 5.- Bruyn A.H. y Neumann H., 1982, The absolute quantification of Human IgM and IgG; standardization and normal values. *Journal of Immunological Methods*, vol. 48(2), pag. 339-348.
- 6.- Buffone G.J. y Savory J. y Cross R.E., 1974, Use of a laser - equipped centrifugal analyzer for kinetic measurement of serum IgG. *Clin. Chem*. vol.20(10), pag. 1320-1323.
- 7.- Castillo de Sanchez María Luisa, 1978, "Requisitos de calidad de la medición realizada en el laboratorio clínico" Aspectos - del pre-congreso Internacional de Química Clínica, México, pag. 1-50.
- 8.- Deaton C.D., Maxwell, Smith y Creveling, 1976, Use of laser nephelometric in the measurement of serum proteins. *Clin Chem*. vol. 22(9), pag. 1465-1471.

- 9.- Díez Peña D.M., Madrid 1980, Química Física, Vol. I, primera edición; Editorial Alhambra S.A., pag. 339-345.
- 10.- Downie H.M., 1973, Métodos estadísticos aplicados, primera edición, Editorial Alhambra S.A. pag. 171-203.
- 11.- Ewing G.W., 1979, Métodos Instrumentales de Análisis Químicos- primera edición en español, Editorial McGraw-Hill, pag. 19-47 154-165.
- 12.- Fundenberg H.H., 1980, Inmunología Clínica, segunda edición, - Editorial El Manual Moderno S.A., pag. 337-419.
- 13.- Golubjatnikov R., Steedman M., 1972, Serum levels of immunoglobulins in Mexican preschool children, Am. J. epidemiol, vol. 95(6) , pag. 542-548.
- 14.- Gordon Lee, 1978, Lo esencial de la Inmunología, segunda edición en español, Editorial el Manual Moderno S.A., pag. 35-57-84-90.
- 15.- Grange J., Roch, Quast, 1977, Nephelometric assays of antigen- and antibody with latex particles. J. of Immunological Methods vol. 18(4), pag. 365-375.
- 16.- Jolliff C.R., Cost, 1982, Referencia Intervals for serum IgG, Ig A, IgM, C3 and C4 as determined by rate nephelometer. Clin chem. vol. 28(1), pag. 126-128.
- 17.- Jolliff C.R., and Hergen Rader P., 1979, The effect of analytical variables on the comparison of radial immunodiffusion and rate - nephelometry. Clin Chem vol. 25(6) , pag. 1023.

- 18.- Killingsworth L.M., Savory J., 1972, Manual nephelometric methods for immunochemical determinations of immunoglobulins IgG, IgA and IgM in human serum.
Clin Chem. vol. 18(4), pag. 335-339.
- 19.- Killingsworth L.M., and Savory J., 1973, Nephelometric studies of precipitin reactions: a model systems for specific protein measurement.
Clin Chem vol. 19(4), pag. 403-407.
- 20.- Kleins T.O., Nerten B., 1980, Rapid Manual immunoturbidimetric and immunonephelometric assays of prealbumina, albumina, IgG - IgA, IgM in cerebrospinal fluid.
J. Clin Chem Biochem. , vol. 18(1), pag. 245-254.
- 21.- Kreyzig E., 1976, Introducción a la estadística matemática, segunda reimpresión, Editorial Limusa S.A., pag. 291-300.
- 22.- Maddison S.E., Stewart C.C., Forsaly C.E., 1975, The relationship of race, sex, and age to concentrations of serum immunoglobulins expressed in international units.
Bull World Health Organ vol. 52(1), pag. 175-184.
- 23.- Marrack J.R., Richards, 1951, The light-scattering properties of an antigen-antibodies reactions.
J. Immunology vol. 66(1) , pag. 79-82.
- 24.- Mate L.J. y Cáceres A., 1974, Niveles de inmunoglobulinas en una población del Altiplano Guatemalteco.
Boletín de la Oficina Panamericana , Febrero, pag. 115-122.
- 25.- Mate L.J. and Lechtig A., 1971, Levels of IgG, IgA and IgM in cord blood of Latin American newborns from different ecosystems
Rev. Lat-Amer Microbiol vol. 13(3), pag. 173-179.

- 26.- Moreno B.A. and Jouffred M. , 1979, Elementos de probabilidad y estadística, tercera reimpresión ; Representación y - servicios de Ingeniería, Cap. I, II y X., pag. 44-66,245-250.
- 27.- Reimer C.B., and Maddison S.E., 1976, Standerization of human immunoglobulin quantitation: A review of current status- and problems.
Clin Chem vol. 22(4) , pag. 557-582.
- 28.- Ritzmann S.E., Aguanno J.J., Finney, 1982, Quantitation of - normal and abnormal serum immunoglobulins G,A, and M by radial immunodifusion, nephelometry and turbidimetry., Fhyaiology of immunoglobulins: Diagnostic and aspects clin.,pag.139-156.
- 29.- Rojas M.W., 1970, Immunología, tercera edición, Editorial Co-llina-Eeinteramericana S.A., pag. 79-90.
- 30.- Rose R., Noel, and Friedman, 1980, Manual of Clinical immunology, second edition; American Society for Microbiology Washing- ton D.C., pag. 109-175.
- 31.- Rowe P.S., Anderson S.G., 1970, A research standar for human se- rum immunoglobulins IgG, IgA, and IgM.
Bull W.H.O. vol. 42(2), pag. 535-539.
- 32.- Skoog A., 1970, Analisis Instrumental, tercera edición, edito- rial Alhambra S.A., pag. 248-262.
- 33.- Sternberg J.C., 1977, A rate nephelometer for measuring specific proteins by immunoprecipitin reactions.
Clin Chem vol. 23(8), pag. 1456-1464.

- 34.- Strobel A.H., 1979, Instrumentación Química, segunda reimpresión, editorial Limusa S.A., pag. 256-260.
- 35.- Trevorrow V.E., Washburn A.H., Denever, 1970, Gama globulins syntesis in the months of life.
Am J. Dis child vol. 119(4), pag. 296-297.
- 36.- Uffelman J.A., Engelhard, Holliff, 1970, The quantitation of immunoglobulins in normal children.
Clinical Chim acta vol. 28(1), pag. 185-192.
- 37.- Ying C., Miyada D., Swinup G., 1981, Methods for immunoglobulina quantitations compered.
Clinical Chemistry vol. 27(2), pag. 345-347.