



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**DETERMINACION DE PROTEINAS PLASMATICAS
ESPECIFICAS POR TURBIDIMETRIA Y SU
CORRELACION CON NEFELOMETRIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARCO AURELIO BECERRA TELLEZ

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA

1989



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.

A mi esposa Queta, con quien
he compartido parte de mi vida
en momentos de alegría y de
tristeza, quien me ha brindado
un apoyo moral inconcebible y
que en lo futuro el amor nos
una para siempre.

A mi cariño, comprensión y fé: a mi madre

Al coraje, tesón y ejemplo: a mi padre

A la esperanza y apoyo: a mis hermanas

A la enseñanza y a la siembra: a mis
maestros y escuela.

A la amistad y a la lealtad: a mis amigos

Caminante no hay camino, se hace camino al andar
Al andar se hace camino y al volver la vista atrás,
se ve la senda que nunca se ha de volver a pisar,
caminante, no hay camino, sino estelas en la mar.

Antonio Machado

A los montes, los ríos,
el sol y el mar, a ellos
que me enseñaron el verbo
"amar"

J.M. Serrat

"Si quieres que te señale a un
hombre fracasado te señalaré
a un hombre conforme y satisfecho"

Rudyard Kipling.

Agradezco a la Q.F.B. Ma. de Lourdes Irigoyen Coria por su valiosa ayuda y asesoramiento para la realización de esta tesis.

Con agradecimiento al Q.F.B. Genaro Jiménez Reyes y la Química Hoechst por su gran apoyo técnico y científico.

Agradezco el apoyo brindado por el Dr. Ramón Paniagua y al personal del Laboratorio de Inmunología del H. E. C.M. "La Raza" del I.M.S.S. en donde se realizó este trabajo.

Gracias al Lab. Efrén Antonio Rivera Martínez, por su desinteresada colaboración en la elaboración de láminas y gráficas.

I N D I C E

		Pág.
	RESUMEN	I
I	INTRODUCCION	1
II	GENERALIDADES	5
	A) Inmunoglobulinas	5
	B) Propiedades físicas y químicas	6
	C) Estructura	8
	D) Digestión enzimática y agentes reductores para disociar las inmunoglobulinas	9
	E) Factores genéticos Gm, Inv y Am	10
	F) Inmunoglobulina G (IgG)	12
	G) Polimorfismo genético	13
	H) Inmunoglobulina A (IgA)	14
	I) Inmunoglobulina M (IgM)	15
	J) El sistema del complement ⁺	15
	K) Complemento 3 (C3)	16
	L) Complemento 4 (C4)	17
	M) Importancia clínica	18
	N) Reacciones antígeno-anticuerpo	20
	Ñ) Antisueros	21
	O) Estandarización	23
	P) Reacción de precipitación	25
	Q) Turbidimetría	27
	R) Efecto del polietilenglicol	31
	S) Efecto del pH	32
	T) Efecto del antisuero	33
	U) Reacciones de punto final	35
	V) Cinética de la reacción turbidimétrica	36
	W) Aplicaciones clínicas	37
	X) Nefelometría	39

III	OBJETIVO	44
IV	MATERIAL Y METODOS	45
	Material biológico	45
	Turbidimetría	46
	A) Fundamento	46
	B) Muestra biológica	46
	C) Material	46
	D) Aparatos	47
	E) Reactivos	47
	F) Filtros	48
	G) Antisueros	48
	H) Estandarización y calibración	49
	I) Método	49
	J) Sueros problema	53
	K) Control de calidad	54
	Nefelometría	58
	A) Fundamento	58
	B) Muestra biológica	58
	C) Material	58
	D) Aparatos	58
	E) Reactivos	58
	F) Antisueros	59
	G) Método	59
	Inmunodifusión Radial (IDR)	60
	A) Fundamento	60
	B) Muestra biológica	60
	C) Material	60
	D) Aparatos	60
	E) Reactivos	61
	F) Antisueros	61
	G) Método	61

	Electroforésis	62
	A) Fundamento	62
	B) Muestra biológica	62
	C) Material	62
	D) Aparatos	62
	E) Reactivos	63
	F) Método	63
V	CALCULO DE LOS RESULTADOS	65
VI	RESULTADOS	67
VII	DISCUSION	70
VIII	CONCLUSIONES	73
IX	BIBLIOGRAFIA	75

El montaje y adaptación del Método Turbidimétrico, se llevo a cabo con resultados confiables.

Se empleó un Espectrofotómetro, con fuente de luz de tungsteno que está al alcance de todos los Laboratorios Clínicos.

En la determinación de las proteínas plasmáticas específicas, se obtuvo una gran sensibilidad, especificidad y precisión.

En el presente trabajo empleamos sueros normales (disproteinemias) y anormales (hipergamaglobulinemias monoclonales), de individuos de una población mestiza mexicana.

Se obtuvieron los valores de referencia para las proteínas plasmáticas IgA, IgM, IgG, C3 y C4 de dicha población.

Las técnicas de inmunoprecipitación utilizadas fueron:

Turbidimetría, Nefelometría e Inmunodifusión Radial, empleando los mismos reactivos y antisueros en cada una de estas técnicas para la obtención de los valores de referencia.

La correlación de los valores obtenidos por las distintas técnicas de inmunoprecipitación para las proteínas plasmáticas, es **muy aceptable**; habiendo entre estas un promedio de correlación de **r = 0.93 a 0.99**

I

INTRODUCCION

La cuantificación de proteínas plasmáticas tiene gran importancia en el diagnóstico clínico y monitoreo de diversos padecimientos: Inmunodeficiencia (hipogamaglobulinemia ligada al sexo, inmunodeficiencia común, gastroenteropatías, síndrome nefrótico), Infecciones (mononucleosis infecciosa, tuberculosis, endocarditis), Enfermedades hepáticas (hepatitis infecciosa, cirrosis alcohólica, cirrosis biliar, hepatitis activa - crónica), Lupus eritematoso sistémico, Artritis reumatoidea, Síndrome de Sjögren, Linfoma de Hodgkin, Fibrosis quística, Leucemia monocítica, etc..

La determinación de proteínas plasmáticas en estos padecimientos se realiza en el laboratorio en diferentes líquidos biológicos como: suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico, por diferentes técnicas espectrofotométricas. Los métodos inmunoquímicos por medios ópticos han ganado cada vez mayor aceptación en los últimos 20 años, debido a su rapidez, sensibilidad, especificidad y simplicidad. La determinación de la luz dispersada por las macromoléculas, constituye la base de muchos métodos físicos y analíticos, que se han adaptado a los métodos inmunoquímicos como Nefelometría y Turbidimetría.

La reacción de precipitación antígeno-anticuerpo, es la reacción básica sobre la que se ha desarrollado la inmunoquímica; la gran sensibilidad y su especificidad la hace de gran valor para distinguir e identificar diferentes proteínas.

El descubrimiento y el nombre de la reacción de precipitación, se atribuye a Kraus (1897) quién observó que se formaba un precipitado al mezclar filtrados de caldo de cultivo de bácidos tifoídicos (25).

Kabat mostró que las pruebas de precipitación son útiles para determinar antígenos tisulares normales en preparaciones purificadas de virus (3).

Folin y Denis (1914) basandose en una técnica de enturbiamiento producido por el ácido sulfosalicílico, introdujeron la técnica turbidimétrica de las proteínas en orina. Posteriormente esta técnica se aplicó también en la determinación de proteínas en líquido cefalorraquídeo (4).

Libby (1938) publicó un método turbidimétrico rápido y conveniente, empleado posteriormente por serólogos comparativos, quienes determinaban las curvas de turbidez agregando diluciones en serie al doble (25).

Pope y Healy (1938) mostraron que la turbidez de una reacción entre toxinas de difteria y antitoxinas equinas es máxima, con el equivalente en cantidad de toxina y antitoxina (41).

Boyden (1947) midió la turbidez espectroscópicamente de polisacáridos de neumococo correlacionandolo con el contenido de nitrógeno precipitado (41).

Las reacciones de precipitación son frecuentemente cuantificadas por turbidez a 350nm, ya que esta longitud de onda se halla sobre el rango de absorción normal de inmunoglobulinas y antígenos protéicos, (Vincent, Harris and Yaverbaum 1970; - Davies 1971; Ansari and Salohuddin 1973; Nazaki 1973) (43).

Existen, en química clínica, varios procedimientos analíticos fundamentados en la medida del grado de enturbiamiento producido en la reacción antígeno-anticuerpo; estos métodos inmunológicos conocidos son: Inmunodifusión Radial (IRD), Nefelome-

tría y Turbidimetría.

El tiempo de determinación varía; desde 48hrs., 1hr. y 60 segundos respectivamente; y se requieren antisueros de afinidad y título relativamente elevados procedentes de conejos, cabras, bovinos, cobayos y de agentes polímeros para acelerar la reacción.

El método turbidimétrico (inmunoquímico) requiere de polímeros lineales solubles en agua; como el Polietilenglicol 6000 (PEG), el cual no forma parte de los complejos antígeno-anticuerpo y probablemente actúa por exclusión esférica de macromoléculas para el dominio del polímero, aumentando así la velocidad de la reacción antígeno-anticuerpo (6).

La tendencia actual en los laboratorios de análisis clínicos es la automatización de los procedimientos analíticos, con el fin de simplificar y obtener en el menor tiempo posible resultados óptimos, para detectar el grado de concentración y normalidad de un suero.

Los primeros métodos empleados en química clínica que se adaptaron a la automatización, fueron espectrofotométricos, pero en la actualidad aumenta más el interés de desarrollar nuevas técnicas y métodos para la investigación clínica empleando métodos inmunoquímicos, propiciando el diagnóstico inmunológico al servicio de la Salud Pública.

Al trabajar en el laboratorio de Inmunología del Hospital de Especialidades del Centro Médico la Raza, en donde se realiza el método de Nefelometría, empleando un Nefelómetro Laser, los reactivos y antisueros proporcionados por la Química Hoechst, se pensó, en desarrollar la adaptación de la técnica Turbidi-

métrica para la determinación de proteínas plasmáticas, usando los mismos reactivos que por Nefelometría, pero contando con un aparato óptico simple, como un espectrofotómetro de fuente de luz de tungsteno, que pudiese estar al alcance de los laboratorios con menores recursos económicos; el propósito de este tema de tesis es estandarizar el método de Turbidimetría para beneficiar a una mayor población de pacientes en el diagnóstico y monitoreo de diferentes padecimientos, con las ventajas de su cuantificación de proteínas plasmáticas específicas en casi todos los fluidos orgánicos, con la misma sensibilidad y especificidad del método inmunoquímico Nefelométrico.

II

GENERALIDADES

A) INMUNOGLOBULINAS

Son proteínas producidas por células plasmáticas derivadas de linfocitos B activados por el antígeno, tienen propiedades estructurales comunes y poseen la capacidad para combinarse específicamente con el antígeno inductor. Todas las moléculas de inmunoglobulinas constan de dos partes de cadenas polipeptídicas. El par más largo, compuesto de dos cadenas pesadas, tiene doble peso molecular que las cadenas más cortas, llamadas cadenas ligeras. Se han identificado cinco tipos diferentes de cadenas pesadas; las inmunoglobulinas se clasifican de acuerdo a cada tipo de cadena pesada existente (9).

Caracteres comunes.-

La secuencia en aminoácidos de la cadena pesada determina las propiedades biológicas de la molécula. Cada clase ó subclase de inmunoglobulinas posee una secuencia de aminoácidos invariable, que comprende del 75% de la cadena (segmento constante) y que es la misma para todos los miembros. La especificidad individual **-capacidad para combinarse únicamente con un antígeno-** reside en la secuencia de los aminoácidos del segmento variable, localizado en el extremo carboxi-terminal (C-terminal) de las cadenas pesada y ligera. La porción variable comprende alrededor del 50% de la secuencia de la cadena ligera y un 25% de la cadena pesada.

Las inmunoglobulinas, polipéptidos complejos con una configuración tridimensional altamente estructurada, pueden ser inmunogénicas si se introducen en huéspedes de otras especies (6).

B) Propiedades físicas y químicas.-

Los anticuerpos pueden caracterizarse por sus propiedades físicas, químicas e inmunológicas (con mucho las más específicas). Entre las propiedades fisicoquímicas más importantes empleadas para clasificar a los anticuerpos, se encuentran su solubilidad en sales y solventes, movilidad electroforética, tamaño molecular y sedimentación en la ultracentrífuga. Electroforéticamente, la mayor parte de los anticuerpos caen dentro de las fracciones gama y β_2 de las globulinas; unos cuantos caen dentro de las alfa-globulinas (9).

Mediante análisis por ultracentrifugación, los anticuerpos se dividen en dos clases principales:

- 1.- aquellos con peso molecular próximo a 1.5×10^5 daltones y coeficiente de sedimentación de 7S.
- 2.- aquellos de peso molecular cercano a 9×10^5 daltones y coeficiente de sedimentación de 19S.

Sin embargo, algunas inmunoglobulinas con actividad de anticuerpo tienen coeficientes de sedimentación entre 9S y 11S.

En el proceso de fraccionamiento del plasma humano con etanol como solvente y a baja temperatura, la mayor parte de las inmunoglobulinas de 7S aparecen en la fracción II, como se observa en el siguiente cuadro.

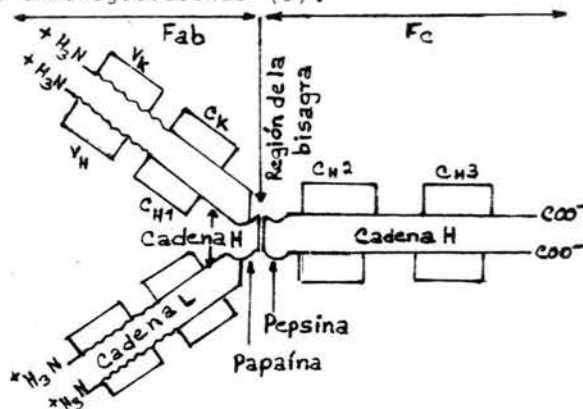
Algunas propiedades físicas y biológicas de clases inmunoglobulinas humanas

Clase	Concentración sérica media (mg/100ml)	Peso molecular	S ₂₀	supervivencia media (semidesintegración) T/2 (Días)	Función biológica	Receptores en	Denominación de la cadena pesada	Número de subclases
IgG ó γ G	1240	150,000	7	23	Fija complemento, Cruza placenta, Ac heterocitotrópico	Polinucleares, linfocitos, monocitos	γ	4
IgA ó γ A	280	170,000	7,10,14	6	Ac secretorio, Vía de proferidina	Polis, linfocitos, monocitos	α	2
IgM ó γ M	120	890,000	19	5	Fija complemento	Linfocitos	μ	1
IgD ó γ D	3	150,000	7	2.8	Receptor en sup. del linfocito	_____	δ	2
IgE ó γ E	0.03	196,000	8	1.5	Ac reagínico, Ac homocitotrópico	Cel. cebadas, linfocitos	ϵ	1

c) Estructura de las inmunoglobulinas.-

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas heterogéneas compuestas de 82% a 96% de polipéptidos y de 4 a 18% de carbohidratos; la parte protéica por 4 cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (H) con doble peso molecular formado de 450 aminoácidos y dos cadenas ligeras de menos peso molecular (L) constituida por 215 residuos de aminoácidos; las cuatro cadenas polipeptídicas están unidas entre sí por puentes disulfuro y fuerzas no covalentes como se muestra en la siguiente figura.

Cada cadena polipeptídica contiene una porción aminoterminal, la región variable (V) y una porción carboxilo terminal que corresponde a la región constante (C); la variabilidad de aminoácidos en la región variable es la que confiere la heterogeneidad de las inmunoglobulinas (9).



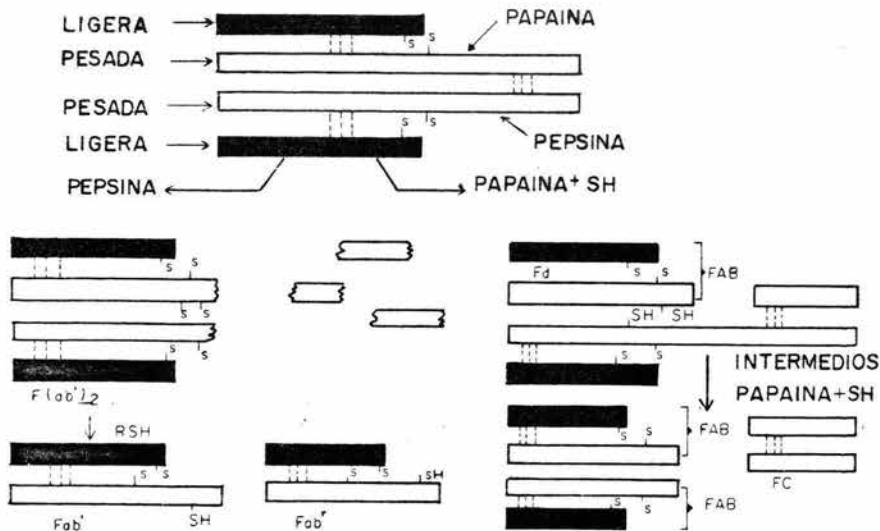
Las cadenas polipeptídicas tridimensionalmente no existen en secuencia lineal sino que están plegadas por puentes disulfuro en regiones globulares denominadas como dominios; en las cadenas H (V_H , CH_1 , CH_2 , CH_3 , y CH_4) y los dominios en las cadenas L se denominan como: V_L y C_L .

El sitio de combinación con el antígeno es la pequeña porción del fragmento Fab formada por un número pequeño de aminoácidos en la región V de las cadenas H y L. Las cadenas ligeras tienen un PM aprox. de 23,000 y se clasifican de 2 tipos: kappa (κ) y lamda (λ) y las encontramos en forma igual (κ, κ ó λ, λ) en cada molécula.

D) DIGESTION ENZIMATICA Y AGENTES REDUCTORES PARA DISOCIAR LAS INMUNOGLOBULINAS.

Porter 1959 empleó la papaína para digerir IgG y obtener 2 fragmentos Fab' (fijadores de Ag) y 1 fragmento Fc (cristalizable). En 1960 Nisonoff y cols. utilizaron otra enzima proteolítica, la pepsina que produce 1 molécula de (Fab')₂ que si precipita con Ag; está molécula está compuesta de 2 unidades Fab y la región de la bisagra, con enlaces disulfuro intercadena H (9).

ESTRUCTURA DEL ANTICUERPO



Los fragmentos $F(ab)^2$ contienen los sitios de unión para los determinantes antigénicos; la porción central de la cadena H llamada "**región de la bisagra**" permite que los 2 brazos de la molécula se inclinen para acomodar antígenos de diferentes tamaños y conformaciones (9).

**E) FACTORES GENETICOS ASOCIADOS CON INMUNOGLOBULINAS:
FACTORES G_M, I_{NV} Y A_M.**

Se ha comprobado que con moléculas de inmunoglobulinas son transportados marcadores genéticos. Los 2 primeros identificados se denominaron factores G_m e I_{nv} y se descubrieron por el siguiente método indirecto (51).

Los sueros de algunos pacientes con artritis reumatoide aglutinan los globulos rojos cubiertos de globulina gamma humana. El anticuerpo antiglobulina gamma contenido en el suero de estos individuos se llama factor reumatoide (RF). Se comprobó que la reacción entre el RF de una persona determinada y los globulos rojos revestidos de globulina gamma era inhibida por la incubación previa del suero reumatoide con suero de personas normales. Algunos sueros normales inhibían un factor reumatoide particular, otros no lo hacían. Se comprobó que la capacidad para inhibir una reacción particular se heredaba en forma mendeliana, y que las sustancias inhibitoras en un suero normal eran inmunoglobulinas. Cierta número de factores hereditarios que reflejan loci diferentes han sido descubiertos en esta forma, y guardan relación con las diversas cadenas pesadas de IgG, o con el tipo de k de cadena ligera. Los factores asociados con la cadena pesada de IgG se denominan G_m (por - gamma) y los asociados con la cadena ligera se llaman I_{nv} (abre-

viatura del nombre de un paciente) ó, a veces, Km (análogo a Gm). Hay más de 20 factores Gm y 3 Inv reconocidos. Como se comprobó más recientemente, se han descubierto 4 subclases diferentes de IgG y los diversos factores Gm están asociados con una de esta subclase. La base química de los factores Gm e Inv se describirá más tarde. Es importante señalar que los factores Gmv e Inv no son alélicos o sea que se heredan uno independientemente de otro.

Se ha descrito otro grupo de marcadores genéticos asociados con IgA que se hereda en forma independiente. Los reactivos para identificar tales factores se han descubierto a consecuencia de transfusiones. Algunos pacientes han sido inmunizados en esta forma con una IgA genéticamente diferente de la propia. De manera similar, sin advertirlo, se han producido anticuerpos alotípicos anti-IgA, y sus manifestaciones clínicas han sido reacciones de transfusión ligeras a graves. Se han descubierto diferentes factores genéticos, y se ha aplicado el término "Am" (refiriéndose al equivalente de IgA en Gm) a ese sistema.

En los 3 sistemas (Gm, Inv, y Am) el anticuerpo descubridor es de origen humano. En los 2 primeros frecuentemente se trata de factor reumatoide pero, como el tercer factor, es provocado a veces por transfusión. Como las diferencias químicas entre alotipos son mínimas (un solo aminoácido en el caso del factor Inv), el descubrimiento a requerido el empleo de anticuerpos generados en la misma especie. Se han buscado diferencias alotípicas entre proteínas de otras especies, y se han descubierto inmunologicamente por inmunización dentro de la especie, admitiendo que el sistema de reconocimiento del animal inmunizado descubrirá diferencias menores entre el antígeno inmunizante y sus propias proteínas (51).

Como era de prever, los diversos factores Gm están asociados con subclases específicas de IgG, y los diversos factores Am están asociados en forma similar con subclases específicas de IgA. Hasta aquí en el sistema humano no se han descubierto marcadores alotípicos para la cadena ligera γ ó para la cadena pesada μ , δ ó ϵ .

F) INMUNOGLOBULINA G (IgG) .-

En los adultos normales, la IgG humana constituye aproximadamente 75% del total de las inmunoglobulinas del suero. Dentro de la clase de IgG, las concentraciones relativas de las 4 subclases son aproximadamente como sigue: IgG1, 60-70%, IgG2, 14-20%, IgG3, 4-8% e IgG4, 2-6%.

Estas cifras varían algo de individuo a individuo y se correlacionan con la presencia de ciertos marcadores alotípicos de la región constante (C) de la cadena H.

La IgG es la única clase de inmunoglobulinas que pueden atravesar la placenta en el humano y es la responsable de la protección del recién nacido durante los primeros meses de su vida. También es capaz de fijar el complemento del suero. Su PM es aproximadamente de 150,000, la concentración en el plasma es de 900-1200 mg/dl, su vida media es de 25 días, su coeficiente de sedimentación es de 7S, movilidad electroforética es en la porción gamma, tiene la capacidad de neutralizar toxinas y virus, presenta un 4% de carbohidratos (9).

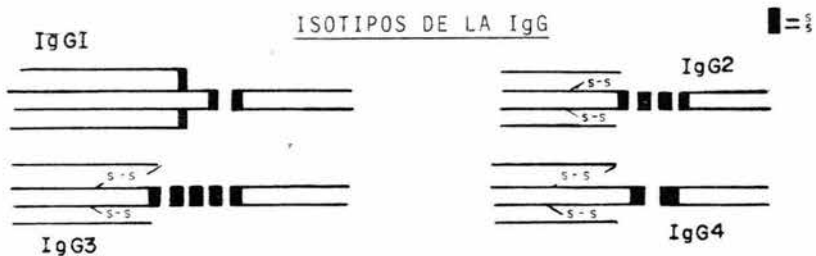
G) POLIMORFISMO GENETICO.-

La heterogeneidad de las inmunoglobulinas que da origen a las subclases con alotipos (marcadores genéticos que se encuentran solo en las regiones constantes de las cadenas H y que son designadas como el sistema Gm). Para las cadenas ligeras λ no se conocen marcadores alotípicos, para k se conocen como: Inv (1), Inv (2), Inv (3); estos alotipos antigénicos específicos se encuentran distribuidos en forma diferente de acuerdo al grupo racial y también reflejará la historia geográfica en la evolución del hombre y sus raíces con respecto a diferentes enfermedades infecciosas y el porque los hombres presentan diferente susceptibilidad ó resistencia a enfermedades.

ISOTIPOS.-

Cadenas pesadas: las variaciones de los determinantes antigénicos nos da una variación estructural obteniéndose diferentes subclases; IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Cadenas ligeras: los marcadores genéticos se encuentran solo en las cadenas ligeras (Kern+/Kern-) en donde hay una substitución del aminoácido #154 por glicina o serina; el Oz+/Oz- esta determinado por una substitución en el residuo del aminoácido #190 por lisina ó arginina.



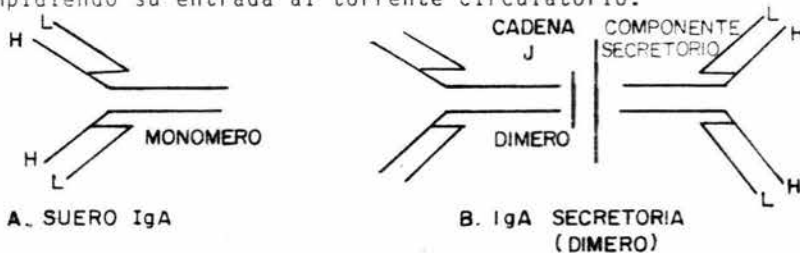
IDIOTIPO.-

La variabilidad se encuentra en la región variable de las cadenas pesadas (H) y ligeras (L): posición de las cadenas pesadas (31-35), (50-65), (81-87) y (95-102), para las cadenas ligeras en la posición; (25-34), (55-60) y (89-97).

H) INMUNOGLOBULINA A (IgA).-

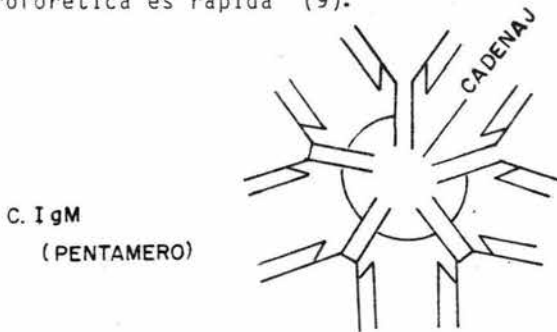
La molécula de IgA puede presentarse como monómero en la circulación; en fluidos de secreción se presenta como dímero el cual consiste de 2 monómeros de IgA unidos por una pieza secretoria mediante una cadena J producida por las células epiteliales. PM de 400,000, concentración en plasma de 60-390mg/dl su vida media es de 7 días, coeficiente de sedimentación 7S, su movilidad electroforética es rápida, presenta un 10% de carbohidratos. Su papel principal es el de inactivar virus más que bacterias ya que para ser un buen anticuerpo contra bacterias, requeriría tener la capacidad de activar el complemento; indirectamente facilita la opsonización de bacterias - (complejo bacteria -IgA) más fácil de ser fagocitado por los macrófagos (9).

Otra función de la IgA es la prevención de enfermedades alérgicas ya que se une a antígenos (alimentos, polenes y polvo) impidiendo su entrada al torrente circulatorio.



I) INMUNOGLOBULINA M (IgM).-

Es la primera inmunoglobulina producida por la respuesta inmune, se sintetiza en su mayor parte en el bazo y tiene una importancia vital en la defensa contra bacteremias y septicemias. La IgM es la fijadora del complemento más eficiente, debido a su estructura espacial pentámero con 10 terminaciones o valencias uniéndose fuertemente a: cápsula de neumococos y membrana de bacilos gram negativos. La IgM no traspasa la barrera placentaria, pero en el recién-nacido es la primera en sintetizarse como respuesta a un estímulo antigénico antes que la IgG. Su PM es de 900,000, su concentración en plasma es de 40-280mg/dl, su vida media es de 5 días, presenta un 15% de carbohidratos, su coeficiente de sedimentación es de 19S, su movilidad electroforética es rápida (9).



J) EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

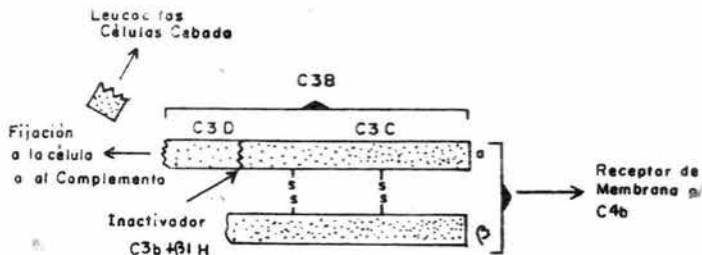
El complemento es un sistema de moléculas protéicas cuya interacción secuencial produce efectos biológicos sobre la superficie de las membranas, sobre la futura conducta celular y sobre la interacción de otras proteínas. Como mínimo circulan 11 proteínas diferentes en el plasma normal, todas ellas inactivas por sí mismas pero destinadas a jugar un papel específico.

co cuando se ha iniciado la secuencia de la activación. Esta puede empezar por medio de reacciones antígeno-anticuerpo IgG ó IgM, ó después de un contacto con la IgA agregada, con ciertos polisacáridos o lipopolisacáridos que se hallan en la naturaleza ó con productos de activación de sistemas de la coagulación (9).

Estas acciones recíprocas conducen a la generación de la actividad biológica. Las secuelas biológicas de la activación de este sistema fluctúan desde la lisis de un espectro de diferentes clases de células, bacteria y virus, hasta la mediación directa de los procesos inflamatorios. Además, el complemento está capacitado para reclutar otros sistemas efectores humorales y celulares y conseguir la 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.

K) COMPLEMENTO 3 (C3).-

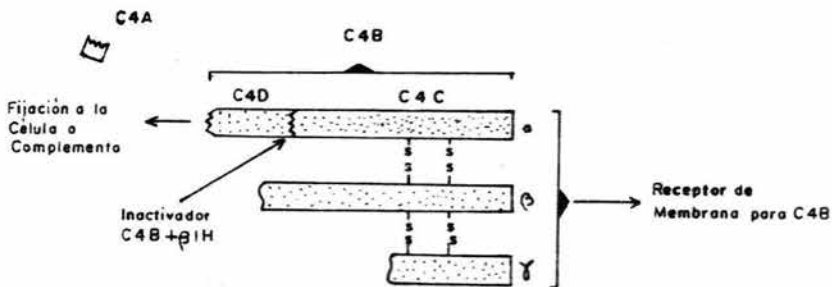
El C3 es un componente del complemento de naturaleza protéica y que al igual que los demás componentes C1-C9 reacciona como una cadena enzimática secuencial que culmina finalmente en una respuesta inflamatoria. El C3 es una B1-globulina, con un PM de 180,000, es termoestable cuya estructura está formada por 2 cadenas polipeptídicas ($\alpha - \alpha_1$) y B ligadas por uniones disulfuro; se encuentra en suero fresco como globulina C3B1C y en forma espontánea por envejecimiento se transforma en una globulina inactiva CB1A(7S). El C3 por acción de la convertasa se fragmenta en 2: C3b y C3a en la vía clásica del complemento (36).



MODELO ESQUEMATICO DE LA MOLECULA C3

L) COMPLEMENTO 4 (C4).-

El C4 es una B1-globulina con un PM 206,000, en este caso el C1 rompe con un solo enlace peptídico localizado en la cadena más grande de las 3 cadenas polipeptídicas de esta molécula, la cadena alfa. Esta reacción conduce a la formación o generación de sitios lábiles de enlace en el fragmento mas grande de C4, C4b, que permite que se fije a las células ó a las membranas biológicas durante un breve lapso después de la generación. C4a es el pequeño péptido producido por el desdoblamiento de C4 por C1. Su papel biológico aún no ha sido probado (36).



MODELO ESQUEMATICO DE LA MOLECULA C4

M) IMPORTANCIA CLINICA

Desde el punto de vista clínico, las alteraciones en la tasa de las inmunoglobulinas y complemento con respecto a los valores de referencia obtenidos de una "población normal" se conocen como: **DISPROTEINEMIAS Y PARAPROTEINEMIAS.**

Disproteinemias.-

Hipergamaglobulinemia (policlonal) se caracteriza por el aumento de IgG, IgA, IgM y se encuentra generalmente en las inflamaciones crónicas, enfermedades autoinmunes y otras.

La gamopatía policlonal muestra aumento patológico de la fracción gamma, especialmente en inflamaciones crónicas con reacción mesenquimatosa de tipo proliferativo ó fibroso y con proliferación de células plasmáticas: cirrosis hepática, brucelosis, hepatitis crónica, poliartritis crónica, endocarditis lenta, linfogranuloma venereo, sarcoidosis, lepra, septicemia, toxoplasmosis, LES, glomerulonefritis, anemia hemolítica, etc.



Hipergamaglobulinemia monoclonal.-

Característicos del Mieloma ó Plasmocitoma y de la Macroglobulinemia de Waldenström; la 1a. esta dada por el aumento de IgG ó

de IgA, mientras que la 2a. exhibe un incremento de la inmunoglobulina IgM.



Paraproteinemias.-

Las paraproteinemias son aquellas proteínas con características fisicoquímicas diferentes a las de las proteínas normales. En la actualidad se sabe que estas no son proteínas anormales sino que se encuentran en el organismo en estado normal en muy baja concentración, las más importantes son:—crioglobulinas, proteína de Bence Jones, paraproteinemia amiloide, cadenas pesadas.

Hipogamaglobulinemia.-

La alteración consiste en disminución o incluso ausencia de inmunoglobulinas y esto debido a un defecto en la síntesis ó por pérdida ó incremento del catabolismo como ocurre en: síndrome nefrótico, desnutrición, leucemia linfocítica crónica, síndrome postirradiación ó posterior al uso de drogas citotóxicas.

Padecimientos con alteración en el complemento.-

Las anormalidades en la concentración sérica de complemento esta asociada a procesos patológicos y se deben a: ENFERMEDADES ADQUIRIDAS Y ENFERMEDADES CONGENITAS.

Vía clásica: LES, artritis reumatoide, síndrome shock hemorrágico, síndrome nefrótico, asma bronquial, urticaria idiopática, deficiencia alfa₁ antitripsina, anemia hemolítica autoinmune, leucemia, enfermedad del suero y cáncer.

Vía alterna: glomerulonefritis, LES, artritis reumatoide, dengue, bacteremia gram negativa, hemoglobinuria, penfigo bulgaris y dermatitis herpetiformis.

N) REACCIONES ANTIGENO-ANTICUERPO

Existen innumerables anticuerpos capaces de reaccionar específicamente con innumerables antígenos. Los resultados de las reacciones Ag-Ac, no obstante, caen dentro de relativamente pocos tipos o categorías. Estos efectos se derivan de las características físicas y espaciales de la molécula de antígeno, y de las propiedades físicas y biológicas de la molécula de anticuerpo. Puede sacarse provecho en el laboratorio de estas propiedades para crear puntos finales de reacción rápidamente detectables para estudios in vitro (8).

Los anticuerpos son proteínas hidrosolubles, pero pueden unirse o ser unidos a membranas u otras superficies. Pueden ser incorporados a medios sólidos o semisólidos. Pueden marcarse con marcadores radiactivos, fluorescentes o con gran densidad

de electrones. En forma purificada pueden servir como antígenos para inducir la formación de sueros antinmunoglobulina si se introducen en un huésped no humano. Los antígenos se presentan en muy variadas formas: proteína, carbohidrato, lipoproteína o lipopolisacáridos; soluble o particulado; isotópicamente inherente o marcado con elementos radiactivos; unido a membranas ó partículas ó existiendo independientemente en forma de moléculas grandes o pequeñas. Las características del antígeno y del anticuerpo determinan la forma física en que tendrá lugar la reacción antígeno-anticuerpo (8).

Los puntos finales visibles mas utilizados en las pruebas del laboratorio incluyen la precipitación, aglutinación, formación de inmunocomplejos e iniciación o inhibición de actividades biológicas (8).

N) ANTISUEROS

El antisuero monoespecífico que se aplica en turbidimetría y nefelometría se puede adquirir de diversas casas comerciales. La calidad en conjunto, y la variabilidad entre los lotes dependerá, desde luego, de la fuente de origen. Ya sea que el antisuero se compre o se prepare en el laboratorio debe establecerse un procedimiento para control de título y especificidad de lotes nuevos de material, ya que ambos factores pueden influir marcadamente en el rendimiento del método. Un antisuero libre de lípidos provee resultados aceptables. Para reacciones más sensibles, en las que el blanco del antisuero debe ser lo más bajo posible, es recomendable la utilización de antisuero correspondiente a la fracción gammaglobulina (6).

Los antisueros elaborados y proporcionados por la Química Hoechst normales (N) contra las seroproteínas humanas son sueros de origen

animal y se obtienen mediante inmunización de conejos con las seroproteínas humanas correspondientes. Los anticuerpos inespecíficos se eliminan con fracciones proteicas ligadas a un sustrato (inmunoadsorción de la fase fija). El contenido de anticuerpos y la especificidad de los antisueros se calibran, después de un examen especial, de tal modo que quede garantizada una adecuación óptima de su empleo en los nefelómetros de Behringwerke. Los antisueros son utilizables también en la mayoría de las otras técnicas inmunoquímicas de precipitación.

Los títulos de los anticuerpos se obtienen por inmunodifusión radial simple y estan impresos en las etiquetas de los frascos. Estos títulos expresan cuantos UI (ó g) de 1ml (ó l) del antisuero correspondiente precipitan en un gel de agarosa (contenido de agarosa aprox. 10mg/ml). Por un procedimiento de estabilización especial se separan las proteínas séricas lábiles de los antisueros. Las contaminaciones microbianas son excluidas en gran parte por filtración estéril y adición de agentes de conservación. Estos son: azida sódica (máx. 1g/l), p-etilmercurio-mercaptop-benzol-sulfonato de sodio (max. 0.1g/l).

Los antisueros N conservados entre +2 y +8°C son estables hasta la fecha indicada como caducidad (expiración) siempre que se pueda evitar la contaminación. Los antisueros N siguientes estan aprobados por el Instituto Paul-Ehrlich, Organismo Federal de Sueros y Vacunas (Alemania);

Antisuero N de conejo contra la IgG humana/cadena gamma

Antisuero N de conejo contra la IgA humana/cadena alfa

Antisuero N de conejo contra la IgM humana/cadena mu

Antisuero N de conejo contra la C3 humana

Antisuero N de conejo contra la C4 humana

0) ESTANDARIZACION

La variabilidad de los resultados de los métodos turbidimétricos y nefelométricos en el análisis cuantitativo de proteínas por métodos inmunoquímicos, se debe principalmente a 2 factores: el material de referencia y la preparación del antisuero. Con el fin de evitar diferencia con los diferentes sueros calibradores o de referencia en el mercado (Behring, Hyland, Beckman etc.), se llegó a un acuerdo con la O.M.S. y con la International Reference Preparation for Serum Immunoglobulins y para mantener una línea de constancia intralaboratorial o interlaboratorial, debe asegurarse un suministro confiable de material de referencia y antisuero, de calidad uniforme, preparándolos uno mismo o mediante un arreglo con el proveedor para que proporcione siempre el mismo tipo de material autorizado (6).

El Std. (standar) de referencia de la Química Hoechst es una mezcla de sueros de adultos sanos que tiene un control de calidad c.v. 2%. Una comparación de los standar preparados internacionalmente con las proteínas standar de Behringwerke dió, en la inmunodifusión radial, la siguiente relación entre las concentraciones indicadas por Behringwerke (mg/dl ó g/l) y las unidades internacionales (U/ml):

IgG	1mg = 11.5 U1	Transferrina	1mg = 35 U1
IgA	1mg = 59.5 U1	Albumina	1mg = 2.5 U1
IgM	1mg = 115 U1	Ceruloplasmina	1mg = 320 U1
C3	1mg = 128 U1	C4	1mg = 320 U1
	Alfa ₁ -antitripsina	1mg = 42 U1	
	Alfa ₂ -macroglobulina	1mg = 320 U1	

Los agentes de conservación son los mismos empleados en los antisueros. Los sueros standar se conservan entre +2 y +8°C.

entre +2 y +8⁰, es estable durante una semana. Durante este tiempo la solución sólo podrá ser reutilizada si los frascos se han mantenido hermeticamente cerrados.

La Calibración.-

En el laboratorio clínico es usual calcular la concentración de una substancia de una muestra desconocida relacionada con la concentración de un standar de referencia, realizando una curva de calibración (28).

Una curva de calibración nos señala: linealidad de la reacción, límites de sensibilidad de la metodología, y límite de confiabilidad.

La reacción antígeno-anticuerpo no es lineal, es una curva Gaussiana, matemáticamente ésta puede ser linealizable para que con un solo punto llevar a cabo la calibración.

$$H = \frac{MEC^2 (I - AC)}{I + (E - A) C}$$

*AEM = constantes para cada lote de antisuero

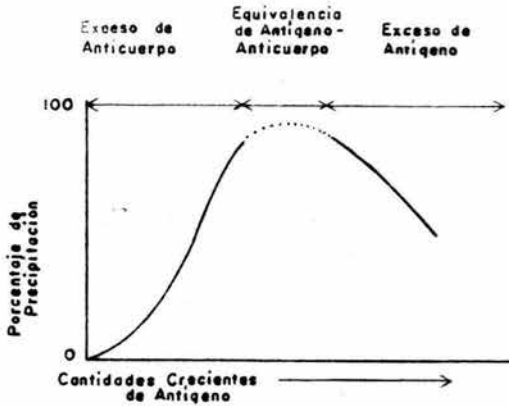
Los parámetros: 3 constantes matemáticas A, E, M. Estas constantes definen el tipo de curva para un lote de antisuero en particular y que es usado por microprocesador para convertir el valor del pico (H) de la muestra desconocida a una concentración (C).

P) REACCION DE PRECIPITACION

El antígeno y el anticuerpo solubles son invisibles en un medio líquido cuando reaccionan entre sí, las moléculas entrelazadas forman un complejo tridimensional que a menudo precipita en forma de masa visible e insoluble. La precipitación de un complejo Ag-Ac depende de la proporción entre ambos componentes. Si esta es óptima, las moléculas de Ag y de Ac se equilibran completamente, y el precipitado resultante contiene todas las moléculas previamente disueltas, obteniéndose el punto de equivalencia (5).

Cuando el anticuerpo está en exceso, los complejos precipitados insolubles contienen todo el antígeno disponible, pero permanece en el medio cierta cantidad de anticuerpo sin reaccionar. Si hay un exceso de antígeno, estos complejos Ag-Ac formados tienden a permanecer en solución. Como no hay precipitados visibles, es difícil detectar si ha tenido lugar o no la reacción.

Cuando la simple reacción de precipitación ya mencionada anteriormente se repite de manera más refinada, se puede obtener mucha información relativa a las características físicas de los anticuerpos y sus reacciones con los antígenos. Se coloca una cantidad mediada de anticuerpo de conejo en una serie de tubos de ensayo y se añaden cantidades variables de antígeno, se mezclan y se dejan reaccionar. Se forma un precipitado en varios de los tubos el cual se puede cuantificar por alguno de los métodos inmunoquímicos como Turbidimetría, Nefelometría e Inmuno-difusión Radial. Se obtiene una curva semejante a la siguiente:



Inicialmente no hay formación de precipitado. Si se prueba la fase líquida de esta mezcla se observa:

1.- Una zona de exceso de anticuerpo, en la cual se encuentra presente anticuerpo sin combinar.

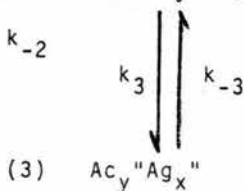
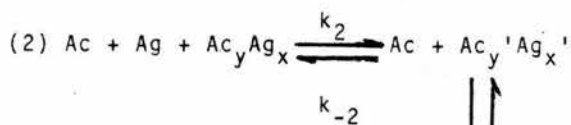
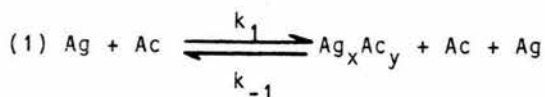
2.- Una zona de equivalencia, en la cual tanto el Ag como el Ac están completamente precipitados y no se encuentran presentes ni antígeno ni anticuerpo sin combinar. En esta zona hay también una fijación máxima del complemento.

3.- Una zona de exceso de antígeno, en la cual todo el anticuerpo se ha combinado con el antígeno y existe un antígeno adicional no combinado. En esta zona la precipitación está parcial o completamente inhibida, porque en presencia de un exceso de antígeno se forman complejos solubles de Ag-Ac.

La precipitación de complejos Ag-Ac puede ser cambiada por alteraciones en la temperatura, pH, y concentración iónica. Los Ag proteícos de PM $40-160 \times 10^3$ daltons, pueden dar curvas de precipitación con máximos afilados en la zona de equivalencia. Los antígenos como las proteínas desnaturalizadas, algunos virus y los polisacáridos, por ejemplo dan curvas amplias cuando reaccionan con el anticuerpo específico. Otros antígenos pueden tener carga excesiva en su superficie y ser difíciles de precipitar.

Q) TURBIDIMETRIA

El principio de reacción entre antígeno (Ag) y anticuerpo (Ac), para turbidimetría y nefelometría de punto final se cumple en 3 etapas (6).



(precipitado)

En esta reacción, k_1 es mucho mayor a k_2 y k_2 es mucho mayor que k_3 , y $\text{Ac}_y \text{ Ag}_x$, $\text{Ac}_y' \text{ Ag}_x'$, y $\text{Ac}_y'' \text{ Ag}_x''$ representan agregados de tamaño creciente. Ambas etapas, la 1 y 2 de la reacción, son importantes para la turbidimetría y nefelometría.

Con un exceso de anticuerpo, el antígeno reacciona durante la 1a. fase, produciendo un grupo relativamente homogéneo de complejos pequeños. La unión cruzada de estos complejos aumenta la heterogeneidad del grupo y provoca un incremento en la dispersión luminosa total medida. La cantidad y heterogeneidad de los complejos formados dependen de la relación con Ag-Ac. La relación entre concentración y dispersión luminosa es una

curva lineal en la mayoría de los casos. La concentración de antígeno de las muestras desconocidas, se halla comparando su dispersión luminosa relativa, con la de una muestra de referencia.

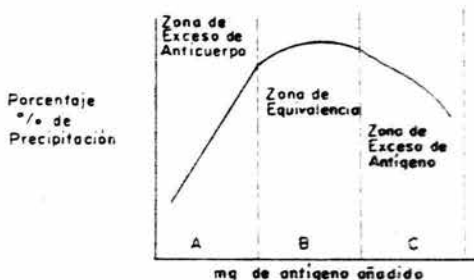
Las mediciones turbidimétricas son aceptables siempre que el número de partículas y su tamaño estén en un intervalo estrecho. Una luz de intensidad alta ó muy baja no habrá de incidir en el fotodetector, pues errores en el instrumento aumentarían otros errores en la medición (6).

La técnica de turbidimetría combina 2 metodologías:

- a) inmunoprecipitación b) turbidimetría

a) Inmunoprecipitación.-

El antisuero específico en solución, reacciona con el antígeno (del suero), para formar el complejo Ag-Ac de la solución, lo cual provoca dicha turbidez.

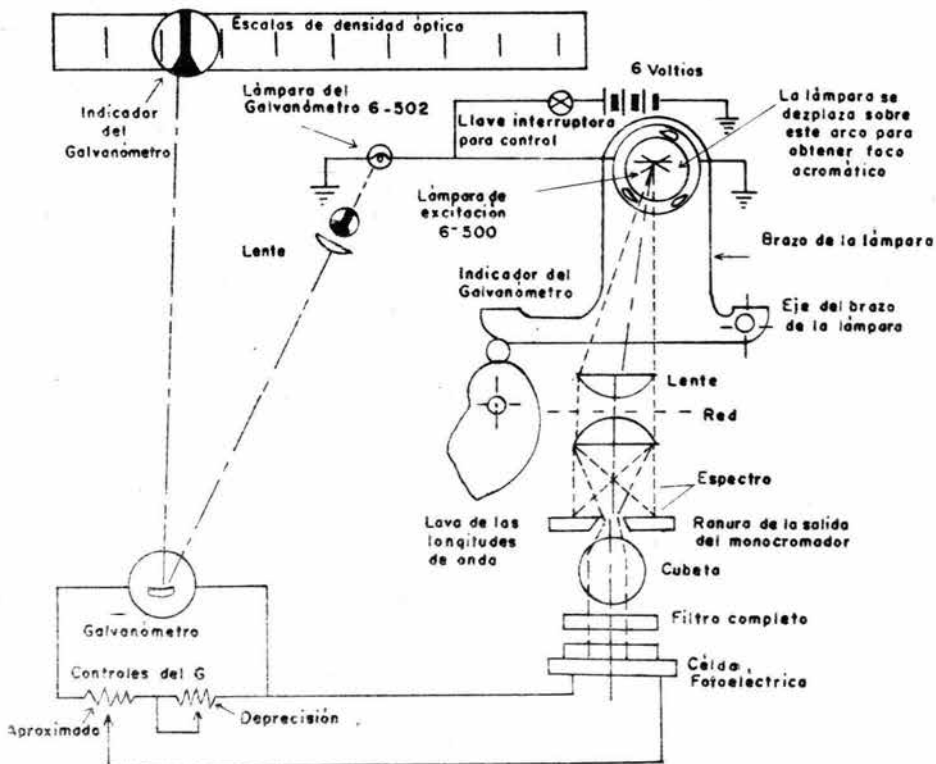


b) Turbidimetría.-

Las medidas de enturbiamiento pueden efectuarse en cualquier fotómetro o espectrofotómetro. El análisis fotométrico consiste en agregar, a una solución desconocida, un reactivo de composición tal que la reacción que se produzca forme una molécula ó un agregado con color característico, siempre que exista

una definida especie química. La reacción puede utilizarse para el análisis cuantitativo, si la intensidad o concentración del color producido es proporcional a la concentración de la sustancia que se desea hallar.

El análisis espectrofotométrico produce una luz de longitud de onda determinada (color). En este se presenta un sistema de doble lente, el cual es atravesado por un haz de luz y esta es dispersada y la dispersión se hace en forma proporcional a la longitud de onda. Debido al prisma, se obtiene un espectro brillante en la salida del monocromador. Esta será la luz que atravesará la solución coloreada que se quiere observar (4).



ESQUEMA DEL SISTEMA ELECTRICO Y OPTICO DEL ESPECTROFOTOMETRO CLINICO JUNIOR (COLEMAN INST., INC.)

Los valores obtenidos pueden estar en forma de A (absorbancia) ó bien de T% (transmitancia), aunque la pérdida de energía transmitida a través de la muestra se debe en realidad a la reflexión y refracción de los rayos energéticos por las partículas, tanto como a fenómenos de absorción real. Según la ley Rayleigh, cuando el tamaño de las partículas es inferior a la longitud de onda de la energía radiante incidente y la dispersión es directamente proporcional a la 4a. potencia de la longitud de onda. La reflexión se hace más importante a medida que el diámetro de partícula va siendo muy superior a la longitud de onda de la energía radiante incidente. En la práctica, la intensidad de la dispersión que una solución turbia efectúa, varía, aproximadamente como la inversa de la 2a. potencia de la longitud de onda. La relación existente entre $\text{Log } A$ y $\text{Log } \lambda$ es lineal (4).

Dado que la sensibilidad fotométrica aumenta al disminuir la longitud de onda, se conseguirá mayor sensibilidad en las técnicas turbidimétricas cuando se trabaje con luz azul, siempre y cuando, el medio en que esta situada la suspensión sea incoloro. En ocasiones, no obstante, se sacrifica hasta cierto punto la sensibilidad para minimizar los efectos de sustancias interferentes; así por ejemplo, en la prueba del enturbiamiento del timol se utiliza luz roja para minimizar la interferencia debida a la bilirrubina y a la hemoglobina eventualmente existentes en la muestra de suero que se analiza.

La sensibilidad aumenta si las partículas son opacas o muy coloreadas. Si el medio de suspensión tiene color, generalmente se obtiene una sensibilidad máxima efectuando la lectura a la longitud de onda correspondiente a la transmitancia máxima del medio (4).

Dentro de ciertos límites, la relación existente entre A y la concentración de las partículas suele ser lineal para partículas de pequeño tamaño.

R) Efecto del Polietilenglicol.-

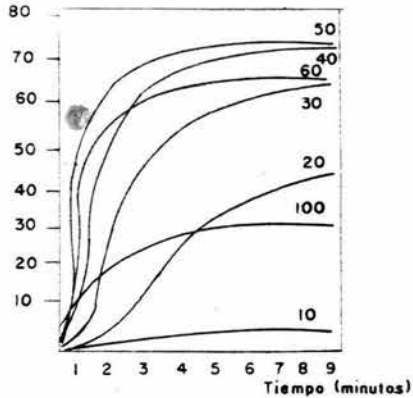
El polietilenglicol (PEG) es un polímero con PM relativo de 6000 a 7500 daltons, el cual se disuelve para formar soluciones verdaderas de igual forma que los solutos de menor PM, tales soluciones se forman espontáneamente y son termodinámicamente estables, al igual presentan la capacidad de dispersar la luz (10)

Mediante reacciones de polimerización es posible unir, por enlaces de valencia, un número grande de moléculas de PM relativamente bajo en una molécula única. Tales macromoléculas alcanzan cientos o miles de moléculas combinadas en una forma más ó menos repetida.

De esta forma, el polietilenglicol 6000 ha demostrado ser activo en reducir el volumen en grado equivalente al volumen de exclusión de las cadenas polímeras, aumentando así la velocidad de la reacción antígeno-anticuerpo.

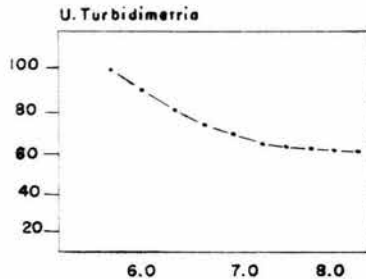
Las concentraciones descritas por A.A. Mihasy J. G. Spenny (1976), muestran que en concentraciones de 10 a 100 gr/l de polietilenglicol, la absorbancia mayor del grado de enturbiamiento de la reacción antígeno-anticuerpo se obtiene a una concentración de 50g/l siempre y cuando 5ul de un pool de suero humano sea diluido con 50ul del antisuero 1:5 como se observa. En la siguiente gráfica el efecto de la concentración de PEG durante la reacción de precipitación (29).

Efecto de la variación del PEG en la reacción de Precipitación
U. Turbidimetría



S) Efecto del pH.-

Las reacciones de precipitación requieren la presencia de sales y el pH debe estar cercano a la neutralidad. El efecto presentado a continuación nos muestra los valores del pH medidos bajo condiciones de reacción. El rango varía desde 5.5-8.7. El pH 7.0 fué elegido para condiciones óptimas (29).

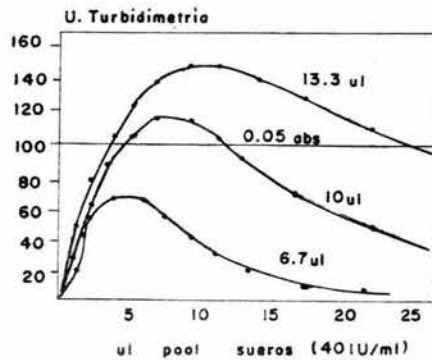
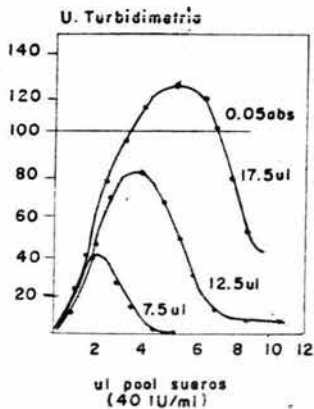


Efecto de la variación del pH en la reacción de precipitación. La turbidez fué medida después de tres minutos.

T) Efecto del antisuero.-

La importancia de éste en turbidimetría, radica en el pico de la curva de precipitación. Las lecturas deben ser hechas en la zona de exceso de anticuerpo, la extensión de la medida del rango es cercana a la pendiente de la curva, por consiguiente las lecturas deberán de excluirse de la zona de exceso de antígeno.

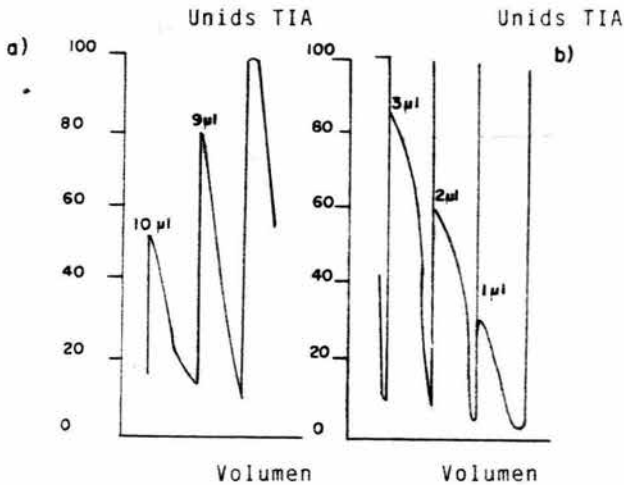
En las siguientes gráficas se muestra la variación de las cantidades de antisuero anti-IgA durante la reacción de precipitación. La gráfica de la izquierda muestra las curvas de precipitación que corresponden a: 7.5ul, 12.5ul y 17.5ul de 10 muestras de antisuero anti-IgA de cabra diluido 1:10, agregado a un pool de sueros con volumen de 10 ul. El tiempo de reacción de 3min. En la gráfica de la derecha, las curvas de precipitación corresponden a: 6.7ul, 10.0ul y 13.3ul de 10 muestras de antisuero anti-IgA de conejo diluido 1:10 agregado al pool de sueros con volumen de 20ul. El tiempo de reacción fué de 3min (29).



Ambas curvas de precipitación muestran que los antisueros empleados son los óptimos. Sin embargo estas muestran la misma turbidez en los 2 diferentes niveles de antígeno, uno en la zona de exceso de anticuerpo y el otro en el área de exceso de antígeno.

Respecto al prolongamiento de la curva de precipitación, el antisuero de conejo anti-IgA es más favorecido que el antisuero de cabra anti-IgA.

En las gráficas siguientes se muestra el diferente curso de patrón de precipitación en la zona correspondiente al exceso de anticuerpo (b) y el exceso de antígeno (a) (29).



U) Reacciones de punto final.-

Durante 1 a 2hrs. después de iniciarse la reacción entre antígeno y anticuerpo, los complejos inmunes continúan aumentando de tamaño. No obstante, $(dl_s/dt)^*$ disminuye en relación al tiempo requerido para medir incluso varias muestras. El tiempo necesario para alcanzar este "punto final", puede alterarse variando la fuerza iónica, la forma de los iones y su relación masa/carga, y la concentración del polímero en la solución (6).

La expresión "punto final" se ha de utilizar para describir aquellos métodos que emplean una sola determinación de luz dispersada, a un tiempo luego de iniciarse la reacción en que la velocidad con que varía la intensidad de la luz dispersada - (dl_s/dt) es muy pequeña.

Métodos cinéticos o diferenciales se consideran aquellos que utilizan una medida de dl_s/dt para evaluar la concentración de antígeno.

Los métodos de punto final tienen la ventaja de su simplicidad y adaptabilidad al equipamiento del laboratorio corriente. Una muestra representativa de las numerosas aplicaciones que se han descrito, figura en el cuadro #1. Los métodos de punto final utilizan una única determinación y por lo tanto requieren una segunda medición de la muestra para corregir la turbidimetría no específica. Además, a menos que se emplee una cubeta de flujo directo bien diseñada, se puede esperar un error del 2-3% en la medición de la dispersión luminosa, debido a la variación de la posición de las cubetas y al hecho mismo de utilizar distintas cubetas. A causa del grado de manipulación que implican, los métodos manuales de punto final se aplican mejor a un número reducido de muestras.

* Relación dispersión luminosa en relación al tiempo

CUADRO 1. Métodos turbidimétricos y nefelométricos de punto final

Método	Aparato
Transferrina	EM
Haptoglobina	EM
IgG, IgA, IgM	EA, AC
C3	EA
Lisozima	EM, NM
Ceruloplasmina	NM

+EM, espectrofotómetro manual; EA, espectrofotómetro automático; NM, nefelómetro manual; AC, analizador centrifugo.

V) Cinética de la reacción turbidimétrica.-

La variación de la dispersión luminosa en función del tiempo, puede por lo tanto relacionarse con la concentración inicial de antígeno simplemente representando dl_s/dt en función de la concentración. El dl_s/dt de una muestra desconocida, se puede comparar con un material de referencia conocido para obtener el resultado final.

La determinación cinética de reacciones químicas e inmunológicas provee ventajas significativas sobre la medición de punto final. La determinación diferencial elimina las interferencias estáticas y las variaciones por el uso de cubetas. Es posible realizar un análisis en segundos en lugar de horas ó días. El dl_s/dt para estas reacciones debe ser dos veces mayor que la perturbación electrónica inherente al instrumento. Ello significa que el título y afinidad del antisuero y la concentración del polímero son factores críticos para asegurar determinaciones sensibles y precisas. En el cuadro #2 se indican los métodos diferenciales representativos para la concentración y

cinéticas de inmunoglobulinas, C3 y C4 (6).

CUADRO 2. Métodos cinéticos de turbidimetría y nefelometría

Proteína	Aparato
C3, C4	AC
IgG, IgA, IgM	AC, EA, NA
Título, avidez del antisuero	EFD

+AC, analizador centrífugo; EA, espectrofotómetro automático; NA, nefelómetro automático; EFD, espectrofotómetro de flujo detenido

W) Aplicaciones clínicas de la turbidimetría.-

A) En la determinación de inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM, no obstante, es factible medir proteínas del suero a una concentración de 10:100ug/ml como haptoglobina, alfa-antitripsina y las inmunoglobulinas anteriormente citadas en muestras de transparencia normal. Se pueden utilizar filtros microporos para reducir las concentraciones de lipoproteínas (25).

B) Llevando a cabo una comparación de anticuerpos policlonales y monoclonales de IgG, se ha visto que estos últimos no producen complejos de tamaño por medición turbidimétrica al reaccionar con el antígeno (48).

C) Por turbidimetría también es posible medir la cantidad de proteína C reactiva en suero (47).

D) Para la cuantificación de complemento viral en la fijación de anticuerpos, producto de la velocidad de hemólisis de eritrocitos de carnero (cambio en absorbancia a 640nm/min) en presencia del complemento residual no fijado por la reacción Ag-Ac (50).

E) En la detección de complemento mediado a células nucleadas, el cual se basa en la medición turbidimétrica de sus-

pensiones celulares, este no requiere de ningún material radiactivo (45).

F) En la lisis "in vitro" de plaquetas por adición de sustancias en altas concentraciones cuantificando la capacidad citolítica del anticuerpo. Esto se resume en dos pasos:

- a) fijación de los anticuerpos a la membrana celular
- b) liberación de los componentes extra celulares dependientes por daño del complemento (40).

G) En la medición de la concentración de transferrina y hierro totales en suero.

H) También, en la medición de la velocidad de precipitación de la reacción albúmina-antialbúmina por el cambio de densidad óptica se puede decir, que la precipitación máxima es directamente proporcional a la velocidad máxima de la concentración del antígeno (41).

I) Finalmente, en la prueba de turbidez de la hepatitis B, la cual no solo, se forma por el antígeno HBs-complejos inmunes (CIC), sino también por complejos de interacción del antígeno HBs de albúmina polimerizada (46).

x) NEFELOMETRIA

La nefelometría consiste en la estimación de la cantidad de luz dispersada por una solución, a un ángulo específico, o la suma de las dispersiones, en un arco dado, alrededor de la solución.

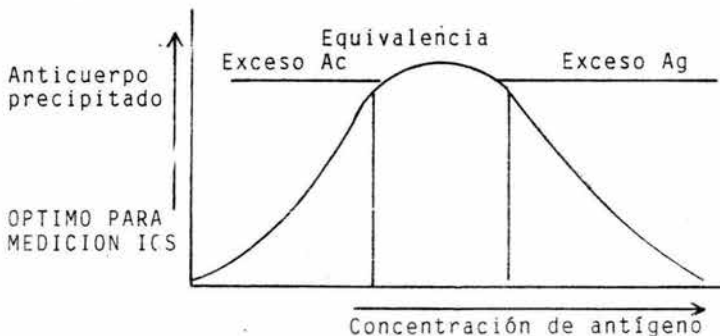
Todas las referencias posteriores a la expresión luz dispersada serán aplicables tanto a la nefelometría como a la turbidimetría, puesto que existe una relación directa entre estas técnicas.

Este método combina dos metodologías:

- a) inmunoprecipitación b) nefelometría

a) Inmunoprecipitación.-

La reacción de precipitación se lleva a cabo cuando reaccionan de manera específica un antígeno y un anticuerpo, esta reacción puede ser dividida en 3 zonas: exceso de anticuerpo, punto de equivalencia y exceso de antígeno (28).



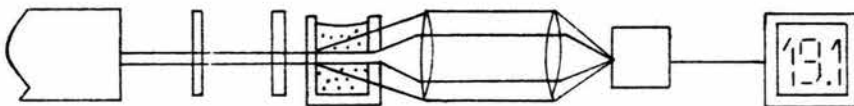
En la zona de exceso de anticuerpo todos los sitios antígenicos están cubiertos por el anticuerpo, en el punto de equivalencia

la concentración de Ag y Ac están balanceadas y en la zona de exceso de Ag, las moléculas de Ag libre permanecen en el sobrenadante después de que todas las moléculas de anticuerpo reaccionaron.

Como puede observarse en la gráfica anterior de "reacción de precipitación" la reacción inmunoquímica decrece (rama descendente) con el incremento en la concentración de antígeno.

Es por eso que en la nefelometría automatizada la determinación debe hacerse en la rama ascendente ya que en equivalencia y exceso de Ag no hay relación lineal directa entre la concentración de antígeno y densidad óptica.

En la inmunonefelometría se usa como reactivo un antisuero potente y ópticamente claro al cual se le ha adicionado un colorante fluorescente para ser detectado por el sistema óptico. En el inmunosistema en el método manual no se requiere de un colorante fluorescente como indicador.



laser He-Neón paso cubeta sist. lentes foto- voltímetro
 óptico diodo digital

b) Nefelometría.-

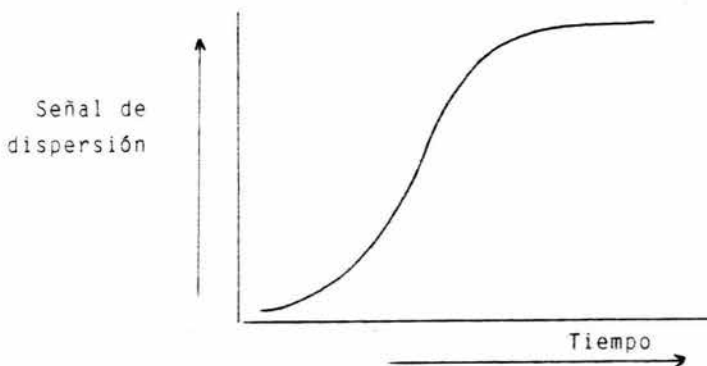
La fuente de luz para el nefelómetro laser, es un laser Helio-Neón con una longitud de onda de 632.8nm. El laser emitido

pasa a través de 2 hendiduras de una entrada óptica y la celdilla que contiene la mezcla para su medida permite que la luz seá dispersada. A diferencia del nefelómetro convencional, en el cual la luz dispersada en un ángulo de 90° es medida, el nefelómetro laser detecta solamente la luz dispersa hacia adelante enfocada en un fotodetector con un sistema de lentes. La señal eléctrica del fotodetector es directamente proporcional a la intensidad de luz desviada y puede ser medida por medio de un voltímetro digital (30).

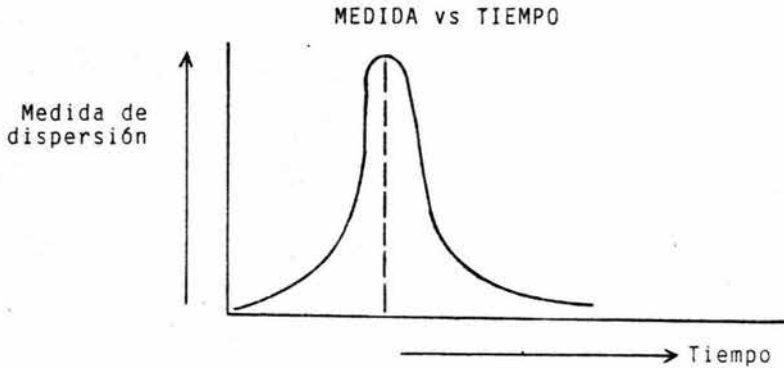
El nefelómetro es el sistema óptico empleado para medir y monitorear la cinética de la reacción Ag-Ac ya que al formarse agregados moleculares provocan turbidez de la solución la cual se medirá como un incremento en la dispersión de la luz incidente.

El sistema ICS está acondicionado para que cuando se dispare la reacción por adición del anticuerpo el colorante fluorescente incluido en el reactivo seá detectado por un detector de fluorescencia y se active todo el sistema óptico midiendo la dispersión. La intensidad de la dispersión está en función del tiempo en la reacción Ag-Ac (28).

DISPERSION vs. TIEMPO



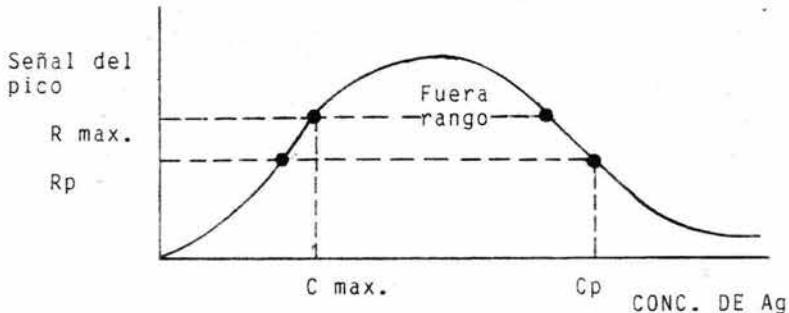
La medida del cambio de la dispersión está dada por la 1a. derivada de la señal nefelométrica, producida por la formación de complejos Ag-Ac; la cual coincide con el pico máximo de altura que posteriormente decrecerá como puede observarse en la siguiente figura: (28).



El incremento del pico corresponde a la concentración del antígeno presente en la muestra; después decrece al entrar en la zona de exceso de antígeno.

Dependiendo de los valores de referencia para cada una de las proteínas plasmáticas se ha fijado la dilución óptima para su determinación por el método ICS, la cual caerá en C_{max} . para evitar errores por el exceso de antígeno (35).

DIAGRAMA DE DETECCIÓN DE EXCESO DE ANTIGENO



C max. = concentración máxima

R max. = señal del pico producida por C max.

Cp. = por debajo de la concentración fisiológica

Rp. = señal del pico producido en Cp.

Detección de exceso de antígeno.-

Se hacen varias diluciones y al efectuarlas se verá si es proporcional el resultado o bien adicionando más antígeno se verá si reacciona con incremento en la dispersión.

III

OBJETIVO

III OBJETIVO

- A) Montaje y adaptación de un método turbidimétrico, utilizando los mismos reactivos que se emplean en nefelometría, con la ventaja de utilizar un aparato óptico como el espectrofotómetro con una fuente de tungsteno para la cuantificación de proteínas plasmáticas.
- B) Estandarización de la reacción de inmunoprecipitación mediante cinéticas de tiempo y de concentración Ag-Ac.
- C) Evaluación estadística del método turbidimétrico determinando su especificidad, sensibilidad, interferencia y precisión.
- D) Obtener los valores de referencia de IgA, IgG, IgM, C3 y C4 de sueros normales por Turbidimetría, Nefelometría e Inmunodifusión Radial (IDR) de una población mexicana.
- E) Tipificación del tipo de Mieloma después de su caracterización por electroforé^usis.
- F) Correlacionar los valores normales y anormales obtenidos por Turbidimetría, Nefelometría e Inmunodifusión Radial mediante métodos estadísticos.

IV

MATERIAL Y METODOS

IV MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron varios grupos:

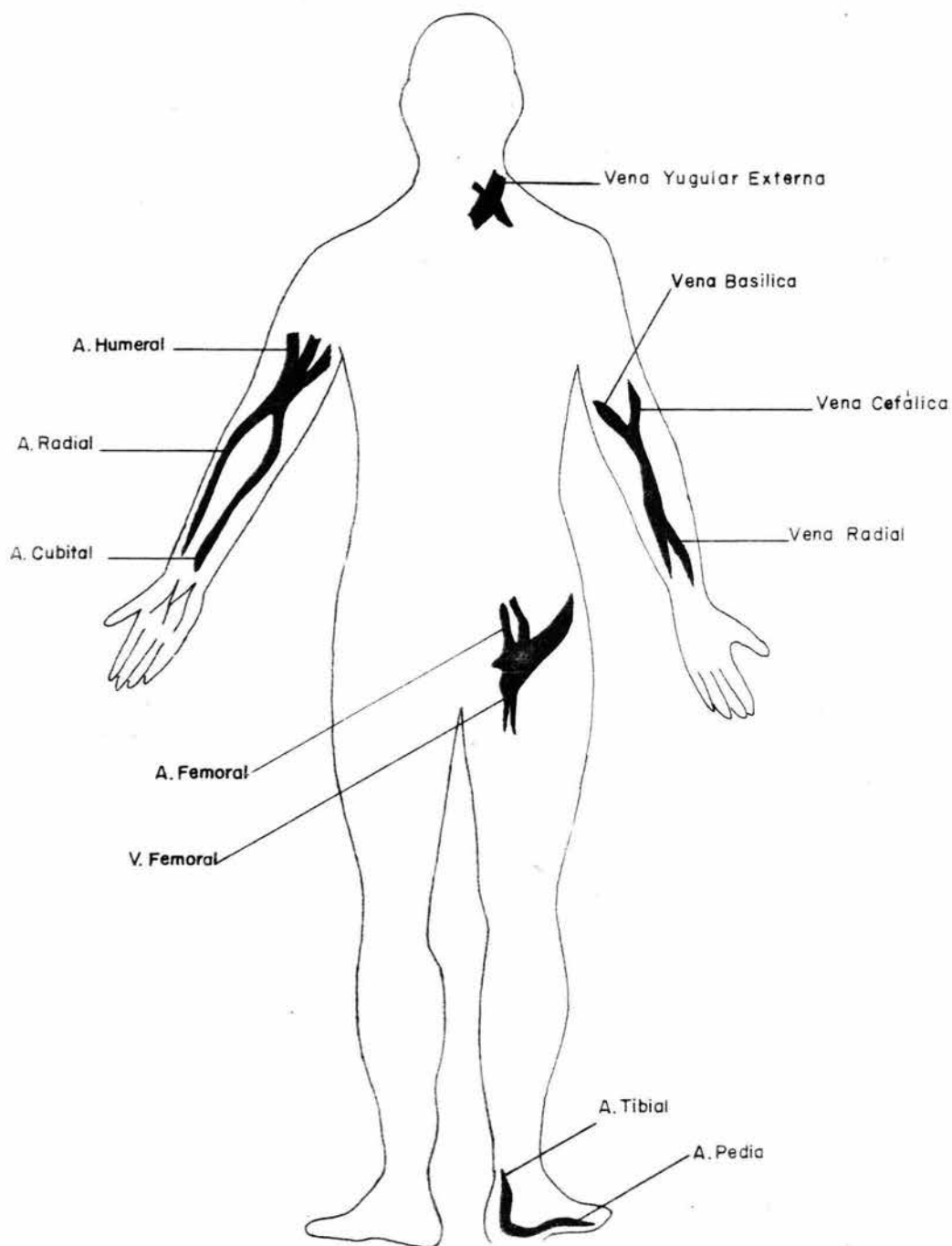
- A) 20 individuos de ambos sexos y edad de 20 a 40 años sanos, para valores de referencia.
- B) 10 individuos con diagnóstico de Mieloma Multiple (sueño anormal).
- C) 20 individuos sanos, para su correlación con las técnicas de Turbidimetría, Nefelometría e Inmunodifusión Radial (IDR).
- D) 10 individuos sanos, para conformar un pool de sueros para realizar el control de calidad mediante intraensayo e interensayo.

MATERIAL BIOLÓGICO.-

En todos los casos, las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa cubital en ayunas de 8hrs. y en tubos sin anticoagulante para la obtención del suero. Centrifugar 10min a 3000rpm.

Las inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM) y los componentes del complemento (C3 y C4), de los sueros son estables por lo menos durante 2 semanas si se les conserva a 4°C , e indefinidamente a -70°C . Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

OBTENCION DE LA MUESTRA.



TURBIDIMETRIA

A) FUNDAMENTO.-

El principio de la medición de Turbidimetría es determinar la cantidad de luz bloqueada por la materia en forma de partículas cuando la luz atraviesa la cubeta, cuantificando la reacción de inmunoprecipitación antígeno-anticuerpo. La cantidad de luz bloqueada por una suspensión de partículas en una cubeta depende no solo del número de partículas presentes sino también del área de sección transversal de cada partícula, es decir, si el tamaño de la partícula de los estándares no es el mismo que el tamaño de partícula en las muestras que se miden, se tendrán errores en las mediciones turbidimétricas.

B) MUESTRA BIOLÓGICA.-

Sueros normales y anormales de los pacientes en estudio.

C) MATERIAL.-

- 1.- Tubos de ensayo de 10X70mm
- 2.- Tubos de ensayo de 13X100mm
- 3.- Pipetas lineales de 10ml, 5ml, 2ml, y 1ml.
- 4.- Micropipetas Clinicon de 50ul y 25ul
- 5.- Micropipetas Ependorff de 200ul y 100ul
- 6.- Puntillas para micropipetas Ependorff de 200ul
- 7.- Puntillas para micropipetas Oxford Brand de 100ul, 50ul y 25ul
- 8.- Matraces aforados de 1000ml
- 9.- Matraces erlenmeyer de 500ml, 250ml y 100ml

- 10.- Vasos de precipitados de 500ml, 250ml, 100ml y 10ml
- 11.- Gradillas metálicas de diferentes capacidades

D) APARATOS.-

- 1.- Balanza granataria
- 2.- Potenciómetro Beckman
- 3.- Centrífugas Dupont Instruments Sorvall GLC-2B
- 4.- Espectrofotómetro Carl-Zeiss Mod. PM2DL
- 5.- Espectrofotómetro Coleman Junior Mod. 8 ó 20

E) REACTIVOS.-

- 1.- Polietilenglicol (PEG) 6000 a 7500
- 2.- Buffer de fosfatos salino (PBS) 0.1M (preparado comercialmente) y NaCl 0.15M
- 3.- Antisueros (anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-C3 y anti-C4)
- 4.- Agua bidestilada
- 5.- Tween 20

Preparación.-

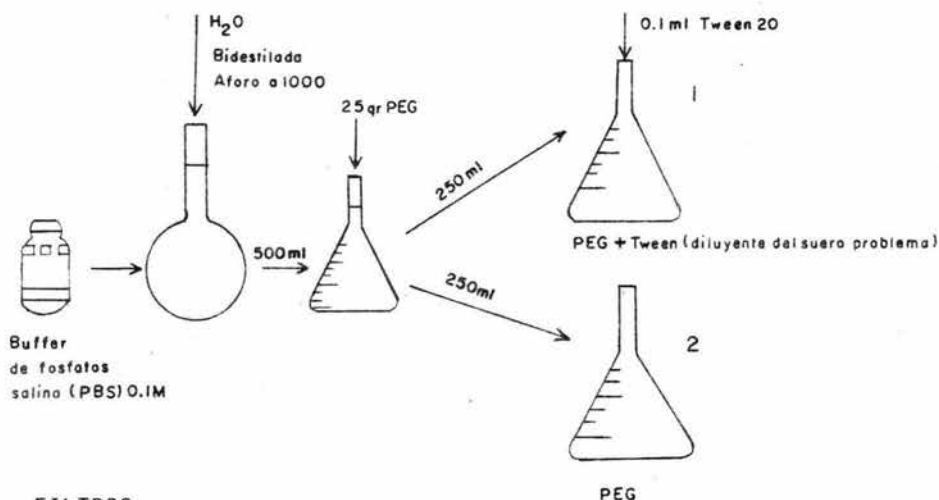
Diluyente.-

Disolver la concentración de fosfatos y NaCl en un litro de agua bidestilada y llevar aforo.

Tomar 500ml del volumen anterior y disolver 25gr de PEG a 2 matraces 1 y 2, repartir de esta solución 250ml a cada uno. Al matraz #1 agregar 0.1ml de tween 20. Esta solución será la empleada como diluyente del suero problema.

El matraz #2 será el empleado como diluyente del antisuero (contiene solo el PEG polietilenglicol). Ambos diluyentes se mantienen estables durante 2 meses a una temperatura de 2 a 8°C.

Nota.- Después de haber ensayado experimentalmente la dilución del polietilenglicol, (10, 100, 20, 30, 60, 40 y 50g/l) se observó que la dilución adecuada corresponde a 50g/l.



F) FILTROS

Filtros Millipore 0.45um (utilizado para filtrar el diluyente)

G) ANTISUEROS

Los antisueros, proporcionados por Química Hoechst son obtenidos por la inmunización de conejos, son adsorvidos en fase sólida y sus lípidos eliminados para proveer antisueros transparentes, conocidos como de "grado nefelométrico". Los lotes comercialmente empleados son:

- anti-IgG humana cadena γ lote # 153042 B
- anti-IgA humana cadena α lote # 153143 C
- anti-IgM humana cadena μ lote # 153257 A y 153256 G
- anti-C3 humana lote # 153318 A
- anti- C4 humana lote # 153525 H y 153531 D

Todos estos antisueros vienen en frascos de 1ml a 5ml en medio líquido. Los antisueros, conservados entre 2 y 8°C son estables hasta la fecha indicada en la etiqueta, siempre que se pueda evitar una contaminación.

H) ESTANDARIZACION Y CALIBRACION.-

Los sueros estandar de referencia de la Química Hoechst corresponden a los siguientes lotes:

- estandar de referencia lote# 067630 B empleado en las curvas de calibración y cinéticas de reacción de las inmunoglobulinas IgG, IgA, e IgM.
- estandar de referencia lote# 067628 D empleado en la curva de calibración y cinética de reacción del complemento C3
- estandar de referencia lote# 067631 H empleado en la curva de calibración y cinética de la reacción del complemento C4

Todos estos estandares vienen en frascos de 1ml. Conservados entre 2 y 8°C, son utilizables hasta la fecha indicada en la etiqueta del frasco, una vez abiertos son estables durante una semana.

I) METODO

- 1.- La dilución inicial de los sueros estandar y problemas a valorar se realiza con la solución de polietilenglicol-tween 20. Esta dilución dependerá de las diferentes proteínas a analizar.
- 2.- Los antisueros se diluyen 1:10 con la solución de polietilenglicol para todas las proteínas.
- 3.- La mezcla de la reacción se compone de 1000ul de antisuero y 50ul del suero estandar o problema para la IgG; para las demás proteínas IgA, IgM, C3 y C4 la mezcla se compone de 500ul

del antisuero y 200ul del suero estandar o problema.

4.- Al mezclar el antígeno y anticuerpo se debe medir la reacción en forma continua desde $T_1=10\text{seg.}$ a $T_2= 300\text{seg.}(5\text{min.})$ Es conveniente trazar la curva de la cinética de reacción de cada una de estas proteínas, observando de esta manera la velocidad de unión de los complejos Ag-Ac.

Técnica para la Estandarización del Método Turbidimétrico.-

La cinética de reacción se determina para cada una de las proteínas plasmáticas. El volumen del suero estandar es de 200ul para todas las proteínas; a diferencia de la IgG el cual es de 50ul.

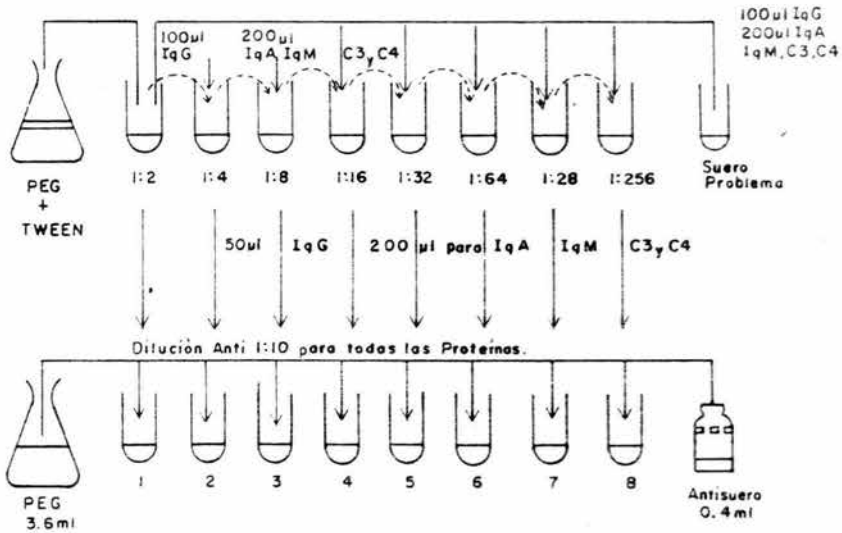
- I) Diluciones del Std.de calibración.-
 - a) Se enumeran 8 tubos de 10X70mm y ponga a cada uno de ellos 100ul de solución PEG-Tween 20.
 - b) Ponga 100ul de suero estandar en el tubo #1, mezcle perfectamente y pase al siguiente tubo 100ul, mezcle y continúe en la misma forma hasta llegar al tubo #8 (esto es para la IgG). Diluciones en serie (1:2, 1:4, etc.). Para las demás proteínas plasmáticas, a cada uno de los 8 tubos se ponen 200ul de PEG-Tween20 y 200ul del suero estandar al tubo #1, mezcle perfectamente y pase al siguiente tubo 200ul, mezcle y continúe en la misma forma hasta llegar al tubo #8.
 - c) Enumere 8 tubos más de 10X70mm y ponga a cada uno de ellos 1000ul del antisuero diluido 1:10 (3.6ml PEG + 0.4ml anti-suero). A cada uno de estos tubos se les agrega un volumen de 50ul de la dilución del suero estandar (de cada uno de los 8 tubos anteriores respectivamente) para la IgG; - para las demás se agrega un volumen de 200ul de la dilución del suero estandar de los 8 tubos anteriores.
 - d) Estos volúmenes se les irá agregando uno por uno con el

objeto de medir la cinética de reacción por cada dilución.

- e) Tomar las lecturas de absorbancia a partir de 10seg. hasta 300seg., ó antes si la reacción ya se ha completado en su totalidad. A cada lectura se le resta la lectura del blanco de antisuero (1050ul PEG para IgG y 700ul PEG para las demás proteínas), para obtener la lectura real. Leer en el espectro de absorción a 340nm.

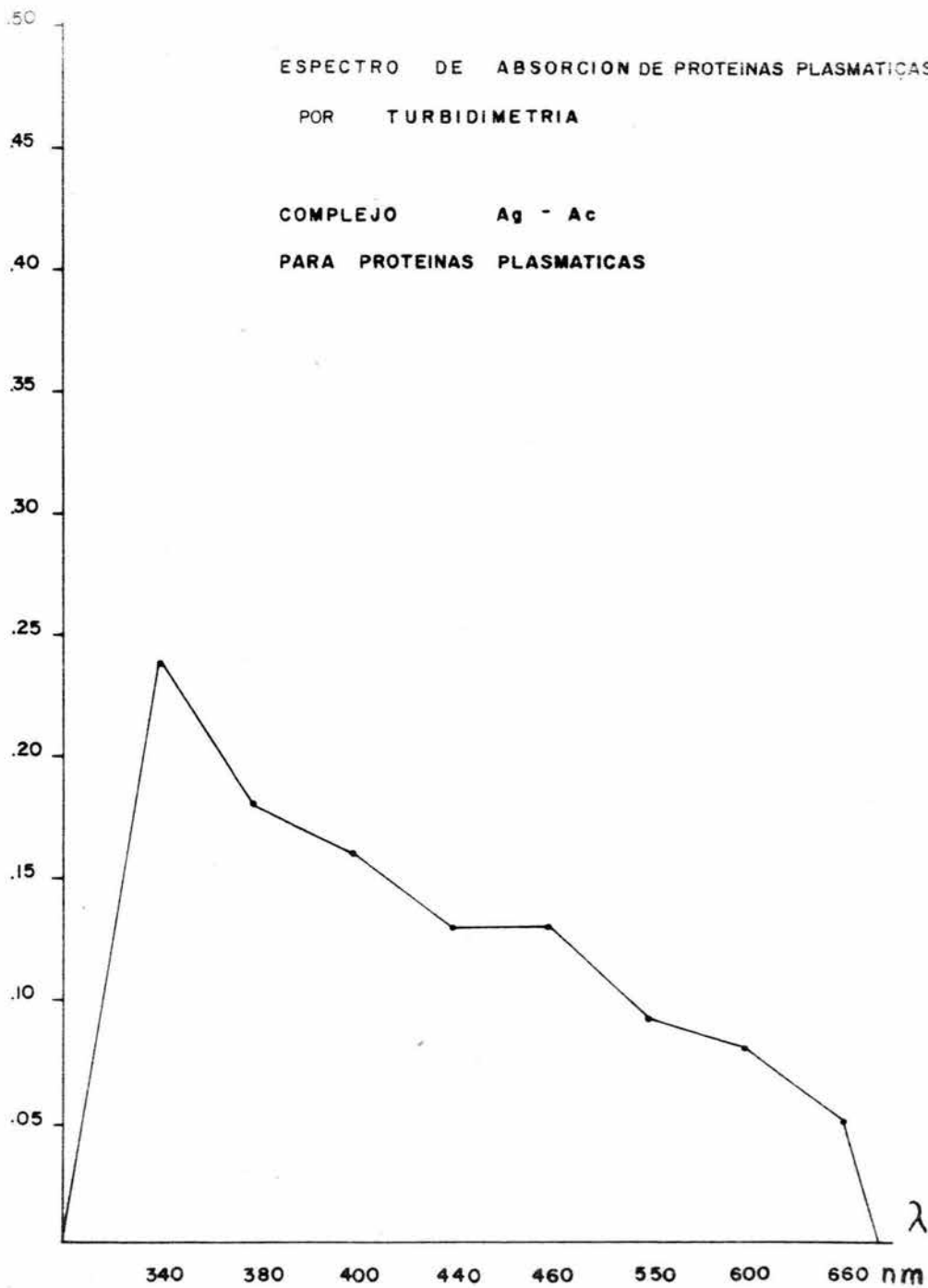
IqG	IqA	IqM	C3	C4	Proteína Plasmática
50 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	200 μ l	Volumen del suero Problema diluido
1000 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	500 μ l	Volumen del Antisuero diluido

100ul IqG
200 IqA
IqM, C3 y C4



ESPECTRO DE ABSORCION DE PROTEINAS PLASMATICAS
POR TURBIDIMETRIA

COMPLEJO Ag - Ac
PARA PROTEINAS PLASMATICAS



Grafica No 28

5.- Curva de calibración.-

La variación de la absorbancia medida durante un intervalo de 285seg en una muestra de referencia conocida, se presenta en función de la concentración. Mediante una curva de calibración es cuantificable la absorbancia en proporción a la concentración de cada proteína a valorar. Una curva de calibración nos muestra linealidad de la reacción, límites de sensibilidad de la metodología y límite de confiabilidad.

Técnica.-

- a) Se enumeran 8 tubos de 10X70mm y ponga a cada uno de ellos 100ul de solución PEG-Tween20 para la IgG; para las demás proteínas se pone 200ul.
- b) Ponga 100ul de suero estandar en el tubo #1, mezcle perfectamente y pase al siguiente tubo 100ul, mezcle y continúe en la misma forma hasta llegar al tubo #8 (1:2, 1:4, etc. 1:256) para la IgG; para las demás proteínas, a cada uno de los 8 tubos se ponen 200ul, mezcle y continúe en la misma forma hasta llegar a completar las 8 diluciones correspondientes (1:2, 1:4, etc.)
- c) Enumere 11 tubos de 10X70mm para cada una de las proteínas y agregue un volumen de PEG-tween20 como sigue:

IgG, IgM, y C3	1.45ml		
IgA	0.95ml	C4	0.45ml
- d) De todas y cada una de las diluciones anteriores (inciso b), tomar 50ul y mezclar en los primeros 8 tubos de cada una de las proteínas. A los tres tubos restantes agregar 50ul, 100ul y 150ul del suero estandar (frasco comercial listo) respectivamente, mezclar perfectamente. Quedando así 11 diluciones.
- e) Enumere 11 tubos más de 10X70mm y ponga a cada uno de ellos 1000ul del antisuero diluido 1:10 para IgG (9.9ml PEG +

1.1ml antisuero). Para las demás proteínas plasmáticas, a cada uno de los 11 tubos se le agrega 500ul del anti-suero diluido 1:10 (4.950ml PEG + 0.55ml del antisuero) (antisuero frasco comercial).

- f) A cada uno de los 11 tubos (antisuero diluido) agregar 50ul de los tubos que tienen la dilución del suero estandar (inciso d) para la IgG; para las demás proteínas agregar 200ul de la dilución del suero estandar a los 11 tubos. Mezclar y dejar reposar 5min
- g) Preparar un tubo por separado para blanco de antisuero (1050ul PEG para IgG; y 700ul PEG para las demás proteínas).
- h) Leer en el espectro de absorbancia a 340nm y restar la lectura del blanco.

Las proporciones de dilución y los intervalos de tiempo, pueden requerir modificaciones mínimas en función del título y la avidez de los antisueros seleccionados para estos métodos.

J) SUEROS PROBLEMA

Una vez que se ha trazado las curvas de calibración para cada una de las proteínas plasmáticas, las lecturas de los sueros problema obtenidas se extrapolan en cada curva.

Técnica.-

- a) Las diluciones de los sueros problema serán de acuerdo a la proteína a valorar: ejemplo.

C3, IgM e IgG	1:30 (suero estandar), Suero problema 1:30
IgA	1:20 (suero estandar), Suero problema 1:20
C4	1:10 (suero estandar), Suero problema 1:10
- b) Tomar un tubo de 10X70mm para cada una de las proteínas y poner 1000ul de la dilución de antisuero IgG 1:10 (indica-

do anteriormente) y agregar 50ul de la dilución del suero problema 1:30 (para IgG); para las demás proteínas se ponen 500ul de la dilución del antisuero IgA, IgM, C3 y C4 1:10 y agregar 200ul de la dilución del suero problema: para IgA 1:20, IgM y C3 1:30 y C4 1:10. Mezclar y dejar reposar 5min. Los Mielomas se diluyen 1:3 ó 1:2.

- d) Preparar un blanco para IgG de 1050ul de PEG y para las demás proteínas 700ul de PEG.
- e) Leer a 340nm y restar la lectura del blanco. Extrapolar los resultados en las curvas correspondientes.

K) CONTROL DE CALIDAD

Los métodos inmunoquímicos requieren de un control de calidad mediante análisis estadísticos: reproducibilidad, exactitud, linealidad, especificidad y sensibilidad.

Al llevar a cabo un programa de control de calidad no solo cumpliremos con obtener la confiabilidad de nuestros métodos sino que podremos obtener; valores de referencia, selección de metodologías (correlación) y estandarización de resultados.

Para el control de calidad de Turbidimetría se empleó el método de Levey y Jennings modificado por Hairline y Yoobs que utiliza sueros controles duplicados diarios y límites de aceptación de 95 y 99%.

Método.-

Este utiliza sueros control (pool de sueros). Se lleva el registro diario de datos para el trazo de las cartas X y R de la siguiente forma:

DIA	REPLICADOS		\bar{X}	R	R_s
	X_1	X_2	$\bar{X}=(X_1+X_2-2)$	$R=(X_1-X_2)$	$R_s=(\bar{X}_1-\bar{X}_2)$
1.-					
2.-					
3.-					
4.-					
5.-					
6.-					
7.-					
8.-					
9.-					
10.-					

Procedimiento.-

- 1.- En la columna (1) se registra el dato de la medición obtenida del duplicado 1.
- 2.- En la columna (2) se registra el dato de la medición obtenida del control 1.
- 3.- En la columna (3) se registra el promedio de ambos controles designado por la media de X (\bar{X}).
- 4.- En la columna (4) se registra la diferencia (rango) de los dos controles designados por R.
- 5.- En la columna (5) se registra la diferencia entre promedio de duplicados de un día con el anterior (en el primer día no se obtiene este dato porque no hay con que compararlo, sino a partir del segundo día en adelante) y este dato se obtiene de la columna (3), a diferencia de los promedios inter-día queda designados por R_s .
- 6.- Al término de 10 días, se calcula la media de la media de X ($\bar{\bar{X}}$) que es el promedio de los duplicados diarios, cuyo valor será el de la línea media de la carta de control.

$$\bar{\bar{X}} = \frac{\sum_{i=1}^{10} \bar{X}_i}{10}$$

V CALCULO DE LOS RESULTADOS

- 1.- Los valores de absorbancia de la curva de calibración y cinéticas de tiempo de cada proteína se calculan y se trazan en papel milimétrico de la siguiente manera:
 - a) Para las curvas de calibración se grafica la concentración (eje de las abscisas X) contra la lectura de la absorbancia (densidad óptica eje de las ordenadas Y). Los valores se corroboran estadísticamente mediante la prueba de la r de Pearson (regresión lineal de cada curva).
 - b) En las cinéticas de tiempo se grafica concentración y tiempo (X) contra la absorbancia D.O. (Y).
- 2.- Para la dilución óptima del antígeno, la diferencia de la lectura inicial (E_1) y final (E_2) de cada una de las cinéticas de tiempo nos da la extinción $E = E_2 - E_1$ (Y). Se traza contra la dilución del suero control (X).
- 3.- Extrapolar en las cartas de control de calidad, las lecturas del intraensayo e interensayo. En cada carta calcular la media (\bar{X}), desviación estandar (DS.) y coeficiente de variabilidad (C.V.) para determinar la precisión y confiabilidad del método. Trazar en papel milimétrico.
- 4.- Clasificar el patrón electroforético de los proteingramas para sueros con diagnóstico de Mieloma. Comparación entre las medias \bar{X}_1 y \bar{X}_2 de dos muestras, para saber si ambas pertenecen a la misma población mediante la T de student.
- 5.- Para la correlación, entre los métodos de Turbidimetría, Nefelometría e Inmunodifusión Radial, requirió cada uno de estos estadísticamente de la prueba r de Pearson. En

7.- La horquilla o rango promedio \bar{R} $\bar{R} = \frac{\sum i^{10} = 1R}{10}$

8.- La horquilla de promedios interdías \bar{R}_s $\bar{R}_s = \frac{\sum i^9 = 1R_s}{9}$

9.- Utilizando estos valores y factores estadísticos, se calculan los límites de aceptación de la carta de control:

Límite del 95% = $\bar{X} + (\bar{R}_s \times 1.77)$ (control superior)

Límite del 95% = $\bar{X} - (\bar{R}_s \times 1.77)$ (control inferior)

Límite del 99% = $\bar{X} + (\bar{R}_s \times 2.37)$ (control superior)

Límite del 99% = $\bar{X} - (\bar{R}_s \times 2.37)$ (control inferior)

10.- Se traza la "carta de control de las X". Con estos datos se puede ya trazar la carta de control de la variable \bar{X} . La línea media de la carta tendrá el valor \bar{X} y las líneas de aceptación serán los límites de control superior e inferior del 95% y 99% de probabilidades que se han calculado en el inciso 9.

Posteriormente a los diez días en que los datos han servido para trazar la carta de control, se sigue incluyendo el mismo pool y los resultados obtenidos en sus mediciones se grafican por medio de un punto de la carta de control de las X.

L.S.	99%	_____
L.S.	95%	_____
	\bar{X}	_____
L.I.	95%	_____
L.I.	99%	_____
DIAS		_____

Nota: Los límites de control del 95% corresponden con mucha aproximación a 2 DS. y los del 99% a 2.5 DS.

Las concentraciones obtenidas del pool de sueros que se utilizó para el control de calidad fueron para 100ul de suero:

IgG = 1357mg IgA = 285mg IgM= 110mg C3 = 73mg C4 = 15.0mg

Técnica.-

- a) Se obtuvieron muestras de 10 individuos normales por punción venosa cubital en tubos sin anticoagulante, posteriormente se centrifugan durante 10min a 3000rpm.
- b) Se separa el suero de cada uno de los tubos y se coloca en un vaso de precipitados, de esta forma se constituye el "pool de sueros".
- c) Se hacen alicuotas del pool en varios tubos en proporciones equivalentes a 0.5ml, se sellan y se almacenan a -4°C .
- d) De estas muestras se toman 2 tubos antes de congelarlos para checar por Nefelometría los valores normales de concentración de cada proteína; si estos son correctos, se procede finalmente a congelarlos.

NEFELOMETRIA

A) FUNDAMENTO

Al reaccionar en solución el antígeno con el anticuerpo produce la inmunoprecipitación, la cual es cuantificable mediante un Nefelómetro con un Laser de Neón-Helio como fuente de luz y dispositivos de detección sensible para medir la dispersión luminosa.

B) MUESTRA BIOLÓGICA

Sueros normales de pacientes en estudio.

C) MATERIAL

El material utilizado es el mismo que para el método de Turbidimetría, excepto, que los tubos para lectura son celdillas especiales y desechables.

D) APARATOS

- 1.- Nefelómetro Behring Laser Tipo Model I -B registro 131032/39428 100volts ampere.
Este Nefelómetro fluorométrico en línea, con una serie de flujos a través de canales, permite la medición de múltiples muestras de manera simultánea.

E) REACTIVOS

- 1.- Solución de NaCl al 0.9% (diluyente para las muestras)

F) ANTISUEROS

Son los mismos que se utilizan para turbidimetría.

G) METODO

En los puntos siguientes se describe el procedimiento para el análisis de proteínas plasmáticas del suero.

- 1.- En tubos de 12X75mm hacer una dilución 1:101, tomar 10ul para IgG, para los sueros problema, control y estandar. Hacer la dilución con solución salina.
- 2.- Hacer una dilución 1:5 del antisuero para todas las proteínas (0.5ml del antisuero + 2.5ml solución salina).
- 3.- Agregar a las cubetas de lectura 200ul del antisuero diluido 1:5; y 10ul de la dilución 1:101 del suero problema y estandar para IgG, 1ul del suero y estandar diluidos para IgA, IgM y C3, para el C4 agregar 5ul del suero problema y estandar diluidos 1:101.
- 4.- Agitar sin hacer burbujas. Incubar durante 1hrs. a temperatura ambiente. Para los Mielomas la dilución es: IgG 1:501, IgM 1:5, IgA 1:5.
- 5.- Leer en el Nefelómetro (agitar un poco antes de leer). El intenso enturbiamiento de las muestras puede alterar los resultados, especialmente en la zona de valores bajos. Las lecturas se hacen en proporción de volts/concentración.

Para trazar la curva de referencia para la determinación de proteínas plasmáticas, se prepara una serie geométrica de diluciones del suero N estandar de proteínas con solución isotónica de solución NaCl, estas son :

IgG= 1:20 - 1:640, IgA= 1:20 - 1:320, IgM= 1:10 - 1:160
 C3= 1:20 - 1:320, C4= 1:2.5 - 1:40

INMUNODIFUSION RADIAL (IDR)

A) FUNDAMENTO

El agar, es un gel semisólido capaz, de contener proteínas en suspensión. Las moléculas de anticuerpo o de antígeno soluble pueden moverse a través del medio semisólido, creando diferentes concentraciones en las distintas partes del gel.

La finalidad de todas las técnicas de inmunodifusión es identificar la reacción Ag-Ac por la reacción de precipitación. Al reaccionar en una capa de gel de agarosa el Ag-Ac produce un anillo de precipitación opaco pero visible, el cual es cuantificable.

B) MUESTRA BIOLÓGICA

Sueros normales de pacientes en estudio.

C) MATERIAL

- 1.- Placa NOR-Partigen para IgG, IgA, IgM, C3 y C4 con determinante antigénico A
- 2.- Behring-dispenser de 5ul
- 3.- Partigen-dispenser de 5ul
- 4.- Jeringa Hamilton
- 5.- Micropipeta Ependorff

D) APARATOS

- 1.- Plantilla de lectura para NOR-Partigen
- 2.- Proyector de medidas para inmunoanálisis de BehringwerkeAG

E) REACTIVOS

- 1.- Solución salina de NaCl al 0.9%
- 2.- Antisueros
- 3.- Suero control

F) ANTISUEROS

El antisuero se encuentra disuelto en la placa, (monoespecífico), el cual se obtiene por inmunización de conejos, (K), ovejas (S) ó cabras (Z). Las letras colocadas entre paréntesis en la etiqueta, indican la especie utilizada. Estas placas se conservan entre 2 y 8°C en envase cerrado. Evitar su congelación.

G) METODO

- 1.- Tirar de la orejuela de aluminio del recipiente, sacar la caja de plástico y dejar la placa abierta unos 5min. a temperatura ambiente, para que se evapore el agua de condensación que pudiera haberse formado en los pocillos.
- 2.- Depositar 5ul (0.005ml) en cada pocillo
- 3.- Para obtener volúmenes exactos, utilizar el Behring-dispenser de 5ul, el Partigen-dispenser de 5ul, la jeringa Hamilton-Mikroliter o la Micropipeta Ependorff.
- 4.- Para verificar la exactitud de la placa NOR-partigen depositar en el pocillo 1 el suero de control de NOR-partigen. Los pocillos 2 a 12 están destinados a recibir las muestras a analizar. Incubar 48hrs. a 37°C.
- 5.- Leer el diámetro de los anillos de precipitación con una exactitud de 0.1mm mediante un dispositivo adecuado. Utilizar la plantilla de lectura o el proyector.

ELECTROFORESIS

A) FUNDAMENTO

La electroforesis es la separación y medición de las sustancias cargadas electricamente, como las fracciones de las proteínas. Estas proteínas en solución emigran en un campo eléctrico y se separan quedando en diferentes porciones, de acuerdo a su carga eléctrica:

Albúmina, Alfa₁, Alfa₂, Beta y Gamma globulinas.

El análisis cuantitativo de las fracciones se hace por medio de un densitómetro que mide la intensidad de la luz reflejada por la fracción teñida ó la cantidad de luz transmitida.

B) MUESTRA BIOLÓGICA

Sueros anormales de pacientes con diagnóstico de Mieloma Múltiple.

C) MATERIAL

- 1.- Matraces aforados de 1000ml y 500ml
- 2.- Probetas de 100 y 500ml (graduadas)
- 3.- Recipientes de vidrio o plástico con cubierta
- 4.- Pinzas
- 5.- Aplicador de la muestra problema
- 6.- Membranas (de acetato de celulosa)
- 7.- Sobres de plástico

D) APARATOS

- 1.- Densitómetro o graficador

Contiene un accesorio analizador para microzona, el cual esta conectado directamente a un control de velocidad, controla la amplitud de la gráfica y se conecta directamente a la computadora en la cual se programan las muestras problemas, la cual da los resultados directamente.

2.- Cámara de electroforesis

E) REACTIVOS

- 1.- Solución buffer, barbital-ácido barbitúrico, pH 8.6
- 2.- Solución colorante fijadora rojo-ponceau S 0.2%
- 3.- Solución de enjuague ácido acético 5.0%
- 4.- Solución decolorante ácido acético y alcohol etílico

F) METODO

- 1.- Se carga el aplicador de 2 a 3 lamda (0.002 a 0.003ml) de suero problema
- 2.- Se llena el primer recipiente con la solución amortiguadora
- 3.- Se toma una membrana con las pinzas por un extremo y se sumerge en la solución amortiguadora. (impregne bien)
- 4.- Con las pinzas se saca la membrana de la solución y se coloca entre dos papeles secantes, para secar el exceso de solución (rapidamente).
- 5.- Con el aplicador que ya esta cargado con la muestra problema, se aplica sobre la superficie de la membrana, se presiona el botón y se esperan 10seg., la membrana absorbe toda la muestra.
- 6.- Se pasa inmediatamente a la cámara de electroforesis. Efectuar la electroforesis durante 20min.
- 7.- Se quita la membrana con las pinzas y se pasa al recipiente con el rojo-ponceau durante 10min.

- 8.- Se saca la membrana, se escurre y se pasa al recipiente con ácido acético al 5% y se enjuaga cuantas veces sea necesario para que quede clara.
- 9.- Se saca y se pasa al recipiente con ácido acético y alcohol etílico para clarificarla
- 10.- Se saca y se deja secar al aire
- 11.- Se coloca la membrana en un sobre se plástico, queda lista para cuantificarse y graficarse.
- 12.- Se prende el densitómetro, se esperan 10min para que se caliente.
- 13.- Se coloca el sobre de plástico que tiene la membrana, sobre la placa portamembrana.
- 14.- Se corre la placa y se espera que se complete ésta.
- 15.- Se saca la hoja de papel milimétrico con su gráfica y se toman los resultados.
- 16.- Los resultados que se obtienen de cada suero problema y su gráfica correspondiente nos informa el porcentaje, los gr/% y el porcentaje normal promedio de cada una de las fracciones.

La albúmina ocupa normalmente del 52 al 68% del valor protéico total, las globulinas que se han dividido en base a su movilidad electroforética en alfa₁, alfa₂, beta y gamma, el cociente albúmina/globulina y las proteínas totales.

En el Mieloma Multiple sólo se acumulan anormalmente una clase de moléculas de inmunoglobulinas. El exámen electroforético de éstas proteínas revela una banda bien definida que forma un pico muy alto y estrecho en el trazado del densitómetro. Recibe el nombre de "pico M", en el sentido del Mieloma; esta M no significa inmunoglobulina M. Se ha observado que más de la mitad de los pacientes con Mieloma Multiple producen IgG y un tercio IgA.

V

CALCULO DE LOS RESULTADOS

V CALCULO DE LOS RESULTADOS

- 1.- Los valores de absorbancia de la curva de calibración y cinéticas de tiempo de cada proteína se calculan y se trazan en papel milimétrico de la siguiente manera:
 - a) Para las curvas de calibración se grafica la concentración (eje de las abscisas X) contra la lectura de la absorbancia (densidad óptica, eje de las ordenadas Y). Los valores se corroboran estadísticamente mediante la prueba de la r de Pearson (regresión lineal de cada curva).
 - b) En las cinéticas de tiempo se grafica concentración y tiempo (X) contra la absorbancia D.O. (Y).
- 2.- Para la dilución óptima del antígeno, la diferencia de la lectura inicial (E_1) y final (E_2) de cada una de las cinéticas de tiempo nos da la extinción $E = E_2 - E_1$ (Y). Se traza contra la dilución del suero control (X).
- 3.- Extrapolar en las cartas de control de calidad, las lecturas del intraensayo e interensayo. En cada carta calcular la media (\bar{X}), desviación standar (DS) y coeficiente de variabilidad (C.V.) para determinar la precisión y confiabilidad del método. Trazar en papel milimétrico.
- 4.- Clasificar el patrón electroforético de los proteingramas para sueros con diagnóstico de Mieloma. Comparación entre las medias \bar{X}_1 y \bar{X}_2 de dos muestras, para saber si ambas pertenecen a la misma población mediante la T de student.
- 5.- Para la correlación, entre los métodos de Turbidimetría, Nefelometría e Inmunodifusión Radial, requirió cada uno de estos estadísticamente de la prueba r de Pearson. En

cada correlación se calcula el valor de r (regresión lineal), pendiente y punto de intersección de ésta:

$$Y = mx + b$$

- 6.- Calcular el porcentaje y valores de referencia del total de muestras de cada proteína. Empleo de \bar{X} , DS, C.V, $\bar{X} \pm 1DS$, $\bar{X} \pm 2DS$, como medidas estadísticas para el cálculo de los valores de referencia.

VALORES DE REFERENCIA NEFELOMETRIA

SUERO ESTANDAR DE REFERENCIA

IgG	1170 mg/dl
IgA	234 mg/dl
IgM	111 mg/dl
C3	77 mg/dl
C4	12.2 mg/dl

SUERO CONTROL

IgG	1310 mg/dl
IgA	270 mg/dl
IgM	150 mg/dl
C3	95 mg/dl
C4	24 mg/dl

VI

RESULTADOS

VI RESULTADOS

Las gráficas 1,2,3,4 y 5 corresponden a las curvas de calibración de cada una de las proteínas plasmáticas por el Método de Turbidimetría.

En cada una de estas se trabajaron 11 diluciones del suero estandar con la finalidad de verificar los rangos óptimos: IgA (54.2-434), IgM (5.75-184), IgG (51.2-3280), C3 (19.25-231) y C4 (2.7-32.4). A cada lectura inicial se le resta la lectura del blanco.

Se obtuvo una correlación positiva alta $r=0.99$ para cada curva de calibración. Las lecturas de las concentraciones de cada proteína se observan en la tabla #1.

En las gráficas 6,7,8,9 y 10, de las cinéticas de reacción de estas proteínas se trabajaron 2 variables dependientes: tiempo y concentración, observándose una velocidad de reacción mayor en las diluciones 1:2 decreciendo en estas hasta llegar a la dilución 1:256. La tabla #2 muestra las absorbancias (D.O.) para la concentración y tiempo de estas proteínas.

A partir de las curvas de cinética de reacción se elaboran curvas para las diluciones óptimas del antígeno (suero estandar). Estas últimas se elaboran de la diferencia de la lectura inicial (E_1) con respecto a la final (E_2) para así obtener la ΔE promedio de cada una de las lecturas de la cinética. La tabla #3 muestra el promedio de cada lectura para estas proteínas.

Las cartas de control de calidad después de 10 días se esque-

matizan en las gráficas 16,17,18,19 y 20. Estas representan la confiabilidad, precisión y exactitud de la técnica Turbidimétrica. Los proteingramas obtenidos de los patrones electroforéticos fueron:

1.- IgG	2.- IgA	3.- IgG	4.- IgG	5.- IgM
6.- IgM	7.- IgM	8.- IgG	9.- IgG	10.- IgG

Aparte de los proteingramas de Mieloma Múltiple anteriores, se obtuvieron 6 más con un patrón normal.

La correlación entre los 3 métodos fué:

IgA la correlación entre la técnica de Turbidimetría vs Nefelometría dió una $r=0.98$ de un total de 20 muestras.

Gráfica # 21

IgG la correlación entre la técnica de Turbidimetría vs Nefelometría dió una $r=0.97$ de un total de 20 muestras.

Gráfica #22

IgM se correlacionó Turbidimetría vs Nefelometría e Inmuno-difusión Radial. Turbidimetría vs Nefelometría dió $r=0.93$ para 10 muestras. Turbidimetría vs Inmuno-difusión Radial (IDR) dió $r=0.99$ para 10 muestras. Gráfica #23

C3 la correlación de Turbidimetría vs Nefelometría dió una $r=0.93$, y Turbidimetría vs IDR dió $r=0.96$, en ambas correlaciones se emplearon 10 muestras para cada curva. Gráfica #24

Finalmente la correlación para **C4** entre Turbidimetría vs Nefelometría dió una $r=0.98$ de un total de 15 muestras.

Gráfica # 25

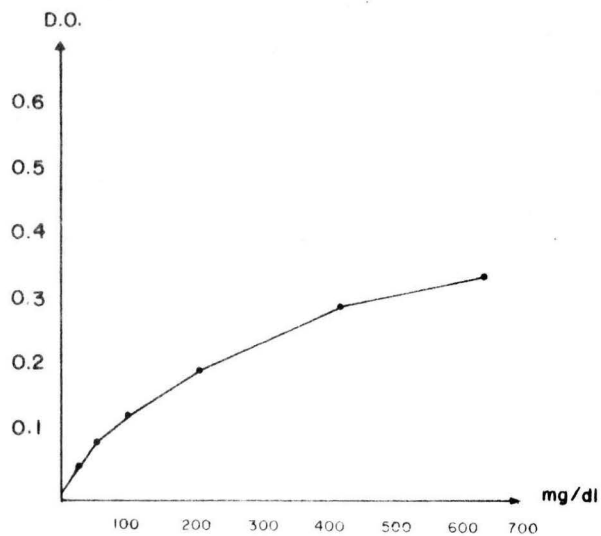
La tabla # 4, muestra los valores de las absorbancias (D.O.) para cada correlación obtenida por los tres métodos de inmunoprecipitación.

La gráfica #26, muestra los porcentajes normales y anormales de todas estas proteínas plasmáticas. La gráfica #27 fué elaborada a partir de los valores de referencia normales de una población mestiza mexicana para cada proteína plasmática. Estos valores de referencia se representan en la tabla #5.

ABSORBANCIA (D.O.) 340 NM					
CONCENTRACION mg/dl D.O.	SI REFERENCIA IgG	SI REFERENCIA IgA	SI REFERENCIA IgM	SI REFERENCIA C ₃	SI REFERENCIA C ₄
CONCENTRACION mg/dl	820 .28	108.5 .18	46 .18	38.5 .21	5.4 .15
	410 .22	54.2 .14	23 .15	19.2 .15	2.7 .11
	205 .20	27.1 .10	11.5 .13	9.6 .12	1.3 .09
	102 .18	13.5 .06	5.7 .13	4.8 .10	.67 .09
	51.2 .17	6.7 .06	2.8 .10	2.4 .10	.33 .09
	25.6 .16	3.3 .06	1.4 .09	1.20 .09	.16 .09
	12.8 .15	1.6 .06	.71 .09	.60 .09	.08 .08
	6.4 .14	.84 .07	.39 .09	.30 .09	.04 .08
	1640 .33	217 .25	92 .21	77 .34	10.8 .21
	3280 .50	434 .35	184 .28	154 .50	21.6 .28
	4920 .57	651 .39	276 .30	231 .59	32.4 .36
	BLANCO	.14	.05	.09	.10
DILUCION ANTISUERO 1:10					

Tabla No1 Valores de Concentración y D.O.
para cada Curva de Calibración
de las diferentes Proteínas
Plasmáticas

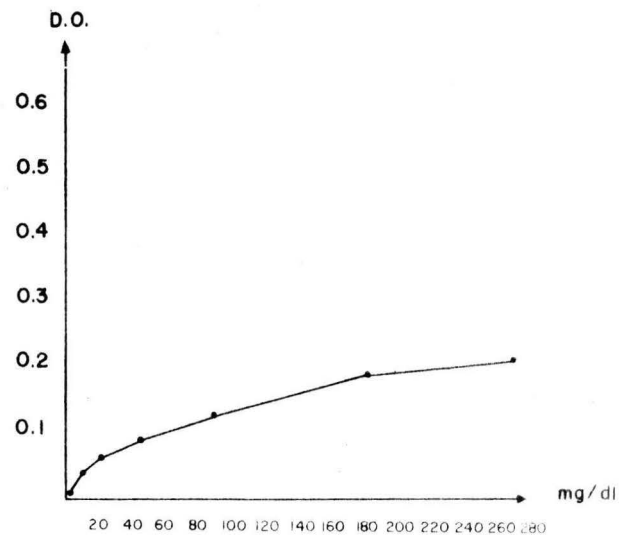
CURVA DE CALIBRACION
IgA POR TURBIDIMETRIA



Rango óptimo de reacción (54.2 - 434)
 Suero standar I:20
 Anti IgA I:10
 r 0.99

Grafica No 1

CURVA DE CALIBRACION
IgM POR TURBIDIMETRIA

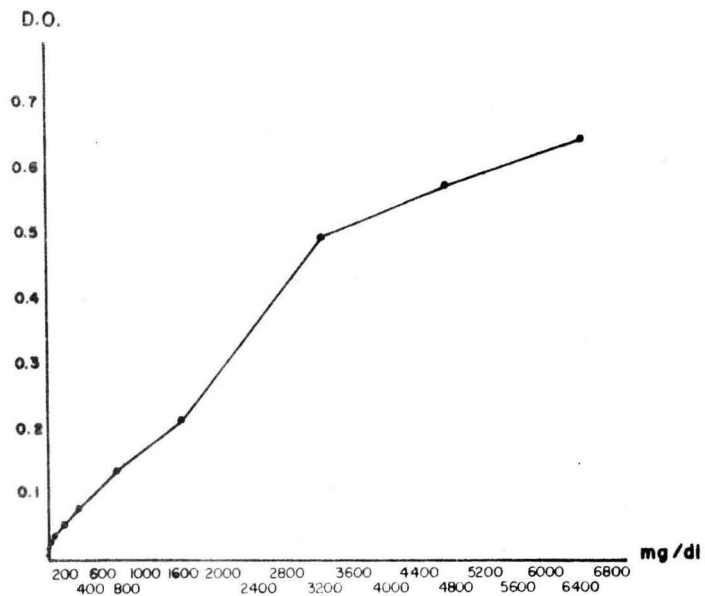


Rango óptimo de reacción (5.75 - 184)
 Suero standar I:30
 Anti IgM I:10
 r 0.99

Grafica No 2

CURVA DE CALIBRACION

IgG POR TURBIDIMETRIA

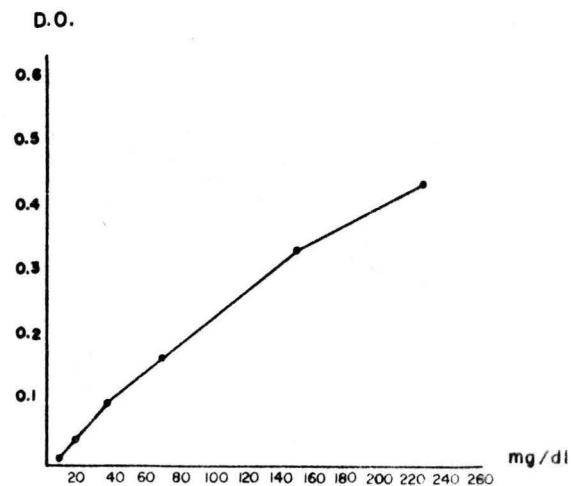


Rango óptimo de reacción (51.2 - 3280)
Suero standar 1:30
Anti IgG 1:10
r 0.99

Grafica No 3

CURVA DE CALIBRACION

C3 POR TURBIDIMETRIA



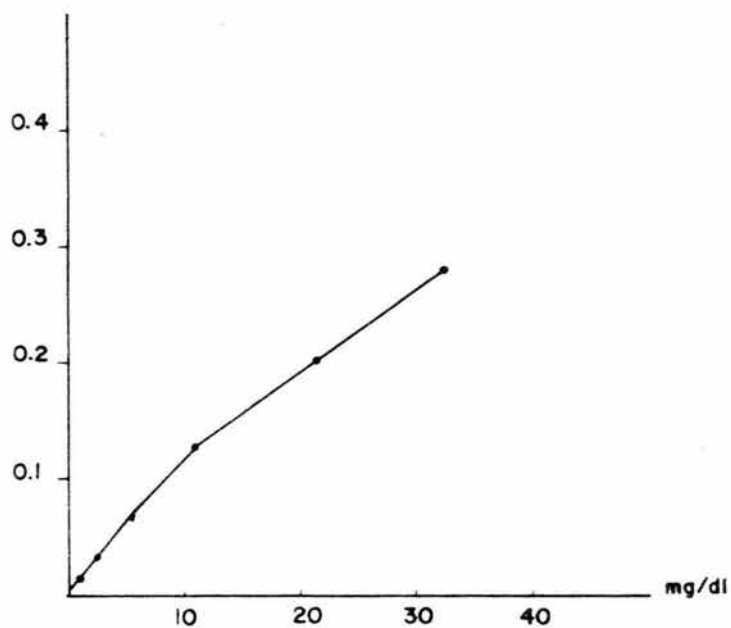
Rango óptimo de reacción (19.25 - 231)
Suero standar 1:30
Anti C3 1:10
r 0.99

Grafica No 4

CURVA DE CALIBRACION

C4 POR TURBIDIMETRIA

D.O.



Rango óptimo de reacción (2.7 - 32.4)
Suero standar 1:10
Anti C 4 1:10
r 0.99

Grafica No 5

A B S O R B A N C I A (D.O.) 340 NM																					
C O N C E N T R A C I O N mg/dl	I g G	820	410	205	102	51.2	25.6	12.8	6.4	10"	T I E M P O	385	19.2	9.6	4.8	2.4	1.2	.60	.30	10"	
		.69	.55	.51	.33	.24	.19	.17	.16			95	84	51	30	19	13	.11	.10		30"
		820	410	205	102	51.2	25.6	12.8	6.4			385	18.2	9.6	4.8	2.4	1.2	.60	.30		
		.74	.61	.53	.35	.25	.20	.17	.16			100	86	52	32	19	13	.11	.10		
	820	410	205	102	51.2	25.6	12.8	6.4	385	19.2		9.6	4.8	2.4	1.2	.60	.30				
	.77	.62	.54	.36	.26	.21	.17	.16	1.03	.89		.54	.33	.22	.15	.11	.10	120"			
	820	410	205	102	51.2	25.6	12.8	6.4	385	19.2		9.6	4.8	2.4	1.2	.60	.30				
	.79	.65	.56	.37	.27	.21	.17	.16	1.06	.92		.57	.35	.21	.15	.11	.10		240"		
	108	54.2	27.1	13.5	6.7	3.3	1.6	.84	385	17.2		9.6	4.8	2.4	1.2	.60	.30				
	.48	.55	.46	.34	.23	.17	.12	.10	1.08	.93		.57	.36	.21	.15	.11	.10				
	108	54.2	27.1	13.5	6.7	3.3	1.6	.84	C 4	5.4		2.7	1.3	.67	.33	.16	.08	.04		T I E M P O	
	.58	.54	.48	.39	.27	.19	.13	.12		.58		.44	.29	.18	.16	.12	.10	.09	10"		
108	54.2	27.1	13.5	6.7	3.3	1.6	.84	5.4		2.7	1.3	.67	.33	.16	.08	.04	30"				
.62	.56	.50	.41	.28	.21	.14	.13	68		.52	.34	.23	.16	.13	.11	.10					
108	54.2	27.1	13.5	6.7	3.3	1.6	.84	5.4		2.7	1.3	.67	.33	.16	.08	.04		60"			
.64	.58	.53	.42	.29	.22	.15	.14	72		.55	.36	.24	.17	.13	.11	.10					
108	54.2	27.1	13.5	6.7	3.3	1.6	.84	5.4		2.7	1.3	.67	.33	.16	.08	.04	120"				
.62	.61	.56	.43	.30	.23	.16	.14	75		.57	.38	.26	.18	.14	.11	.10					
46	23	11.5	5.7	2.8	1.4	.71	.39	5.4		2.7	1.3	.67	.33	.16	.08	.04		240"			
.47	.33	.28	.19	.16	.14	.13	.09	77		.59	.40	.26	.19	.14	.11	.10					
46	23	11.5	5.7	2.8	1.4	.71	.39	B L A N C O					D I L U C I O N A N T I S U E R O 1:10								
.52	.37	.2	.20	.16	.14	.13	.09	I g G		I g A	I g M	C 3		C 4							
46	23	11.5	5.7	2.8	1.4	.71	.39	.14	.05	.09	.10	.08									
.54	.40	.31	.22	.17	.15	.13	.09														
46	23	11.5	5.7	2.8	1.4	.71	.39														
.56	.42	.33	.23	.18	.15	.13	.09														
46	23	11.5	5.7	2.8	1.4	.71	.39														
.57	.43	.33	.24	.18	.16	.13	.09														

Tabla No 2. Cinéticas de Tiempo y Concentración de las 5 Proteínas Plasmáticas por el método de TURBIDIMETRIA

CINETICAS DE TIEMPO Y CONCENTRACION
DEL A_q PARA I_{qA} POR TURBIDIMETRIA

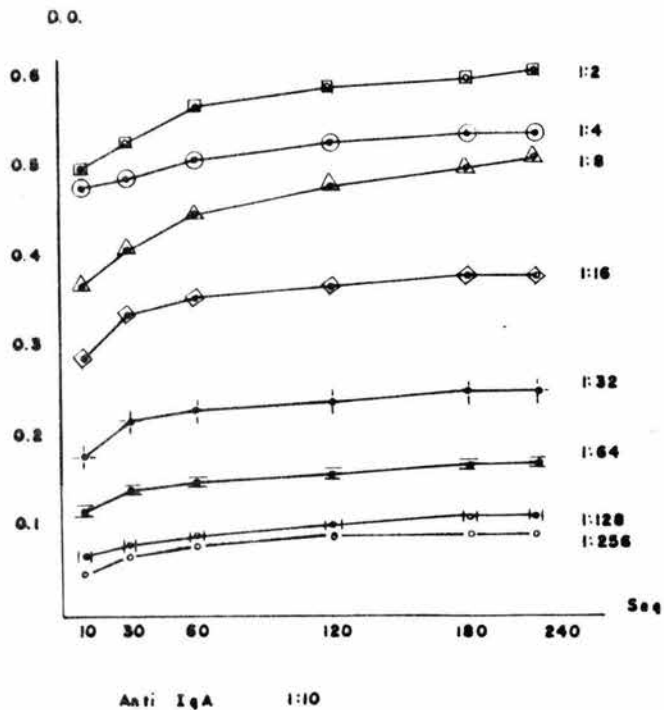


Grafico No 6

CINETICAS DE TIEMPO Y CONCENTRACION
DEL A_q PARA I_{qM} POR TURBIDIMETRIA

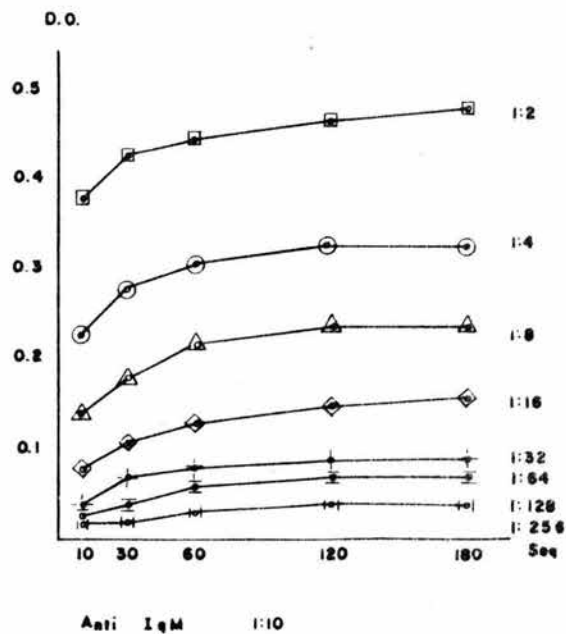
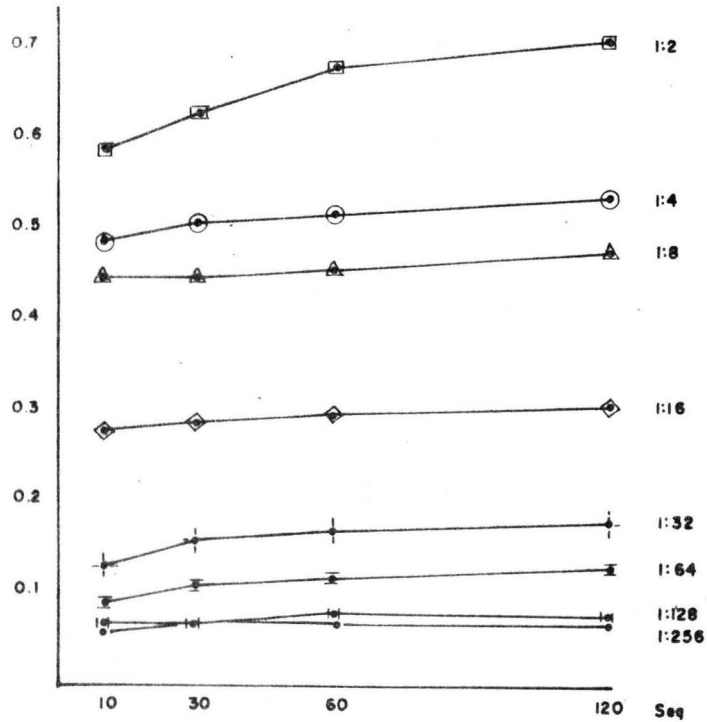


Grafico No 7

CINETICAS DE TIEMPO Y CONCENTRACION
DEL A_q PARA I_qG POR TURBIDIMETRIA

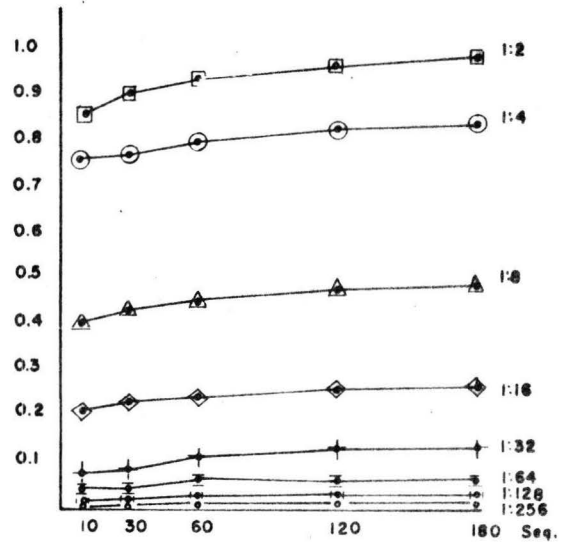


Anti I_qG 1:10

Grafica No 8

CINETICAS DE TIEMPO Y
CONCENTRACION DEL A_q
PARA C3 POR TURBIDIMETRIA

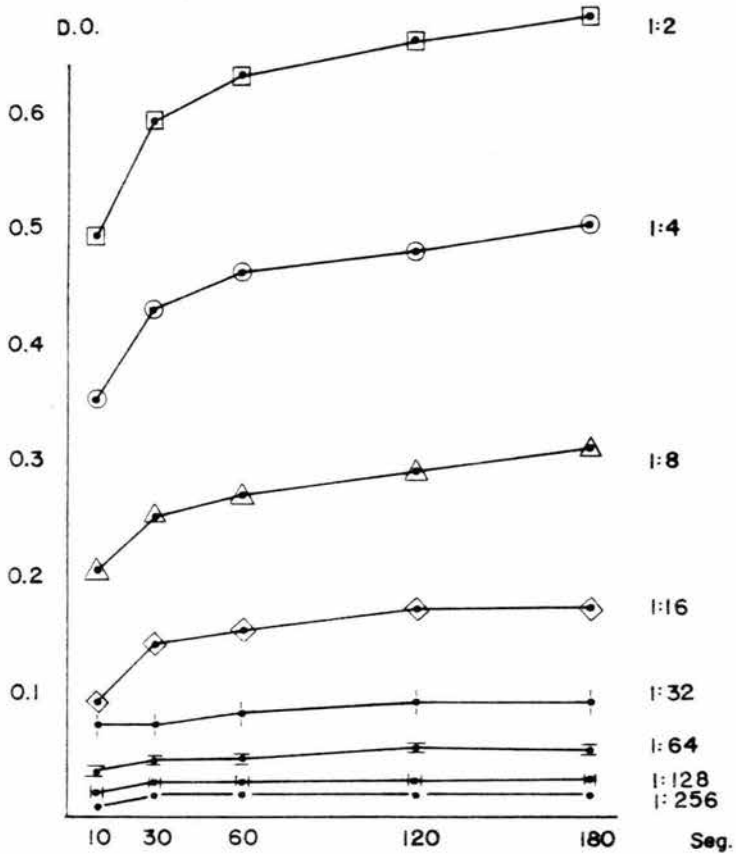
D.O.



Anti C3 1:10

Grafica No 9

CINETICAS DE TIEMPO Y CONCENTRACION
 DEL Ag PARA C4 POR TURBIDIMETRIA

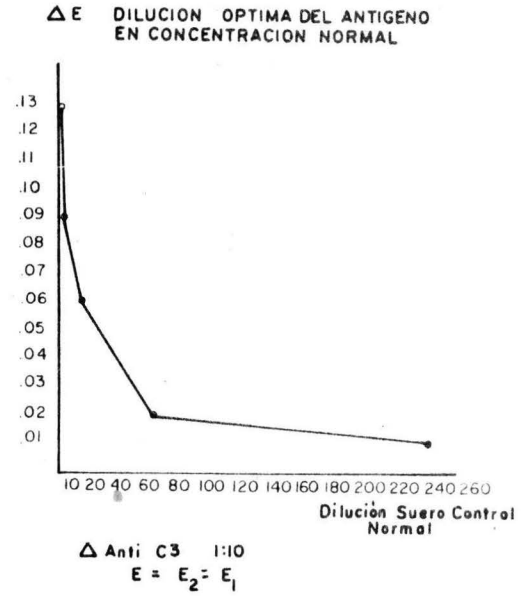
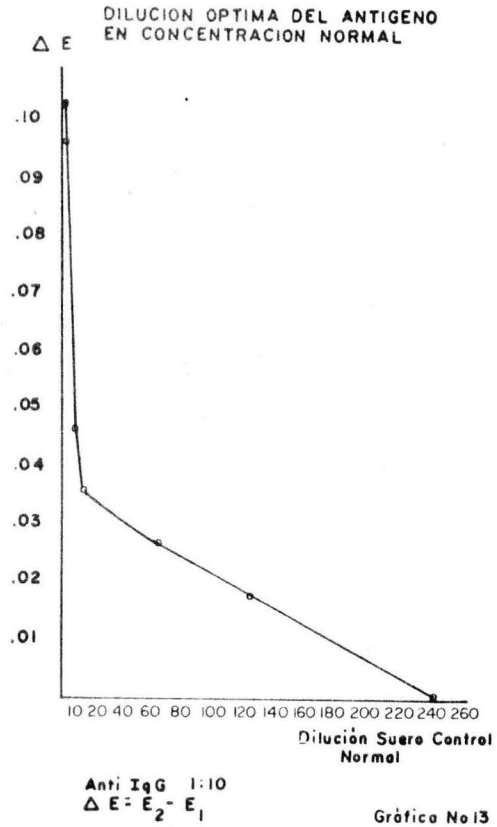


Anti C4 1:10

Grafica No 10

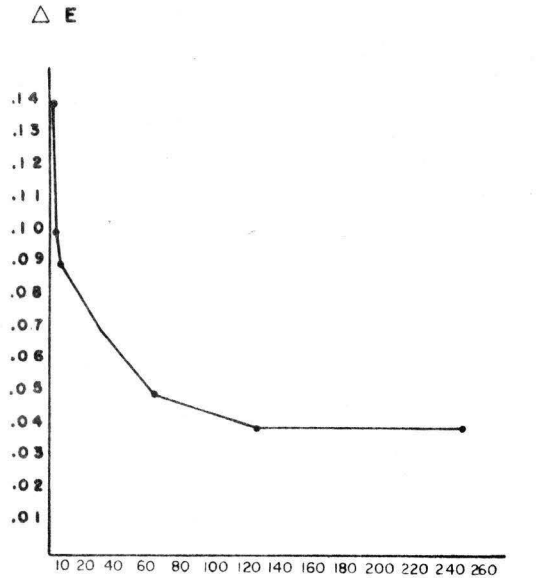
ABSORBANCIA $\Delta E = E_2 - E_1$					
CONCENTRACION mg/dl	SI REFERENCIA	SI REFERENCIA	SI REFERENCIA	SI REFERENCIA	SI REFERENCIA
	IgG	IgA	IgM	C ₃	C ₄
	820	108.5	46	38.5	5.4
	0.10	0.14	0.10	0.13	0.19
	410	54.2	23	19.2	2.7
	0.10	0.10	0.10	0.09	0.15
	205	27.1	11.5	9.6	1.3
	0.05	0.10	0.05	0.06	0.11
	102	13.5	5.7	4.8	.67
	0.04	0.09	0.05	0.06	6.08
51.2	6.7	2.8	2.4	.33	
0.03	0.05	0.02	0.02	0.03	
25.6	3.3	1.4	1.20	.16	
0.03	0.05	0.02	0.02	0.02	
12.8	1.6	.71	.60	.08	
0	0.04	0	0	0.01	
6.4	.84	.39	.30	.04	
0	0.04	0	0	0.01	
10" - 120"	10" - 240"	10" - 180"	10" - 150"	10" - 180"	
BLANCO					
TIEMPO					
.14	.05	.09	.10	.08	
DILUCION ANTISUERO 1:10					

Tabla No3 Promedios de la Diferencia $E_2 - E_1$, de las Proteínas Plasmáticas



Gráfica No 14

DILUCION OPTIMA DEL ANTIGENO
EN CONCENTRACION NORMAL

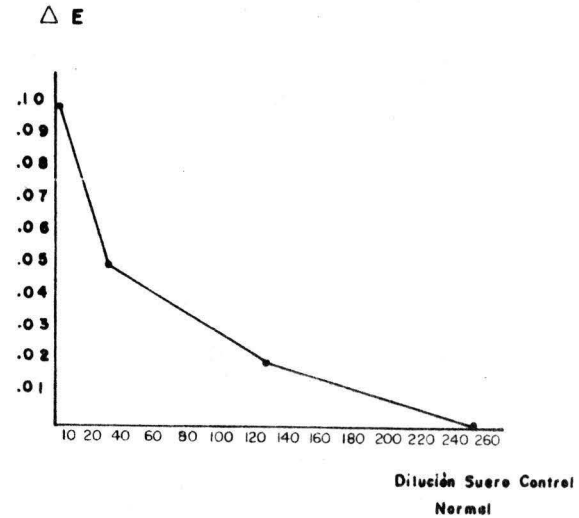


Anti IgA 1:10
 $\Delta E = E_2 - E_1$

Dilución Suero Control
Normal

Grafica No 11

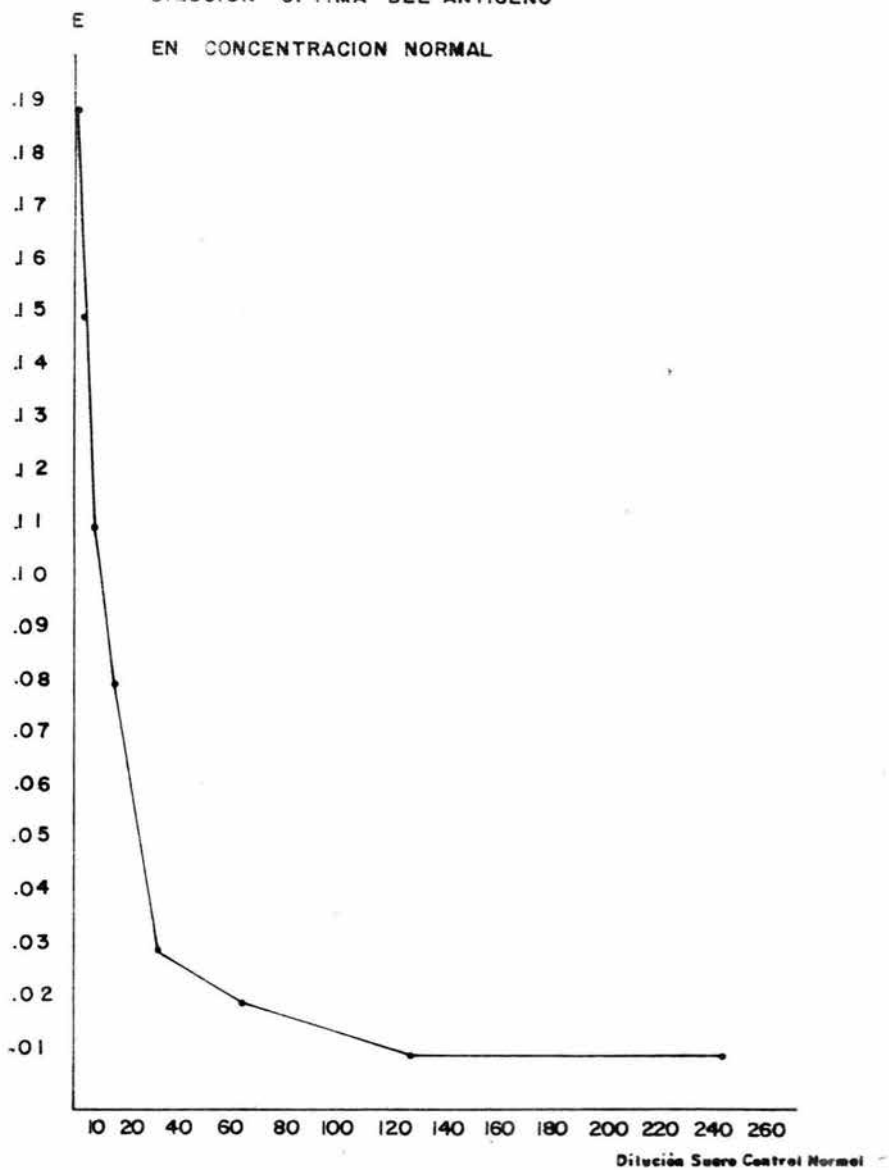
DILUCION OPTIMA DEL ANTIGENO
EN CONCENTRACION NORMAL



Anti IgM 1:10
 $\Delta E = E_2 - E_1$

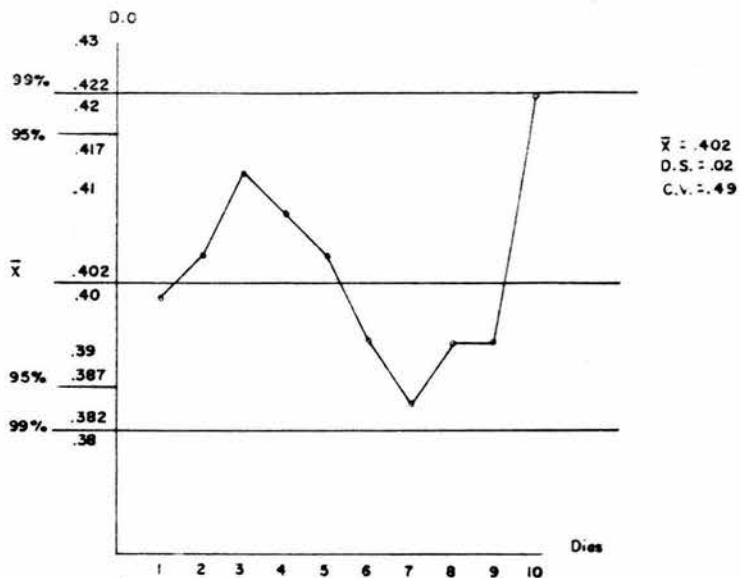
Grafica No 12

DILUCION OPTIMA DEL ANTIGENO
EN CONCENTRACION NORMAL



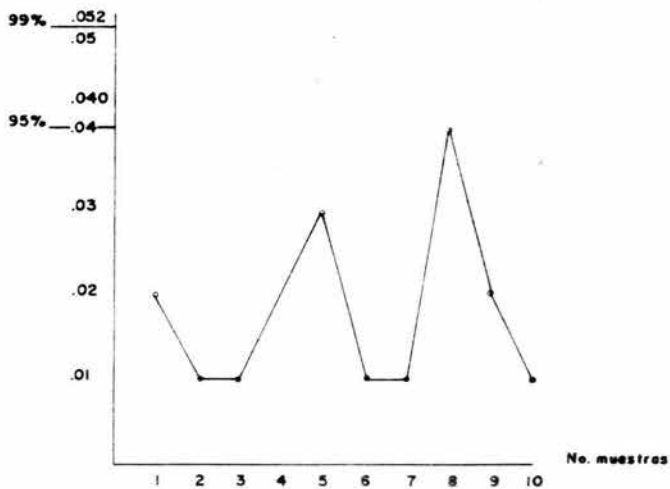
Anti C4 1:10
 $\Delta E = E_2 = E_1$

Grafica No 15



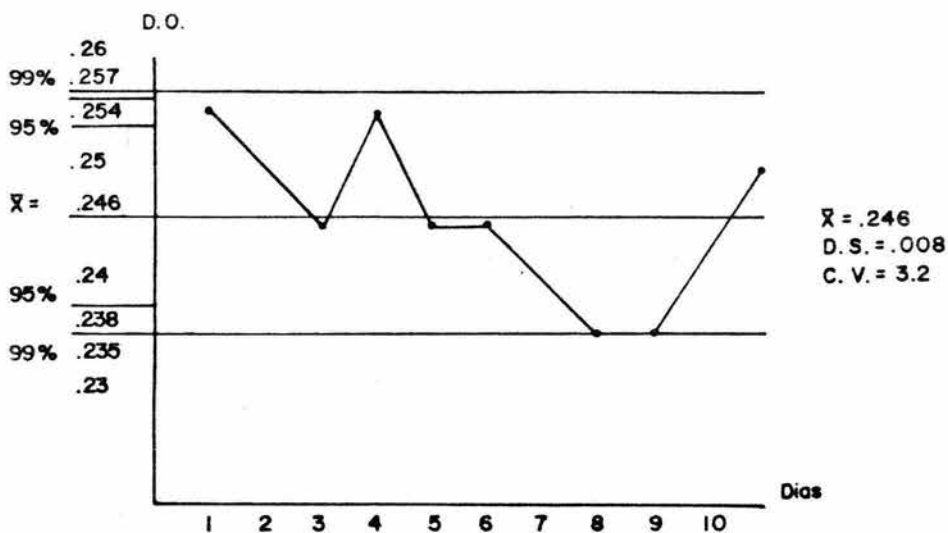
Carta de las X por el método Levey-Jennings por Heirlina y Joobs en la determinación IqA por TURBIDIMETRIA

Gráfico No 17a



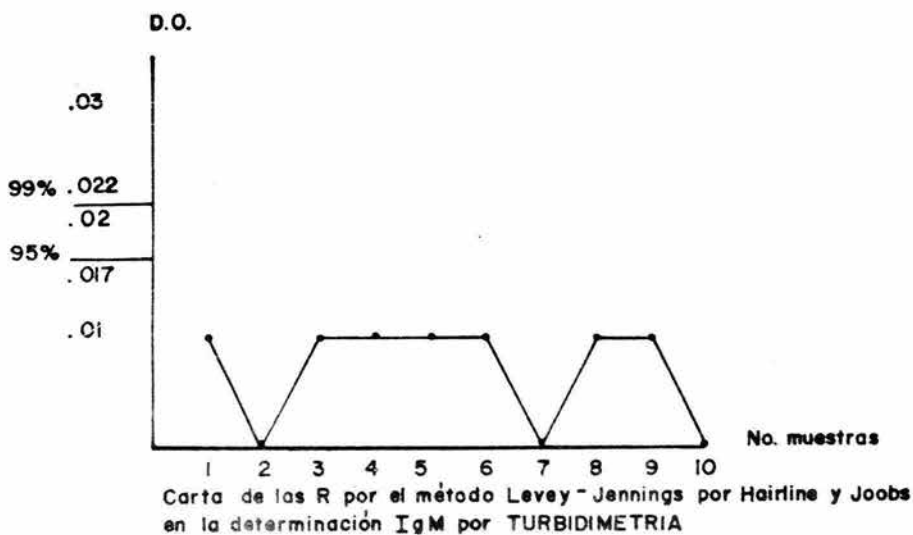
Carta de las R por el método Levey-Jennings por Heirlina y Joobs para IqA por TURBIDIMETRIA (intraensayo)

Gráfico No17 b



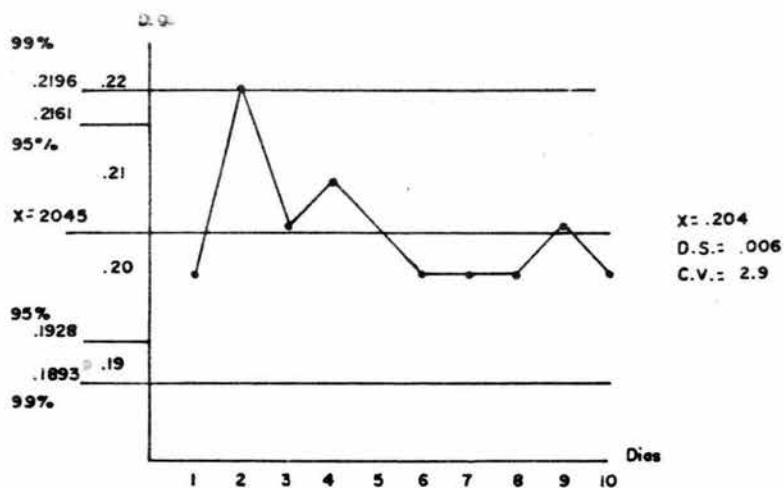
Carta de las X por el método Levey - Jennings por Hairline y Joobs en la determinación IgM por TURBIDIMETRIA

Grafica No 18a



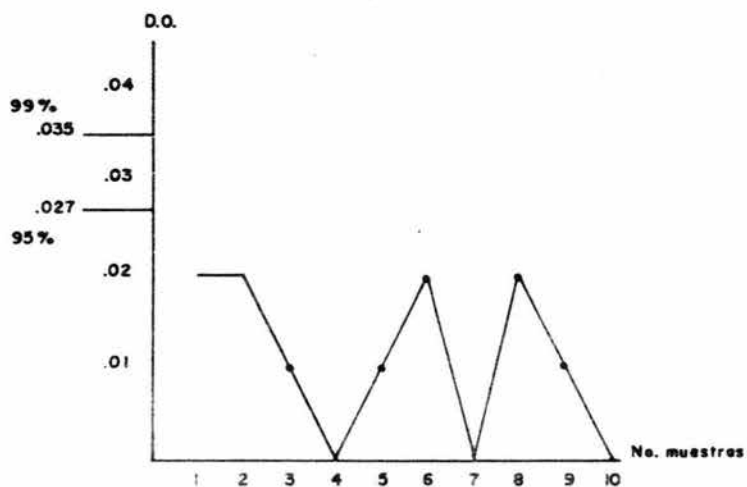
Carta de las R por el método Levey - Jennings por Hairline y Joobs en la determinación IgM por TURBIDIMETRIA

Grafica No 18b



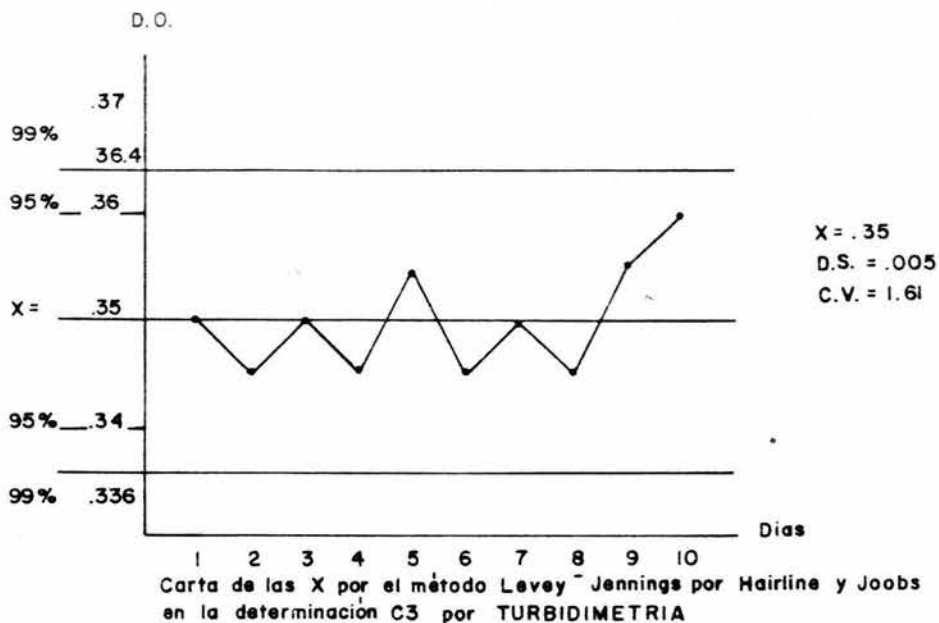
Carta de las X por el método Levey-Jennings modificado por Hairline y Jeebs en la determinación IqG por TURBIDIMETRIA

Gráfica No 16a

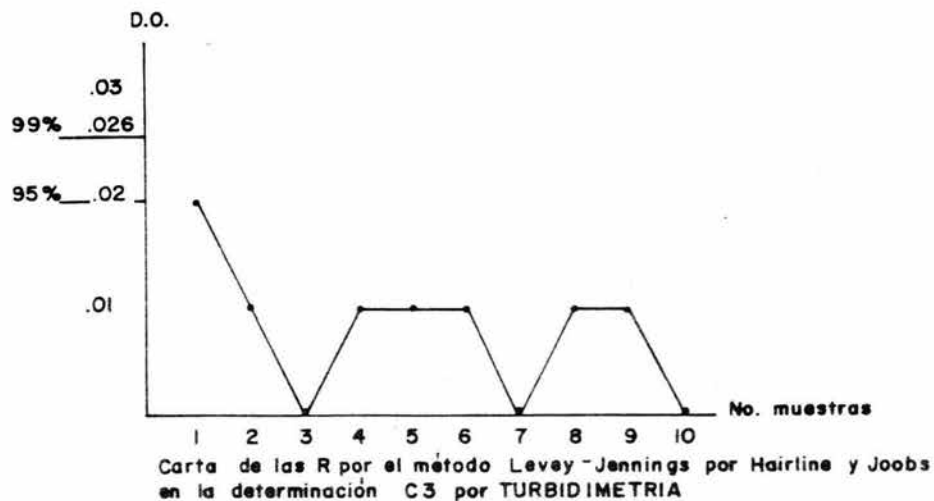


Carta de las R por el método Levey-Jennings modificado por Hairline y Jeebs para IqG por TURBIDIMETRIA (Introsensayo)

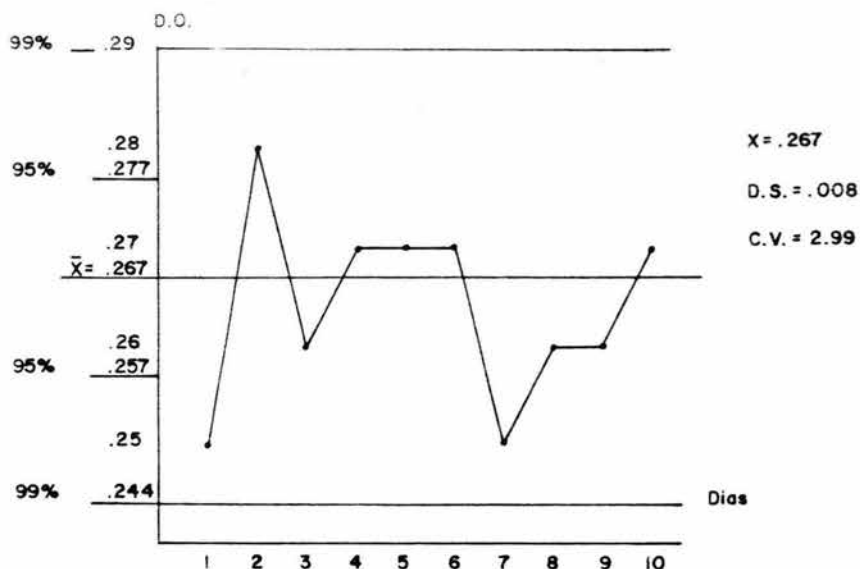
Gráfica No 16b



Grafica No 19a

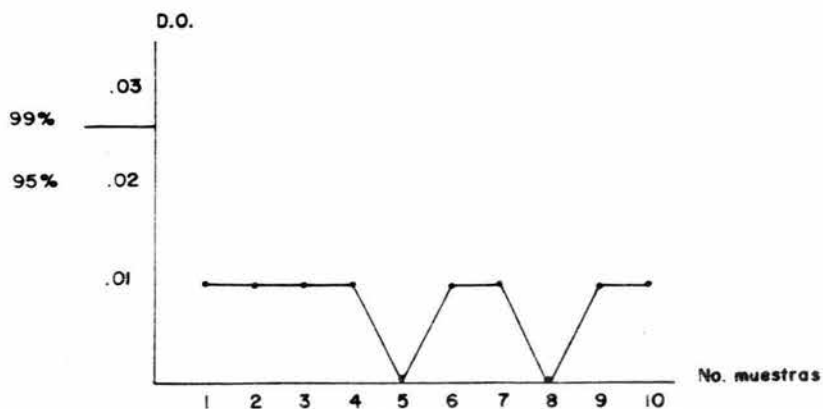


Grafica No 19b



CARTA DE LAS X POR EL METODO LEVEY-JENNINGS POR HAIRLINE Y JOOBS EN LA DETERMINACION C4 POR TURBIDIMETRIA

Grafica No 20a



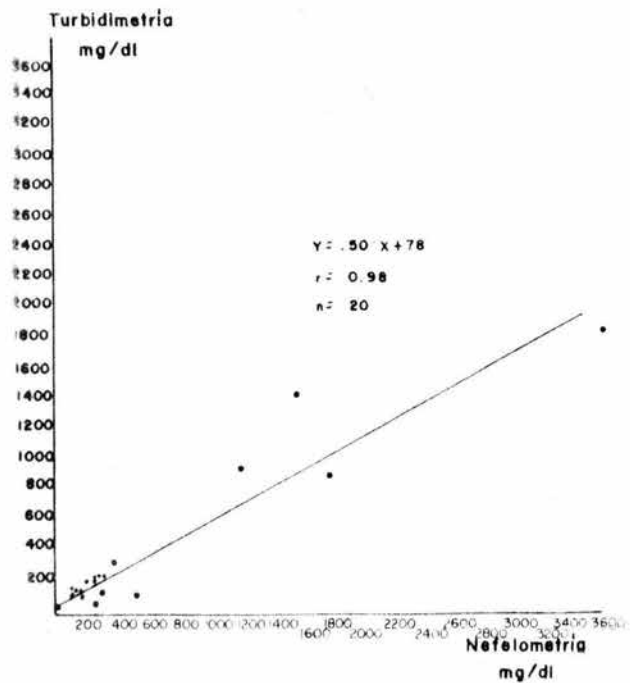
CARTA DE LAS R POR EL METODO LEVEY-JENNINGS POR HAIRLINE Y JOOBS EN LA DETERMINACION C4 POR TURBIDIMETRIA

Grafica No 20b

I _g G		I _g A		I _g M		C ₃		C ₄					
TURBIDIMETRIA NEFELOMETRIA		TURBIDIMETRIA NEFELOMETRIA		TURBIDIMETRIA NEFELOMETRIA		TURBIDIMETRIA NEFELOMETRIA		TURBIDIMETRIA NEFELOMETRIA					
n = 20 r = 0.98 t = 0.3 p = 0.7		n = 20 r = 0.97 t = 0.9 p = 0.3		n = 10 r = 0.93 t = 0.6 p = 0.5		n = 10 r = 0.93		n = 15 r = 0.98					
conc.	conc.	conc.	conc.	conc.	conc.	conc.	conc.	conc.	conc.				
731	475	187	175	77	67	106	97	11	15				
1306	1148	234	285	147	174	70	62	12	16				
1463	1241	193	147	98	100	62	47	13	18				
1045	727	234	245	98	98	55	62	14	19				
1620	1289	263	323	98	91	92	83	12	17				
2146	2223	216	224	105	94	77	66	16	20				
2090	2316	181	124	98	78	66	61	15	19				
1306	767	263	299	105	115	73	64	17	22				
2769	2223	140	120	91	71	59	50	12	16				
1933	1523	245	279	105	82	62	50	17	22				
2393	3515	167	319	TURBIDIMETRIA I. D. R.		TURBIDIMETRIA I. D. R.		16	21				
5210	6652	233	332					18	23				
5210	6100	167	187	TURBIDIMETRIA I. D. R.		TURBIDIMETRIA I. D. R.		14	19				
798	1008	1888	3638					304	294	110	98	18	23
1861	1817	147	546					386	354	106	86	11	15
2553	3630	113	189					304	294	118	107		
2553	3630	970	1215					117	155	89	71		
5424	5723	910	1815					258	259	118	111		
5105	5480	80	283					117	155	114	98		
2287	1950	342	396					258	259	123	116		
								340	320	106	98		
								246	250	123	111		
								293	285	102	90		
								n = 10 r = 0.99 t = 0.05 p = 0.9		n = 10 r = 0.96			

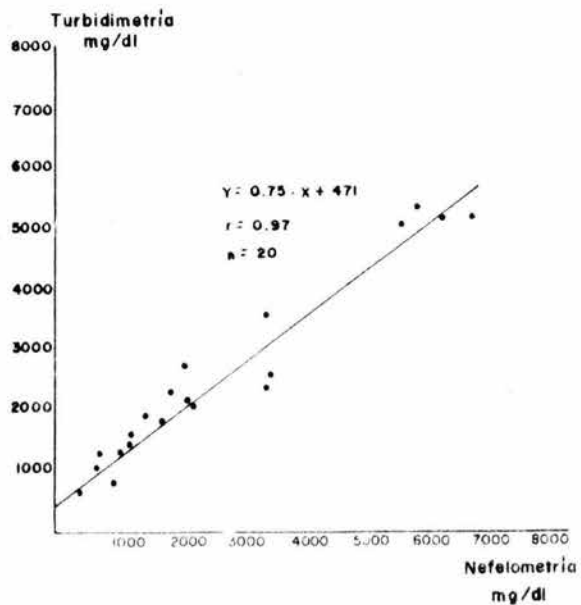
Tabla No 4. Valores de Correlación de los 3 Métodos de Inmunoprecipitación.

CORRELACION ENTRE EL METODO DE TURBIDIMETRIA
Y NEFELOMETRIA PARA LA DETERMINACION IgA



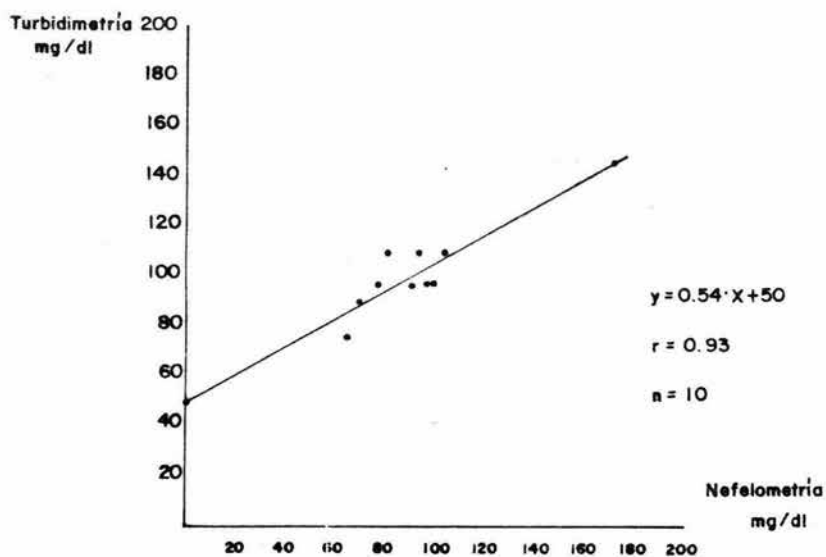
Grafica No 21

CORRELACION ENTRE EL METODO DE TURBIDIMETRIA
Y NEFELOMETRIA PARA LA DETERMINACION IgG

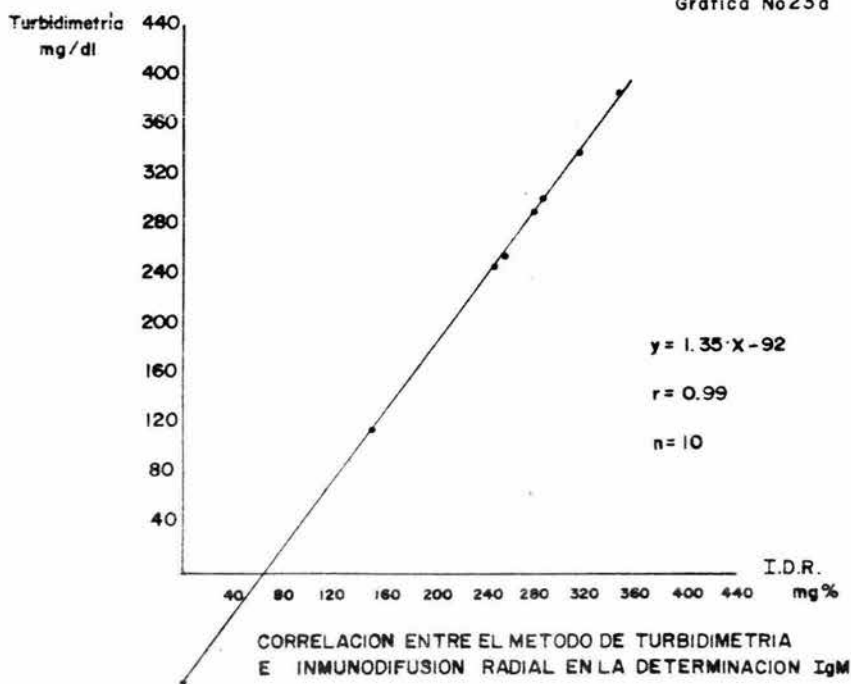


Grafica No 22

CORRELACION ENTRE EL METODO DE TURBIDIMETRIA
Y NEFELOMETRIA EN LA DETERMINACION IgM

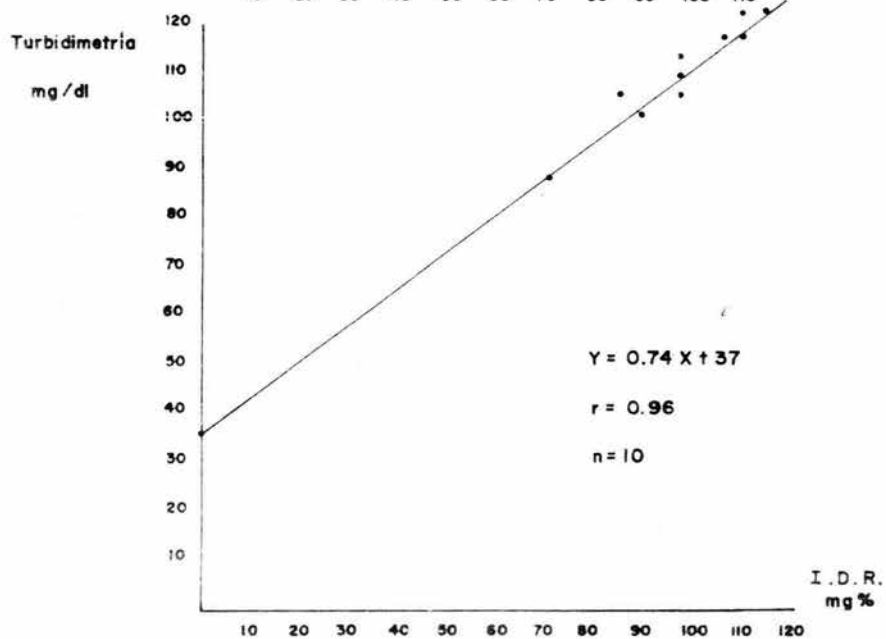
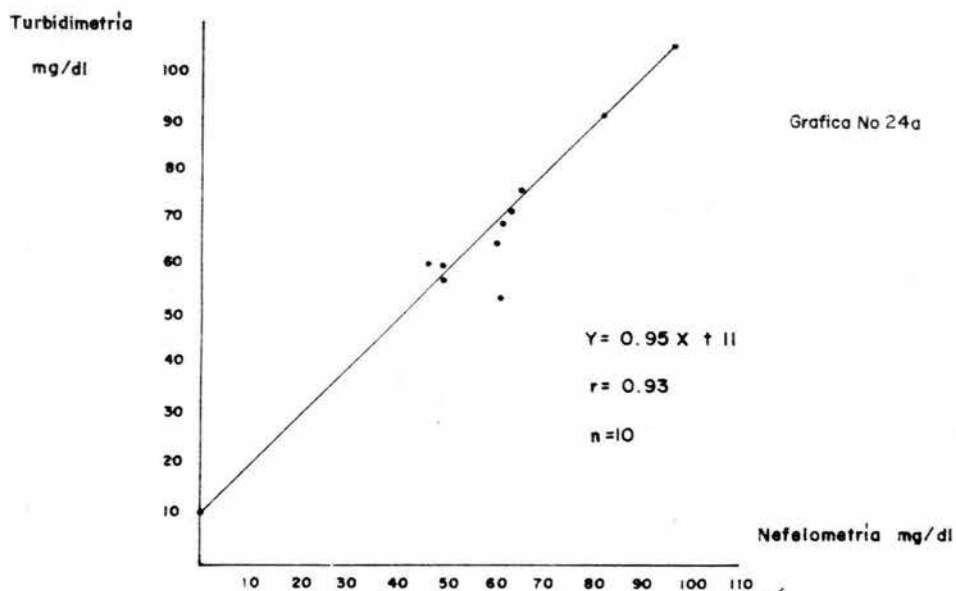


Grafica No 23a



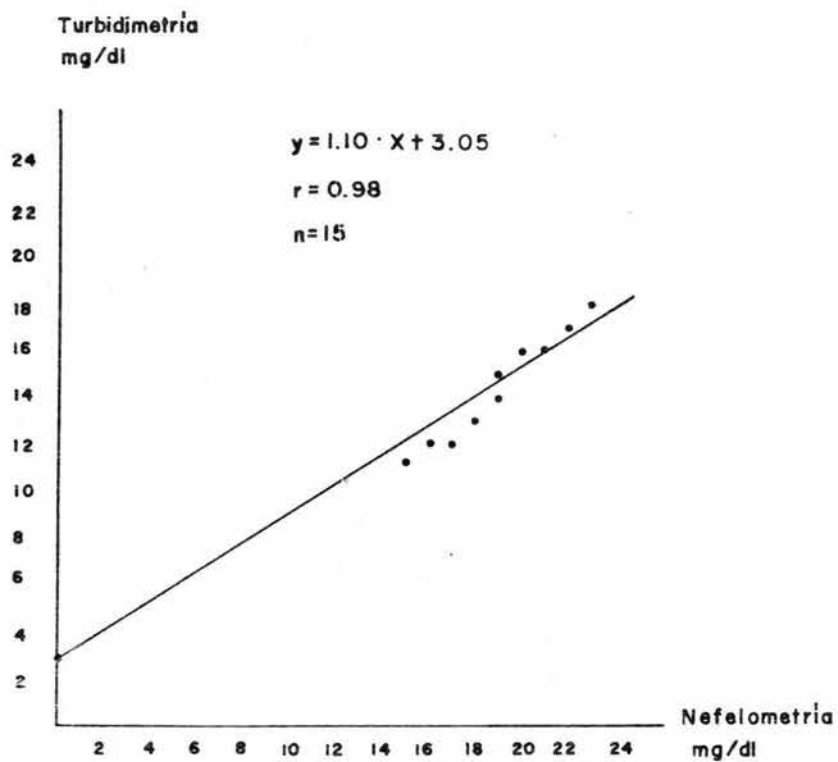
Grafica No 23b

CORRELACION ENTRE METODO DE TURBIDIMETRIA
Y NEFELOMETRIA EN LA DETERMINACION C3



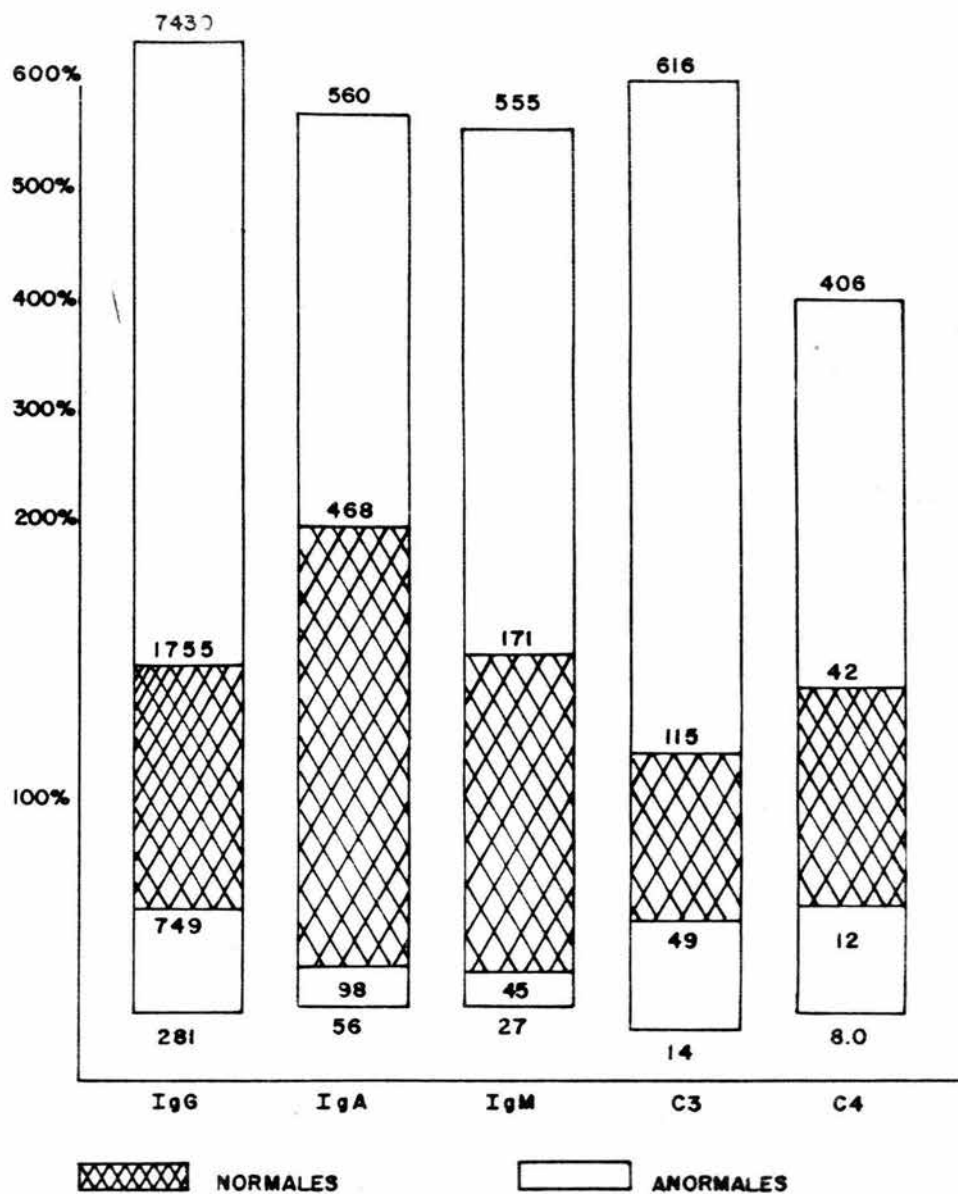
CORRELACION ENTRE EL METODO DE TURBIDIMETRIA E
INMUNODIFUSION RADIAL EN LA DETERMINACION C3

CORRELACION ENTRE EL METODO TURBIDIMETRICO
Y NEFELOMETRICO EN LA DETERMINACION C4



Grafica No 25

CONCENTRACION DE INMUNOGLOBULINAS
NORMALES Y PATOLOGICAS

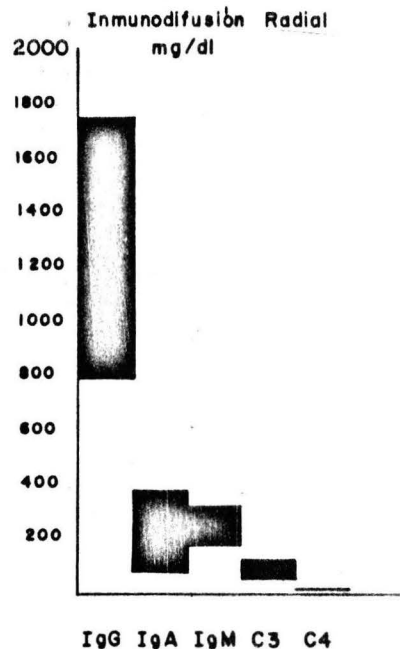
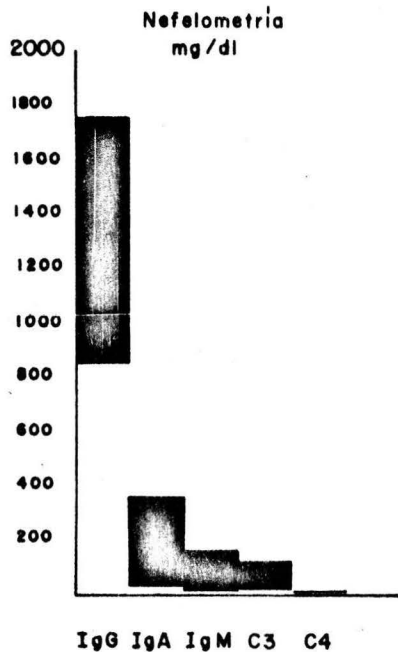
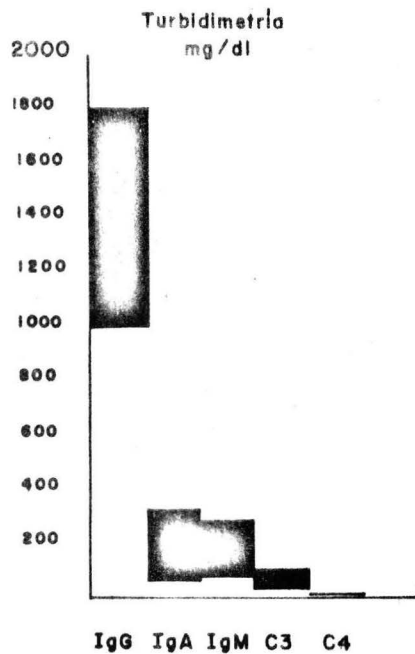


Grafica No 26

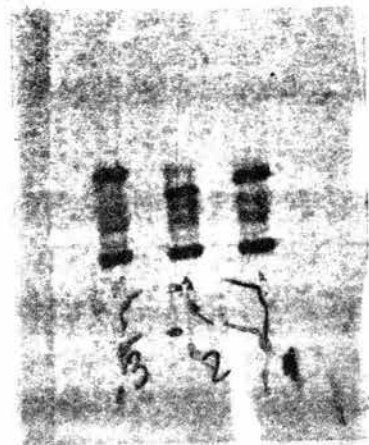
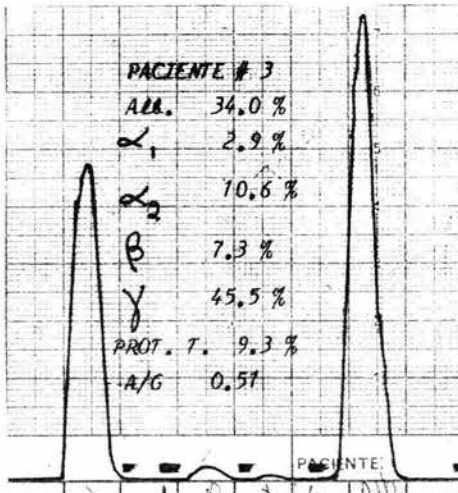
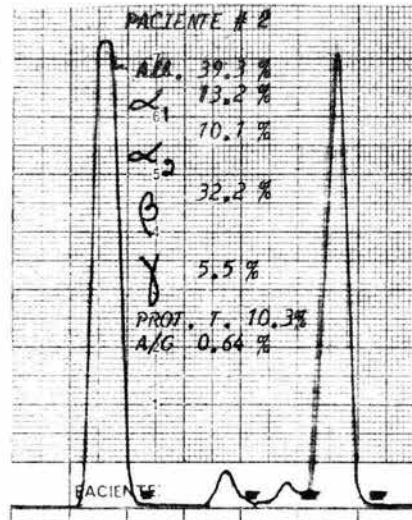
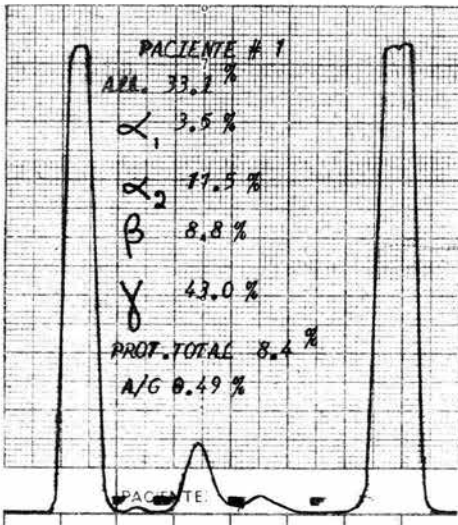
	TURBIDIMETRIA	NEFELOMETRIA	I. D. R.
IgG	$\bar{X} = 1408$ DS. = 403.5 C.V. = 28.6 % mg/dl $\bar{X} \pm 1 DS (1006-1812)$	$\bar{X} = 1307$ DS. = 443 C.V. = 34 % $\bar{X} \pm 1 (864-1750) \text{mg/dl}$	800 - 1800 mg/dl
IgA	$\bar{X} = 200$ DS. = 63.7 C.V. = 32% $\bar{X} \pm 2 (73-327) \text{mg/dl}$	$\bar{X} = 261$ DS. = 108 C.V. = 41% $\bar{X} \pm 2 (44-477) \text{mg/dl}$	90 - 450 mg/dl
IgM	$X = 182$ DS. = 63.7 C.V. = 56% $\bar{X} \pm 2 (80 - 284) \text{mg/dl}$	$X = 97$ DS. = 30 C.V. = 31% $\bar{X} \pm 2 (37 -157) \text{mg/dl}$	$X = 262$ DS. = 64 C.V. = 24 % $\bar{X} \pm 1 (198-326) \text{mg/dl}$
C ₃	$\bar{X} = 91.5$ DS. = 23.8 C.V. = 26% $\bar{X} \pm 2 (42-102) \text{mg/dl}$	$\bar{X} = 64$ DS. = 15 C.V. = 24% $\bar{X} \pm 2 (34-94) \text{mg/dl}$	$\bar{X} = 98$ DS. = 13 C.V. = 14% $\bar{X} \pm 2 (72-124) \text{mg/dl}$
C ₄	$\bar{X} = 14.4$ DS. = 2.5 C.V. = 17.3 % $X = 1 DS (11.9-16.9) \text{mg/dl}$	$\bar{X} = 16.1$ DS. = 1.16 C.V. = 7.2 % $X = 1 DS (14.9-17.2) \text{mg/dl}$	20 - 50 mg/dl

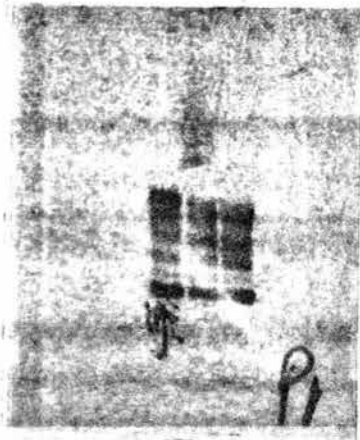
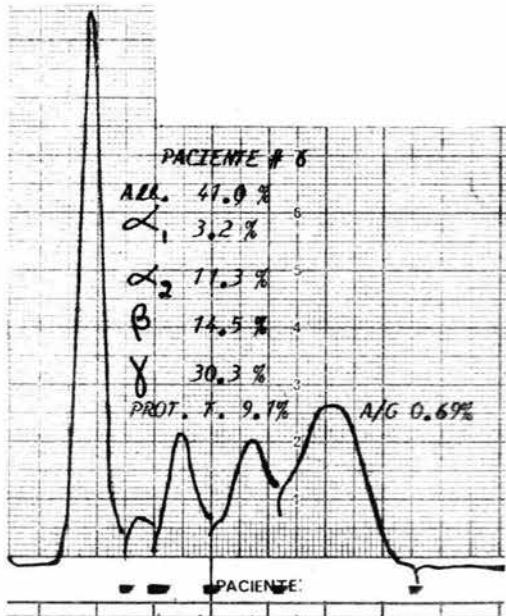
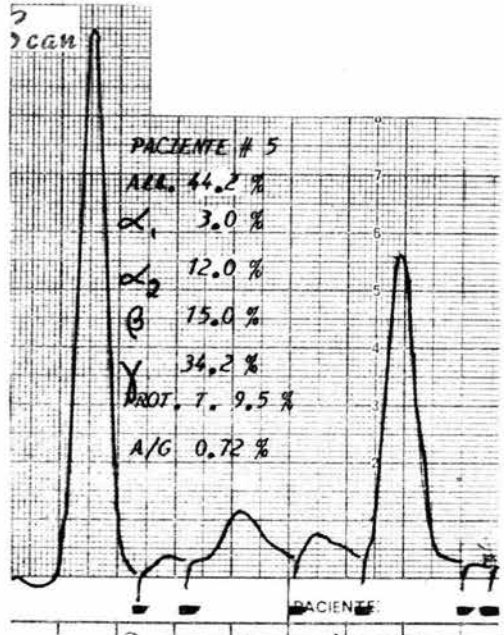
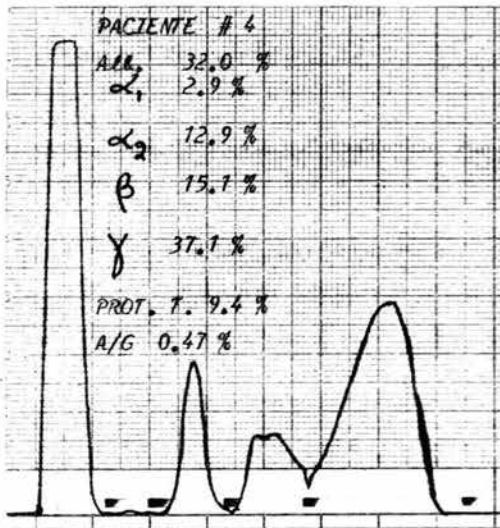
Tabla No5. Valores de Referencia de una Población Normal Mexicana por los 3 Metodos de Inmunoprecipitación

VALORES DE REFERENCIA DE PROTEINAS PLASMATICAS POR 3 METODOS DE INMUNOPRECIPITACION

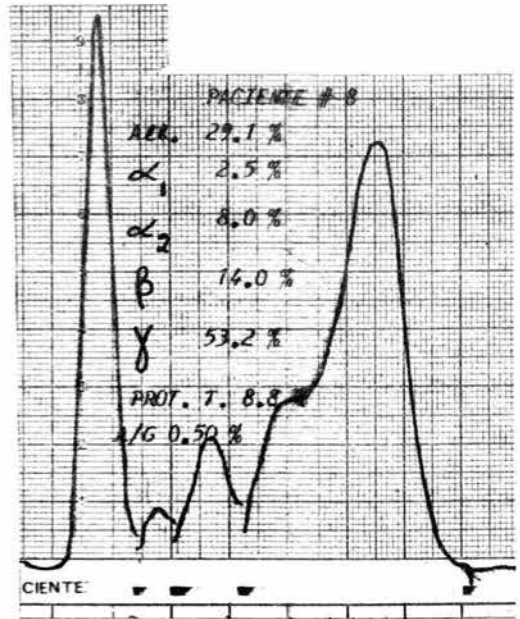
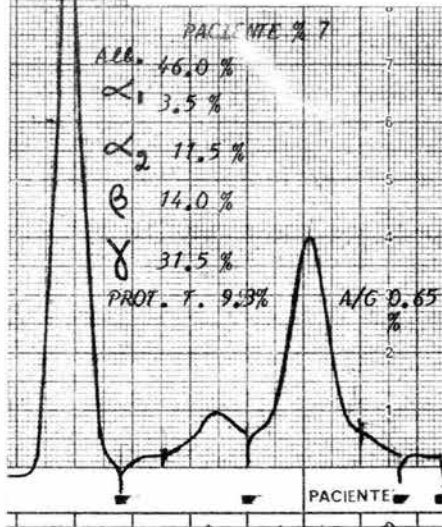


Grafica No 27

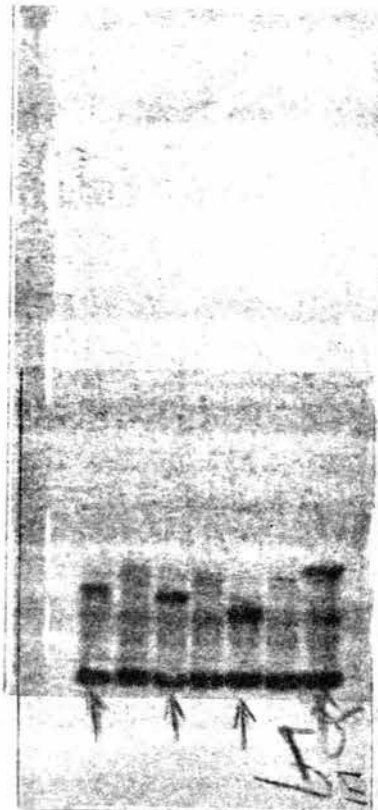
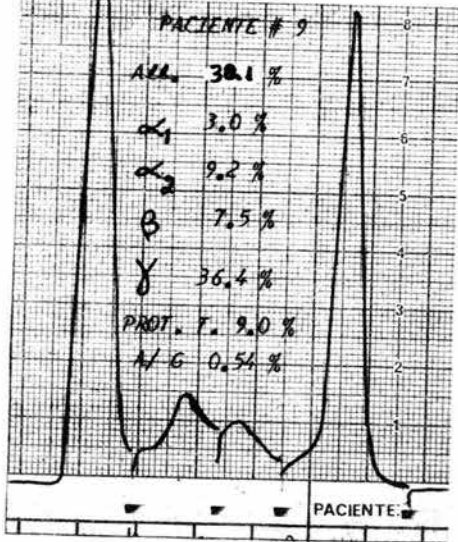


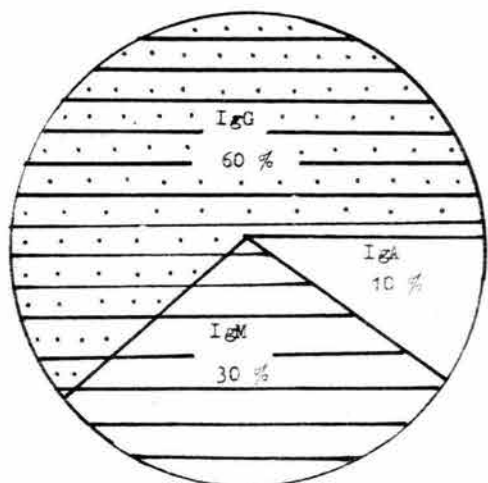
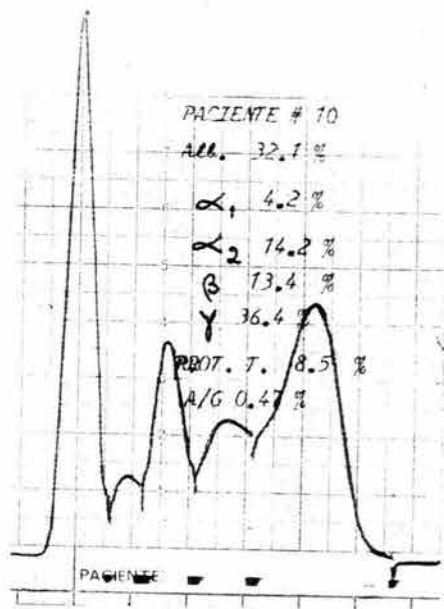


Scan



Scan





PORCENTAJES DE LOS DIFERENTES PROTEINGRAMAS
 CON DIAGNOSTICO DE MIELOMA MULTIPLE

VII

DISCUSSION

VII DISCUSION

La sensibilidad de la reacción antígeno-anticuerpo en el método de Turbidimetría, mostró que al hacer 11 diluciones seriadas del standar de calibración para cada curva de concentración, sirvió para delimitar las zonas de menor y la mayor sensibilidad de la reacción.

Debido a la concentración mayor de la IgG en suero, su rango de sensibilidad será el mayor IgG (51.2-3280) mientras, que para la concentración de C4 su rango menor será de (2.7-32.4).

Después de haber ensayado experimentalmente la dilución del - Polietilenglicol (PEG) a 10, 100, 20, 30, 60, 40 y 50 g/l se observó que la dilución adecuada en la cual se acelera la velocidad de la reacción antígeno-anticuerpo, corresponde a 50g/l.

El empleo del Tween 20, es solamente como detergente, ya que permite disminuir la tensión superficial de los sueros.

Las diluciones óptimas de los sueros standar de las diferentes proteínas plasmáticas, después de haber efectuado varias diluciones fueron:

IgG 1:30 IgA 1:20 IgM 1:30 C3 1:30 C4 1:10

Estas diluciones muestran ser las apropiadas para delimitar la zona de equivalencia de la reacción antígeno-anticuerpo junto con el antisuero diluido 1:10 para todas.

Su coeficiente de correlación fué $r = 0.99$ para cada una de ellas.

La absorbancia (D.O.) será dependiente de la concentración y tiempo para cada cinética de reacción. Los tiempos de reacción fueron:

IgG 10-120 seg IgM, C3 y C4 10-180seg
y el mayor corresponde a **IgA 10-240seg**

Las cartas de control de calidad presentan pequeñas diferencias en los promedios de lectura de cada proteína plasmática, sin embargo ningún caso rebasa los límites de tolerancia a partir de la media, tanto para el límite superior, como para el límite inferior (99%). El coeficiente de variabilidad (C.V.) para cada una fué de:

IgG 2.9, IgA 4.9, IgM 3.2, C3 1.6 y C4 2.9

Mediante el especto de absorción de estas proteínas plasmáticas, nos es posible observar que la mayor lectura para éstas se halla a 340nm, por lo cual se eligió esta longitud de onda para el presente trabajo, ya que otros autores afirman que las mejores lecturas para dichas proteínas plasmáticas se hacen en longitudes de onda correspondientes entre 360 y 380nm (43).

Al variar la concentración iónica temperatura y pH se altera el curso de la reacción de precipitación.

En cuanto a la temperatura no existe una diferencia significativa en el curso de reacción entre 25°C y 35°C. La temperatura para condiciones standar adecuadas fué de 35°C.

El pH adecuado para condiciones standar, fué de 7.0 para el diluyente del polietilenglicol.

Los antisueros líquidos adecuados para la técnica de Turbidi-

metría son los de conejo, conocidos como de alto grado Nefelométrico. Los antisueros de la Química Hoechts proveen excelentes resultados.

En cuanto a los Métodos de Nefelometría e Inmunodifusión Radial, se observó que hay una buena correlación con el Método de Turbidimetría, pero para el tiempo de las lecturas, éste varía mucho de acuerdo al método.

En el Mieloma Multiple sólo se acumulan anormalmente una clase de moléculas de inmunoglobulinas. El exámen electrofóretico de estas proteínas revela una banda bien definida que forma un pico muy alto y estrecho. La inmunoglobulina del Mieloma puede corresponder a cualquiera de las inmunoglobulinas.

La albúmina ocupa normalmente del 52 al 68% del valor protéico total, las globulinas que se han dividido en base a su movilidad electroforética en α_1 , α_2 , beta y gamma, el cociente albúmina/globulina y las proteínas totales.

VIII

CONCLUSIONES

VIII CONCLUSIONES

El espectrofotómetro Carl-Zeiss así como el espectrofotómetro Coleman Junior, mostraron ser aparatos adecuados para el montaje y aplicación de la Técnica Turbidimétrica, disponibles para cualquier Laboratorio Clínico.

La Turbidez medida por Turbidimetría puede ser cuantificable a los 2min. (90% de su valor máximo), a diferencia de Nefelometría, ya que sus lecturas se harán después de 1hrs. de la reacción antígeno-anticuerpo y por Inmunodifusión Radial hasta las 48hrs.

La Correlación entre las técnicas de Turbidimetría, Nefelometría e Inmunodifusión Radial fué positiva y alta para las tres, el coeficiente de correlación fué de $r = 0.93$ a 0.99 , se observó que en IgM y C3 la correlación fué mayor entre Turbidimetría vs IDR, a diferencia de Turbidimetría vs Nefelometría, debido probablemente a su PM de éstas, IgM 900,000 y C3 180,000.

Para IgG, IgA y C4 la correlación es similar entre Turbidimetría vs Nefelometría, debido probablemente, a sus características fisicoquímicas semejantes.

En las lecturas para los valores de referencia obtenidos de una población mestiza mexicana de las proteínas plasmáticas, la técnica de Nefelometría tuvo un mínimo mayor de porcentaje de precisión con respecto a Turbidimetría e IDR.

En el Control de Calidad elaborado para cada proteína plasmática por Turbidimetría los límites de confianza de este método se ajustan dentro de los límites de confianza de los métodos enzimáticos. C.V. = 10-20%.

El montaje y adaptación del Método Turbidimétrico obtuvo resultados favorables:

- a) El Espectrofotómetro fué el adecuado
- b) Los reactivos y antisueros proporcionados por la Química Hoechts, y que se emplean para Nefelometría, pueden ser utilizados por el Método de Turbidimetría, con la gran sensibilidad, especificidad y precisión esperadas.

IX

BIBLIOGRAFIA

IX BIBLIOGRAFIA

- 1.- ANIBAL R. 1982. Inmunología e Inmunoquímica. 2a. ed. El Manual Moderno. México. p.p. 18-26
- 2.- BARRET J.T. 1985. Inmunoquímica. 2a. ed. Belmont, California. p.p. 66-70
- 3.- KABAT E.A. 1982. Inmunoquímica Experimental. 3a. ed. Argentina. p.p. 106-110
- 4.- NORBET W.T. 1983. Química Clínica Moderna. 1a. ed. Interamericana. México. p.p. 106
- 5.- HENRY R.J., CANNON D.C., WINKELMAN J.W. 1985. Química Clínica Bases y Técnica. 2a. ed. Jims. Barcelona. p.p. 44-47 419-427
- 6.- ROSE N., FRIEDMAN H. 1984. El Laboratorio en Inmunología Clínica. 2a. ed. Panamericana. Argentina. p.p. 56-62
- 7.- LEVINSON, S.A., MACFATE R. 1982. Diagnóstico Clínico de Laboratorio. 5a. ed. El Ateneo. Buenos Aires. p.p. 404
- 8.- WIDMAN F.K. 1981. Interpretación Clínica de las Pruebas de Laboratorio. 2a. ed. Jims. Barcelona. p.p. 268-269
- 9.- FUDENBERG H. 1985. Inmunología Clínica. 5a. ed. El Manual Moderno. México. p.p. 400-401
- 10.- MARON Y PRUTON M. 1973. Fundamentos de Fisicoquímica. 4a. ed. Limusa. México. p.p. 849-871
- 11.- BEHRING INSITUT. Turbidimetrie mit-Antisera Behring. Vari-time-methode für IgG, IgA, IgM. Behringwerke AG. Med. Information und Vertrieb. Behring Diagnostika. Folleto
- 12.- BEHRING INSTITUT. Turbidimetrie mit-Antisera Berhing. Immunologische Bestimmungen mit. Analysenautomaten/Photometeren. Behringwerke AG. Information und Vertrieb. Behring Diasnos-tika. Folleto

13. ANDERSON, R.J., AND J.C. STERNBERG. 1978. A rate nephelometer for immunoprecipitin measurement of especific serum proteins. p.p. 409-469. In R. Ritchie (ed.). Automated immunoanalysis, part I. Marcel Dekker Inc. New York.
14. BLOM, M., AND N. HJORNE. 1976. Profile analysis of blood proteins with a centrifugal analyser. Clin. Chem. Winston-Salem, N.C. 22: 657-662
15. BRUVER, R.M., AND M.L. SALKIE. 1978. A comparative estudy of free approaches to the routine quantitation of human serum proteins. Clin. Biochem. 11: 112-116
16. BUFFONE, G.J., E.M. BRETT, S.A. LEWIS, M.IOSEFSOHN, AND J.M. HICKS. 1979. Limitations of immunochemical measurement of seruloplasmin. Clin. Chem. Winston-Salem, N.C. 25: 749-751
17. BUFFONE, G.J., AND S.A. LEWIS. 1977. Effect of analytical factors of immunochemical reference limits for complement component C3 in serum of a reference pediatric population. Clin. Chem. Winston-Salem, N.C. 23: 994-999
18. BUFFONE, G.J., AND S.S. LEWIS. 1979. Advantages of small angle light scattering mesurement for immunonephelometry. p.p. 55-61. In H. Peeters and P.H. Wright (ed.), Plasma protein pathology. Pergamon Press, Oxford.
19. BUFFONE, G.J., J. SAVORY., R.E. CROSS AND J.E. HAMMOND. 1975. Evaluation of kinetic light scattering as and approach to the measurement of especific proteins with the centrifugal analyzer. I. Methodology. Clin. Chem. Winston-Salem, N.C. --- 21: 1731-1734
20. DAVIS, N.C. AND M. HO. 1976. Quantification of immunoglobulins. p.p. 4-16. In N.R. Rose and H. Friedman (ed.), Manual of Clinical Immunology, 1st. ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
21. FINLEY, P.R., R.J. WILLIAMS, D.A. LICHTI, F. GRIFFITH, AND

A.L. THIES. 1979. Immunochemical determination of human immunoglobulins: use of kinetic turbidimetry and a 36-place centrifugal analyzer. Clin. Chem. Winston-Salem, N.C. 25: 526-530

22. HELLSING, K. 1978. Enhancing effects of monomeric polymers in immunochemical reactions. p.p. 67-112. In R. Ritchie (ed.), Automated immunoanalysis, part I. Marsel Dekker. Inc. N. York
23. KREUTZER, H.J.H. 1976. An immunological turbidimetric method for serum transferrin determination. J. Clin. Chem. Biochem. 14: 401-406
24. KUSNETZ, J., AND H.P. MANSBERG. 1978. Optical consideration: Nephelometry, p.p. 1-43. In R. Ritchie (ed.). Automated immunoanalysis, part I. M.D. Inc. New York
25. MALKUS, H., P. BACHBAUM, AND A. CASTRO. 1978. An automated turbidimetric rate method for immunoglobulins. Clin. Chem. Acta 88: 523-530
26. RAMAKERS, J.M., AND H.J.H. KREUTZER. 1976. Turbidimetric determination of haptoglobin. J. Clin. Chem. Biochem. --- 14: 407-410
27. RITCHIE, R.F., C.A. ALPER, J.GRAVES, N.PEARSON, AND C. LARSON. 1973. Automated quantitations of proteins in serum and other biological fluids. Am.J. Clin. Pathol. 59: 151-159
28. STERBERG, J.C. 1977. A rate nephelometer for measuring specific proteins by immunoprecipitin reactions. Clin. Chem. Winston-Salem, N.C. 23: 1456-1464
29. VAN MUNSTER, P.J.J., G.E.J.M. HOELEN, M. SAMWEL MANTINGH, AND M. HOLFMAN-VAN MUERS. 1977. A turbidimetric immunoassay (TIA) with automated individual blank compensation. Clin. Chem. Acta 76: 377-388
30. A. SIEBER Y.J. GROSS. Medical Laboratory Behring. Protein

- determination by laser nephelometry. p.p. 17-24 Vol. II
- 31.- CRAWLEY L.P. Electrophoresis and Immuno-electrophoresis, Boston, Little Brown. 1969.
 - 32.- MANCINI G., CARBONARA A.O., AND HEREMANS J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.* 2: 235-254. 1965.
 - 33.- REIMER C.B. AND MADDISON S.E. Standardization of human immunoglobulin quantitation: a review of current status and problems. *Clin. Chem.* 22 No. 5, 577 1976
 - 34.- WESTGARD J., HUNT R.M. Use and interpretation of common statistical test in method studies. *Clin. Chem.* Vol. 19 No.1 1973
 - 35.- HUDSON A.G., RITCHIE F.R., AND HADDOW E.J. Method for testing antiserum titer and avidity in nephelometric systems. *Clin. Chem.* 27/II, 1838-1844 1981
 - 36.- NORBERT GLEICHER M.D., THOMAS D., KERENYI M.D., PHILLIP B., AND SAUL B., GUSBERG M.D. The Beckman immunochemistry systems. A rapid method for the determination of immunoglobulins (IgG) and complement (C3) in blood and amniotic fluid. *The American Journal of Diagnostic Gynecology and Obstetrics.* Vol. 1/2 1979
 - 37.- CARL R.J. The immunoglobulins. IgG, IgA, IgM. Beckman. *Immunochemistry system.* 1979
 - 38.- PRAGA C., PAGLIANI E., DELILIERI G.L.R. Turbidimetry as a method for studying in vitro human platelet lysis by antibodies. *Haematologica*, 60 (3) 269-285 *Inst. Clin. Med. I, Via F. Sforza 35, Milano Italy.* 1975
 - 39.- BUFFONE G.J. Turbidimetry vs. light scattering in immunochemistry. *Clin. Chem.* 22(4), 556 *Clin. Chem. Dep. George Washington Univ. Sch. Med. and Child Hosp. USA.* 1976

- 40.- COFRANCESCO E., VIGILANTE A., REVOLTELLA R. A turbidimetric assay method for studying antibody induced lysis of hapten-coated erythrocytes. Clin. Lab. 6(2) 111-120 (Lab. Biol. Cell. Roma Italy) 1976
- 41.- DININNO V., CANDLESS E.L. Agarose medium turbidimetric assay for cross reacting antigens. (dep. Biol. Mc. Master Univ. Hamilton Ontario Canada). J. Immunol. methods 73-79 1977
- 42.- SINGER J.M., HENGEVELD J., EDBERG S.C., LICHTENBELT. Determination of antibody concentration using a stopped-flow turbidimetric technique. Immunol. Commun 6(5) 517-535 1977
- 43.- JACOBSEN C., STEENSGAARD J., AARHUS C. Measurement of precipitin reactions by difference turbidimetry: a new method. Denmark. Immunol. 36(2) 233-298 1979
- 44.- HILLS L.P., TIFFANY T.O. Comparison of turbidimetric and light-scattering measurements of immunoglobulins by use a centrifugal analyzer with absorbance and fluorescence/light-scattering. Clin. Chem. 26(10) 1459-1466 1980
- 45.- BOACKLE R.J., ADES E.W.J. Rapid kinetic method for detection of complement mediated damage to nucleated cells. Immunol. methods, 41(2) 257-266 1981
- 46.- PINTERA J., JURAK J. Albumin interaction with HBsAg as one of the possible sources of the Polyethylene Glycol "Immune Complexes". Turbidity in Hepatitis B. Acta Virol Vol. 26 No. 1-2 86-90 1982
- 47.- OTSUJI S., SHIBATA H., UMEDA M. Turbidimetric immunoassays of serum C-reactive protein. Clin. Chem. Vol. 28 No. 10 2121-2124 1982
- 48.- DEVERILL I., JEFFERIS R., LING N.R., LING W.G., REEVES. Monoclonal antibodies to human IgG: Reaction characteristics in the centrifugal analyzer. Clin. Chem. Vol. 27 No. 12 2044-2047 1981

- 49.- OUT T.A., Mc. DONALD J.R., WOLDHUESKANT J. The effect of reduction IgM on the quantitative determination of IgM by radial immunodiffusion and Turbidimetry. Clin. Chem. Acta Vol. 144 No. 2-3 115-126 1984
- 50.- FULTON R.E., DININNO V.L. Rapid rate kinetic turbidimetric assay for quantitation of varial complement-fixing antibodies. Canada. J. Vral Methods. Vol. 12 No 1 13-24 1985
- 51.- WITHMAN G.H. Principios de la Inmunología. 2a. ed. Interamericana. 100-108