

302927

UNIVERSIDAD FEMENINA DE  
MEXICO

7  
Lej

ESCUELA DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
CON ESTUDIOS INCORPORADOS A LA U.N.A.M.

"PRUEBAS INMUNOQUIMICAS"

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

P R E S E N T A:

LETICIA VELAZQUEZ MENDEZ.

MEXICO, D.F.

1992



## **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 está 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.

# INDICE GENERAL . .

	Pags.
I._ INTRODUCCION.	1
II._ OBJETIVO	2
III.- FUNDAMENTOS DEL RADIOINMUNOANALISIS. (RIA)	3
2.1 Generalidades.	4
2.2 Terminología.	5
2.3 Antecedentes Históricos.	5
2.4 Bases de las metodología por "RIA"	6
2.5 Variantes de las metodologías del "RIA".	8
2.6 Reactivos específicos de unión para el antígeno.	9
2.6.1 Uso de anticuerpos específicos.	10
2.6.2 Uso de determinadas proteínas normales.	12
2.3 Uso de enzimas.	13
2.6.4 Uso de receptores celulares.	14
2.7 Tipos de indicadores de marcaje.	15
2.7.1 Marcaje indicador con uno o más elementos. radiactivos.	15
2.7.2 Marcaje indicador en base a una actividad enzimática.	18
2.7.3. Marcaje indicador por emisión de fluorescencia	19
2.8 Sistemas separativos aplicables a metodologías por "RIA"	20
2.9 Usos de reactivos para métodos por "RIA"	23.

2.10 Recomendaciones sobre las técnicas de trabajo.	23
<b>III. BASES DE LAS PRUEBAS INMUNOENZIMATICAS.</b>	<b>24</b>
3.1 Antecedentes Históricos.	24
3.1.1 Técnicas electroforésis.	25
3.1.2 Técnicas de Inmunodifusión.	30
3.1.3 Técnicas de Inmunolectroforesis.	33
3.1.4 Técnicas de Radioinmunoanálisis.	35
3.2 Técnicas básicas de las pruebas Inmunoenzimáticas	36
3.2.1 Fundamentos básicos de las pruebas por "RIA".	37
3.2.2 Variantes según el tipo de marcaje indicador.	42
3.2.3 Sensibilidad de las pruebas Inmunoenzimáticas.	45
3.2.4 Sistemas Inmunoenzimáticos derivados de las técnicas básicas.	48
3.3 Sistemas heterogéneos y homogéneos.	49
<b>IV. SISTEMA "ELISA"</b>	
4.1 Introducción.	57
4.2 Antecedentes Históricos.	51
4.3 Fundamentos del Sistema "ELISA"	52
4.4 Componentes que integran el sistema.	53
4.5 Técnicas analíticas.	61
4.6 Variantes de las técnicas.	70
4.7 Aplicaciones Clínicas.	71
4.8 Ventajas y desventajas.	75

	Pags.
V. - SISTEMA "EMIT"	
5.1 Introducción	79
5.2 Desarrollo del sistema "EMIT"	83
5.3 Fundamentos del sistema "EMIT"	84
5.4 Componentes que integran el sistema	86
5.5 Técnicas Analíticas	91
5.6 Aplicaciones Clínicas	101
5.7 Ventajas y desventajas del sistema	102
VI. - FUNDAMENTOS DE LA INMUNOFLUORESCENCIA	
6.1 Introducción	103
6.2 Técnicas basadas en el uso de anticuerpos fluorescentes	104
6.3 Equipo necesario	107
6.4 Reactivos de uso habitual	108
6.5 Aplicaciones Clínicas	109
VII. - CLASIFICACION DE LAS PRUEBAS INMUNOQUIMICAS	110
7.1 Valoración de Hormonas	111
7.2 Perfiles de prevención y de orientación diagnóstica	112
7.3 Valoración de Medicamentos y Drogas	113
7.4 Valoración de Metabolitos	114
7.5 Marcadores Tumorales	114

	Págs.
7.6 Factores Inmunológicos	114
7.7 Pruebas Inmunoquímicas diversas	117
CONCLUSIONES	118
BIBLIOGRAFIA	122

## INTRODUCCION

En los últimos años, es decir aproximadamente a partir de 1976 y hasta el presente, la sofisticación de metodologías y el advenimiento de los adelantos de la electrónica y la computación, se han ido incorporando a nuevos instrumentos creados por la Bioingeniería. Ello ha permitido manejar datos acerca de componentes de los fluidos orgánicos, que si bien presentes en cantidades bajísimas, desempeñan esenciales funciones en los procesos que regulan el funcionamiento del cuerpo humano, tanto en estado salubre como patológico, De ahí que el vínculo y la intercomunicación entre el médico y el laboratorio clínico se han hecho más esenciales que nunca.

Este avance ha marcado el signo del cambio, de trabajar con métodos poco específicos, complejos y requiriendo bastante tiempo para realizarse, además de operar sobre muestras de apreciable volumen, se ha pasado a nuevas metodologías que requieren solo micromuestras y que exhiben la ventaja de una mayor sensibilidad y especificidad, asociados con procedimientos considerablemente simplificados.

En este aspecto, la Inmunología ha satisfecho la necesidad de disponer de métodos cada vez más sensibles, específicos y aplicables a los diversos campos del laboratorio clínico como es la Endocrinología, Infectología, Parasitología, Enfermedades de tipo Inmune, Enfermedades Neoplásicas y recientemente en el monitoreo terapéutico. (29)

## I. - OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo es poner al alcance de aquellas personas interesadas en estas técnicas, la información teórico-práctica que sea útil, de tal manera que se disponga de una información condensada, actualizada y de uso práctico en el acontecer diario del laboratorio clínico, teniendo así un panorama amplio de las diversas pruebas Inmunoquímicas clasificadas según el campo de aplicación clínica, conociendo además las ventajas y desventajas de cada una de las pruebas que aquí se han mencionado.



## II. - FUNDAMENTOS DE RADIOINMUNOANALISIS

Las reacciones inmunológicas se utilizan en procedimientos analíticos, tanto de tipo cualitativo o de detección, como de tipo cuantitativo o de valoración, permitiendo alcanzar altos niveles de especificidad y de sensibilidad. El uso de anticuerpos y/o de antígenos marcados con distintos tipos de indicadores, demuestran ser particularmente útil para el estudio de los fluidos y tejidos del organismo humano.

Con este objetivo y desde hace un buen número de años, se han estado empleando varios colorantes fluorescentes y la inmunofluorescencia constituye una forma metodológica diagnóstica bien establecida que encuentra amplia aplicación en la Microbiología y en la Patología Clínica (1).

Sin embargo, los procedimientos de inmunofluorescencia no son rápidos, no se adaptan con facilidad en autoanalizadores y la lectura de los resultados se hace generalmente en forma subjetiva, lo que introduce un factor indeseable de variación en los mismos.

Un tipo de indicadores de marcaje que se usan en antígenos y/o en anticuerpos son los elementos bajo su forma de isótopos radiactivos, con ellos nació la ciencia y la industria del Radioinmunoanálisis (RIA). (29)

## 2.1 - GENERALIDADES .

El desarrollo de las técnicas por RIA constituye un hecho importante, que en años recientes demostró ser una contribución del real progreso en muchas áreas de la medicina moderna (24).

Las metodologías que se usan en el RIA son de gran sensibilidad y exhiben un alto grado de especificidad, lo que nos permite realizar cuantificaciones exactas y precisas, de una gran variedad de componentes biológicos tales como:

- Péptidos.
- Hormonas
- Vitaminas
- Medicamentos.

Elementos todos ellos, que generalmente se encuentran en bajas concentraciones en los tejidos y en los fluidos del organismo, pero que aún así, son de importancia considerable para el mantenimiento de la salud, en las enfermedades y en tratamientos terapéuticos. (24)

En la actualidad, usando las técnicas del RIA, se valoran niveles de varios centenares de diferentes sustancias, algunas de ellas se manifiestan en la sangre en concentraciones bajísimas, del orden de nanogramos y aún picogramos por mililitro. (25)

Antes de que se dispusiera de las técnicas del RIA, muchas de esas sustancias solo se podían valorar empleando métodos muy tediosos, largos y con

un alto grado de dificultad, por lo que frecuentemente resultaban imposibles - de incorporarse a la rutina práctica del laboratorio clínico.

## 2.2 TERMINOLOGIA

El término Radioinmunoanálisis o el de sus siglas RIA, son los que se usan en forma generalizada.

El usar otros términos puede llegar a crear confusiones, como ejemplos - tenemos:

- Análisis por saturación.
- Análisis por desplazamiento
- Radioanálisis (RA)
- Radioensayo

Estos términos o expresiones resultan de usarlos en base a los fundamentos que rigen a ciertas metodologías del RIA, o bien por el tipo de reactivos que utilicen en las mismas. (24)

## 2.3 ANTECEDENTES HISTORICOS

Entre los años de 1950 y 1960, Berson y Yallow estudiaban el comportamiento de la insulina marcada con  $^{131}\text{I}$ , reportaron ciertas de sus observaciones, las que, posteriormente sirvieron de base para el desarrollo de un método por - RIA, que valora niveles de insulina en plasma. Así mismo comprobaron que cuando se trata a un paciente diabético con insulina marcada, este desarrolla anticuerpos. También tuvieron éxito cuando intentaron producir la inducción de anticuerpos a la insulina marcada en animales de laboratorio.

Además, detectaron un hecho que a la postre tendría un valor fundamental para el desarrollo de los métodos del RIA, que In vitro, la insulina no marcada, tiene la capacidad de desalojar a la insulina marcada de su unión con el anticuerpo, lo que ocurre por razones de una mayor afinidad con el anticuerpo.

Finalmente, constataron que a una concentración de anticuerpo constante, la cantidad de insulina marcada queda unida, es cuantitativa con respecto a la cantidad de insulina no marcada, presente en la muestra en estudio y/o sistema reactivo empleado en la prueba. (44)

#### 2.4 BASES DE LA METODOLOGIA POR "RIA"

Los elementos que se necesitan para efectuar la valoración de un antígeno, por medio de las técnicas del RIA, son las siguientes:

- a) Un anticuerpo específico para el antígeno a valorar
- b) Un antígeno marcado con un indicador.
- c) Un antígeno no marcado, de concentración desconocida
- d) El mismo antígeno no marcado pero bajo forma de un estándar.
- e) Un sistema separativo o seleccionada para usar en la prueba.

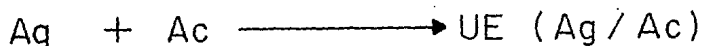
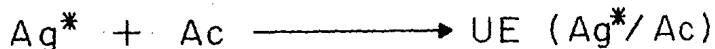
Podríamos comenzar por representar lo que ocurre en la prueba, de la siguiente manera, usando las abreviaturas que se indican.

Ag\* Antígeno marcado

Ag Antígeno no marcado (desconocido o estándar)

Ac Anticuerpo

UE Unión específica (complejos que se forman)



Antígeno no marcado: está representado por dos elementos, el primero como el del antígeno o elemento desconocido, que está presente en la muestra en estudio y cuyo nivel se desea valorar; el segundo, representado por una preparación que lo contiene en concentraciones conocidas y que usa como un estándar de referencia en la prueba a realizar.

Sistemas separativos: son el procedimiento que permite separar o bien medir diferencialmente, la fracción del antígeno marcado que permanece unida a su anticuerpo específico, de aquella fracción del antígeno marcado que se encuentra en estado libre.

EJEMPLO: tengamos el caso de tener que valorar niveles de insulina en plasma por RIA, para ello debiéramos contar con los siguientes elementos:

- a) Anticuerpos específicos a la insulina
- b) Insulina marcada con un indicador
- c) Insulina no marcada (en la muestra a valorar)
- d) Insulina no marcada (en un estándar de referencia)
- e) Un medio reactivo con buffer apropiado.
- f) Un sistema separativo

Fundamento de la metodología: el componente a valorar en la muestra del plasma del paciente (antígeno no marcado o insulina no marcada), compete con el antígeno marcado con un indicador (insulina marcada) en su tendencia a unirse al anticuerpo específico.

Cuanto más insulina contenga la muestra, menor será la cantidad de insulina marcada que permanecerá unida a los anticuerpos específicos. La obtención del resultado final del análisis se logra mediante lecturas efectuadas en curva estándar, trazadas con anterioridad. (34)

## 2.5 VARIANTES DE LAS METODOLOGÍAS DEL "RIA,"

La determinación de  $T_4$  (tiroxina tetrayodotironina) por RIA fue descrita por primera vez por Elkins, en 1974, consiste en utilizar como reactivo específico de unión con el compuesto o antígeno a valorar ( $T_4$ ), no un anticuerpo específico, sino una proteína plasmática, la TBG o globulina fijadora de tiroxina.

Dado que aquí no se utilizan anticuerpos, esta metodología representa una verdadera variante de las técnicas RIA, pues se sigue empleando antígeno

nos marcadores con un indicador (tiroxina marcada).

Radioanálisis: es justificable entonces, llamar a la metodología de Elkins para distinguirla de las de reactivos en base a anticuerpos específicos.

Otros tipos de variantes serían:

- a) Usar receptores celulares como elementos de captación del antígeno a valorar.
- b) Usar enzimas, como elementos de captación del antígeno a valorar, dichas enzimas ligadas a anticuerpos específicos.

Pero sea cual sea la técnica del RIA o su variante, en todos los casos se deberá contar con un sistema separativo que nos permita distinguir entre componentes retenidos bajo formas de unión o complejos. (75)

## 2.6 REACTIVOS ESPECIFICOS DE UNION PARA CON EL ANTIGENO.

Estos son esenciales en todas las técnicas del RIA o en sus diferentes variantes, y suelen emplearse entre otros:

- a) Anticuerpos específicos.
- b) Determinadas proteínas normales.
- c) Determinadas enzimas (unidas o no a anticuerpos)
- d) Receptores celulares.

Cada uno de estos tipos de reactivos específicos de unión, tienen sus --

ventajas y desventajas, no hay ningún tipo ideal de reactivo entre ellos.

Propiedades de los reactivos específicos de unión.

Hay dos características importantes que deben observarse en estos elementos:

- a) El grado de especificidad para el antígeno a valorar.
- b) El grado de afinidad para dicho antígeno.

#### 2.6.1 Uso de anticuerpos específicos.

Los anticuerpos específicos son el tipo de agentes de unión que se utilizan más frecuentemente.

Empleando animales, como cabras, conejos o carneros, se pueden inducir en ellos la producción de anticuerpos contra una gran variedad de compuestos químicos como son:

- a) Proteínas
- b) Hormonas
- c) Medicamentos
- d) Metabolitos intracelulares.

Muchos de los antígenos contra los que se desea obtener anticuerpos, son compuestos de peso molecular bajo, con frecuencia inferior a la cifra de los 1,000 Daltons, y no poseen una capacidad inmunogénica por sí mismos, se les tiene que unir a un portador protéico.

Dichos compuestos, llamados convencionalmente antígenos, en realidad no lo son, más bien podrían ser considerados como un tipo de haptenos, ya



que dan especificidad pero no son capaces de inducir la formación de anticuerpos.

Ventajas de los anticuerpos específicos.

Permiten el desarrollo de una variedad de metodologías de alta especificidad y de una gran sensibilidad, para detectar niveles muy bajos del antígeno a valorar.

Desventajas de los anticuerpos específicos.

Al inducir la producción de anticuerpos en animales, se llega a obtener el correspondiente antisuero, pero al usarlo en la práctica, frecuentemente se tropieza con el inconveniente de que ocurran reacciones cruzadas.

Ejemplo. un anticuerpo a la dogoxina, puede llegar a reaccionar también con la dígoxina.

Un anticuerpo a la L-tiroxina, puede llegar a reaccionar con la D-tiroxina

En varias de las hormonas del tipo de las glucoproteínas como son las siguientes:

TSH Hormona estimulante tiroidea (HET)

LH Hormona Lutinizante (HL)

FSH Hormona estimulante del folículo (HEF)

HGC Hormona Gonadotrofina Coriónica Humana.

Existen entre estas cadenas carbonadas muy similares y, por consiguiente para que ocurran reacciones cruzadas, en las que un anticuerpo específico a una de estas hormonas reacciona también con alguna o algunas de las restantes.

Hay ocasiones en las que los problemas de una reactividad cruzada se hacen tan serios, que anulan en valor práctico de una determinada metodología del RIA.

Una forma de solucionar el tipo de problemas que representan los casos - de reacciones cruzadas, consiste en emplear el antisuero más específico que sea posible de producir y eliminar de la muestra, por procedimientos de adsorción, a aquellos antígenos que puedan originar dichas reacciones, aprovechando las diferencias que en grados de afinidad pudieran existir entre el anticuerpo y el antígeno.

Otra desventaja que puede presentarse es: que el anticuerpo buscado, -- puede ser difícil de producirse.

En este tipo de metodologías se valora como resultado, una actividad inmunológica, y no una actividad biológica, que sería más recomendable. (59.7)

#### 2.6.2 Uso de determinadas proteínas normales.

El usar proteínas naturales o normales como agentes de unión específica resulta ser algo atractivo, ya que las mismas requieren de poca o casi ninguna preparación previa. Además, sus características y sus propiedades suelen ser, en general, consistentemente uniformes y confiables.

El suero sanguíneo humano contiene proteínas que pueden actuar como - agentes de unión específica para con algunos de sus componentes importantes, como son: Cortisol, Hormonas Tiroideas, Testosterona, Vitamina B<sub>12</sub>.

Se pueden usar proteínas naturales de unión específica, pero no necesari-

riamente de origen humano.

Así se han desarrollado métodos del tipo RA para la vitamina B<sub>12</sub> usando elementos proteínicos como agentes de unión, entre ellos, factor intrínseco de cerdo y suero de pollo.

Ventajas de usar proteínas normales:

Estas proteínas son compuestos estables, relativamente no costosos hasta el grado de ser muy económicos y fácilmente pueden ser producidos como reactivos de laboratorio. Además presentan características uniformes de lote a lote.

Desventajas de usar proteínas normales:

Son disponibles sólo para un número limitado de compuestos.

No muestran una buena especificidad ni afinidad para el elemento a valorar.

### 2.6.3 Uso de enzimas.

También se pueden usar enzimas como agentes específicos de unión con el compuesto a valorar, principalmente cuando se trata de evaluar niveles de fármacos y en esquemas de monitoreo terapéutico.

Así en una forma de unión proteica competitiva, se determinan niveles de metrotexato, en base a su unión con la enzima dihidrofolatoreductasa.

El metrotexato es un fármaco, antagónico del ácido fólico, aunque químicamente, resultó ser un análogo de este último.

Se le usa en terapéutica por poseer propiedades antitumorales. También se le emplea en tratamientos de Leucemia aguda y en otras enfermedades de -

de tipo neoplásico. (8)

#### 2.6.4 Uso de receptores celulares.

Otros elementos que pueden usarse como fuentes de unión específica son los genéricamente llamados receptores celulares, estos pueden ser:

- a) Receptores de membrana.
- b) Receptores citoplasmáticos.
- c) Receptores nucleares.

El término receptor, designa a una molécula o a un complejo molecular - que es capaz de reconocer y de desarrollar una interacción al unirse a sustancias que pueden ser, una hormona, un neurotransmisor o un principio activo.

La especificidad de un receptor va dirigida hacia la porción biológicamente activa de la sustancia a la que se une.

Las fuentes que se usan para elaborar preparaciones de receptores, pueden incluir el empleo de células intactas o fracciones de ellas.

Las preparaciones a base de células intactas se logran a partir de sangre y de cultivo de tejidos.

Según las técnicas que se emplean para el aislamiento de células, se podrán afectar, en mayor o menor grado, la concentración y la afinidad propia de un determinado receptor celular en particular.

En términos generales, las metodologías que emplean receptores celulares, son menos sensibles que los inmunoensayos, por la avidez propia y características que exhiben los anticuerpos para con sus antígenos específicos.

cos.

Ventajas de los receptores celulares:

Nos permiten medir actividades biológicamente funcionales, en lugar de depender de resultados de valoraciones de actividades de tipo inmunológico o pasivo.

Desventajas de los receptores celulares:

Su relativa inestabilidad

Ocurrencia de casos de uniones inespecíficas. (4º)

## 2.7 TIPOS DE INDICADORES DE MARCAJE

La molécula indicadora puede llevar un marcaje de cuando menos tres tipos diferentes, como son:

### 2.7.1 Marcaje indicador con uno o más elementos radiactivos.

Toda metodología de tipo RA o RIA utiliza como moléculas indicadoras a compuestos marcados con uno o más elementos radiactivos.

Ventajas:

Aún cuando este tipo de marcaje indicador nos presenta algunas innegables desventajas, se le emplea extensamente, en razón de su flexibilidad y su alta sensibilidad, ambas propiedades constituyen ventajas de una indudable importancia en la práctica del trabajo de laboratorio.

Desventajas:

Sus posibles efectos perjudiciales para la salud

Su relativa inestabilidad del marcaje radiactivo.

El costo de los equipos de detección de la radiactividad.

Isótopos que se usan en RIA y en RA; generalmente estos caen únicamente en una de las siguientes categorías:

- 1) Emisiones de rayos beta como el ( $^3\text{H}$ )
- 2) Emisiones de rayos gamma como el ( $^{125}\text{I}$ )

Nociones básicas de Radioactividad. cada elemento tiene un número único de electrones y un número de protones, lo que es propio y característico de cada elemento. Aquellos átomos de un mismo elemento que tienen el mismo número de protones, pero diferente número de neutrones en su núcleo, son los llamados Isótopos. Aquellos isótopos que son inestables y que van emitiendo rayos radiactivos, son los llamados radioisótopos.

La emisión de la radioactividad puede ser de tres tipos diferentes:

- 1) Radiaciones de partículas alfa, son núcleos de helio, tienen dos neutrones y dos protones y una carga positiva neta de +2.
- 2) Radiaciones de partículas beta, tienen una masa igual a la de un electrón y una carga neta de una unidad.
- 3) Radiaciones de rayos gamma, son emisiones electromagnéticas.

Marcaje con elementos que emiten partículas beta. El reemplazar un átomo de hidrógeno con uno de tritium, en una molécula, no da lugar a cambios que influyan desfavorablemente sobre la antigenicidad de la misma, lo cual -

Es una ventaja, los compuestos marcados son, en general, de buena estabilidad y como el tritium tiene una vida media de 12 años, al ser usados como reactivos, tienen una larga vida, presentando una ventaja adicional.

Hay reactivos capaces de absorber las radiaciones beta y emitir luz, lo que da las bases que permiten obtener los resultados finales de los análisis.

El tiempo requerido para preparar la muestra y el costo de los reactivos, son la desventaja para trabajar con este tipo de marcaje que emplea emisiones beta.

Marcaje con elementos que emiten rayos gamma. Hay varias ventajas que favorecen el uso de materiales marcados con isótopos de emisión gamma.

Una de ellas, es que la cuenta de este tipo de emisiones radiactiva se hace en forma directa y lleva poco tiempo. Casi siempre bastará un minuto.

Los datos de interés sobre elementos radiactivos de este tipo de emisión podrían considerarse de la siguiente manera:

- Co 57 se usa para marcar compuestos como la vitamina B<sub>12</sub>
- Se 75 se usa para marcar compuestos esteroídes
- <sup>125</sup>I y <sup>131</sup>I. en la actualidad, el <sup>125</sup>I es el isótopo más frecuentemente utilizado dentro de las emisiones gamma.

El <sup>125</sup>I tiene varias ventajas sobre el <sup>131</sup>I

- es más fácil de obtenerlo.
- su emisión radiactiva se cuenta mejor
- tiene una vida mayor

- la emisión del  $^{125}\text{I}$  es menos energética que la del  $^{131}\text{I}$  por lo que su manejo continuo representa un peligro menor para la salud del operador.

Como el  $^{125}\text{I}$  es un emisor débil, parte de sus radiaciones se escapan al conteo. Hay diferencias en las pérdidas que varían según el material de los tubos usados en la prueba. Comparando los tubos de vidrio y los de material de plástico, se comprueba que con tubos de vidrio las pérdidas son mayores en un 20%. (10)

### 2.7.2 Marcaje Indicador en base a una actividad enzimática.

Hay dos tipos de metodologías derivadas de los principales fundamentos del RIA, es decir, son pruebas inmunológicas, pero con la particularidad de que recurren al uso de enzimas como elementos indicadores y por consecuencia eliminan la necesidad de manejar materiales radiactivos.

Dado que emplean enzimas, se les llama metodologías inmunoenzimáticas pueden ser consideradas entonces como un tipo especial de pruebas inmunológicas. Se les identifica por medio de siglas y comercialmente se les llama sistemas en lugar de metodologías o técnicas, así tenemos:

- 1) Sistema "ELISA" Antígenos Séricos ligados a enzimas.
- 2) Sistema "EMIT" Técnicas de inmunoensayo con enzimas múltiples

Dichos sistemas se describen en los capítulos IV y V de este trabajo, de una manera detallada.



### 2.7.3 Marcaje indicador en base a la capacidad de emitir fluorescencia.

Algunos compuestos químicos, poseen la propiedad de absorber la energía luminosa y de reemitir después esa energía en forma de luz de mayor longitud de onda, que aquella luz originalmente absorbida. Este fenómeno es llamado fluorescencia y puede encontrar aplicación para el desarrollo de metodologías de valor práctico para el laboratorio clínico, especialmente en estudios de serología.

Habitualmente la luz excitadora que se emplea, es la ultravioleta o la ultravioleta cercana dentro del rango de los 250 a 400 nm, en tanto que la fluorescencia emitida es de una longitud de onda mayor.

Los procedimientos de inmunofluorescencia, permiten detectar y titular anticuerpos y antígenos por procedimientos directos e indirectos. Se basan en conjugar un anticuerpo con un fluorocromo como la fluoresceína, detectando la fluorescencia con un sistema óptico adecuado. Dichos procedimientos se describen con mayor detalle más adelante.

L Las pruebas que se basan en la inmunofluorescencia y que son requeridos con relativa frecuencia al laboratorio son:

- 1) Anticuerpos fluorescentes a Treponema (FTA-ABS)
- 2) Anticuerpos antinucleares fluorescentes a Lupus eritematoso, Artritis reumatoide, reacciones a fármacos.
- 3) Anticuerpos fluorescentes a Cisticercosis y Toxoplasmosis. (5)

## 2.8 SISTEMAS SEPARATIVOS APLICABLES A

### METODOLOGIAS POR RIA

El punto final de toda metodología por RIA, involucra la determinación de la proporción relativa en que se encuentra coexistiendo, al final del procedimiento analítico, las siguientes fracciones:

- 1) Antígeno libre o desligado de su unión con su anticuerpo
- 2) Antígeno que permanece unido a su anticuerpo

A fin de determinar la distribución de las fracciones, se cuantifica, ya sea el antígeno libre o el antígeno combinado, por vía directa o indirecta.

Se han desarrollado no menos de cinco tipos diferentes de sistemas de separación. Algunos de los primeros sistemas empleados, aquellos de tipo electroforético, ya casi no se usan en pruebas de rutina por RIA, por haber sido desplazadas por otros sistemas técnicamente más ventajosos. Aún así cabría mencionar los siguientes tipos de separación:

- 1) Por migración diferencial
- 2) Por adsorción
- 3) Por precipitación del complejo antígeno-anticuerpo
- 4) Por acoplamiento a una fase sólida
- 5) Por métodos de combinación

1) Por migración diferencial, fundamentados en diferencias en la carga o polaridad de las fracciones o también en diferencias en el peso molecular

de las mismas, se basan en el uso de procedimientos de electroforesis o filtración selectiva.

2) Por adsorción, generalmente la fracción que se adsorbe es aquella que contiene el antígeno o compuesto a detectar o valorar, en estado libre. Este tipo de método de separación se usa para, esteroides, péptidos de bajo peso molecular y ciertos fármacos (como la digoxina)

Son muy adecuados para trabajar sobre antígenos o compuestos de un peso molecular inferior a los 30,000 Daltons. Como adsorbente se usa una variedad de elementos tales como:

Carbón pretratado (como el Norit A)

Silicatos (como talco, Florisil, Quso G-32)

3) Por precipitación del complejo antígeno-anticuerpo, así queda en solución la fracción que contiene el antígeno libre.

El sistema precipitante que se emplea es de un tipo inespecífico y se integra básicamente, con sulfato de amonio, etanol y polietilenglicol. Frecuentemente se usa como precipitante a un segundo anticuerpo (anti-anticuerpo).

4) Por acoplamiento a una fase sólida, se puede insolubilizar en forma de capas de revestimiento interno (de tubos, discos u otros materiales), o exteriormente sobre soportes sólidos, diversos anticuerpos, que se ligan por uniones químicas covalentes o no covalentes.

En sí, este procedimiento constituye un sistema separativo en fase sólida, permite separar fracciones rápida, versátil y eficientemente.

Su principal desventaja radica en que requiere el uso de cantidades relativamente grandes de anticuerpos.

5) Por métodos de combinación, consiste en usar simultáneamente, en un sistema separativo, dos diferentes tipos de anticuerpos. De ahí, que también se llame método de doble anticuerpo. Por ejemplo, se induce en un conejo, la producción de anticuerpos contra el antígeno o compuesto a detectar, obteniendo así un primer anticuerpo; pero el procedimiento analítico utiliza a un segundo tipo de anticuerpo, que serán dirigidos contra la gamma globulina del conejo.

Los anticuerpos del segundo tipo son, entonces, verdaderos anti-anticuerpos o anti-inmunoglobulinas. Se unen al complejo soluble formado por la unión antígeno/primer anticuerpo, se precipita y así, es posible la separación de dichas fracciones.

Los sistemas separativos tipo doble anticuerpo, se usan frecuentemente en metodologías de valoración de hormonas y polipéptidos. (25,29)

## 2.9 USO DE REACTIVOS PARA METODOS POR RIA.

Selección de metodologías: hay una gran variedad de productos comerciales, por ejemplo, para Tiroxina por RIA existen mas de 30 "kits" o sistemas reactivos de diferentes marcas en venta en la actualidad.

Al seleccionar un determinado producto comercial, se deben tener en cuenta los diferentes elementos y circunstancias que en ello van involucrados, entre los cuales tenemos:

Costo.	Tipo de sistema separativo
Tipo de marcaje	Posibles reacciones cruzadas
Equipo necesario	Tiempo total requerido por análisis

## 2.10 RECOMENDACIONES SOBRE TECNICAS DE TRABAJO.

Se recomienda hacer todo análisis por RIA, trabajando en duplicado y - además, usar para cada alícuota de muestra dos diluciones de la misma, con lo que siempre se habrá de operar sobre cuatro tubos por paciente, para poder certificar la lineabilidad del procedimiento y su buena precisión.

Con la mejor calidad técnica, la precisión de los análisis por RIA, no llega a ser mejor que la de observar una variabilidad mínima de 6%, entre el resultado a analizar en una alícuota y aquel que se obtenga para su duplicado. (6)

### III.- BASES DE LAS PRUEBAS INMUNOENZIMATICAS.

A partir de 1980, el auge de las pruebas inmunoenzimáticas en el laboratorio clínico, han alcanzado niveles nunca imaginados cuando se iniciara su desarrollo, aproximadamente en 1967.

P.K. Nakane y G.B. Pierce, en un reporte de sus investigaciones ya sugerían que era posible desarrollar métodos inmunoenzimáticos indirectos, semejantes a los que ya se usaban por inmunofluorescencia indirecta, ambos aplicables para detectar o localizar antígenos por microscopía. (24)

#### 3.1 ANTECEDENTES HISTORICOS.

Si uno quisiera comprender como se ha llegado al nivel actual de desarrollo y sofisticación en las técnicas inmunoenzimáticas, convendría tomar en cuenta a aquellas técnicas que las han precedido, ya que ellas representan verdaderos antecedentes históricos en este tema de tanto interés actual para el laboratorio. Por ello resulta justificable hacer, en este capítulo, una referencia breve acerca de las técnicas analíticas siguientes:

Técnicas por electroforesis

Técnicas por inmunodifusión

Técnicas por inmunolectroforesis

Técnicas por radioinmunoanálisis

Técnicas por inmunofluorescencia.

y comentar sus respectivas limitaciones e inconvenientes. Ello nos explica la - evolución tecnológica que ha ido ocurriendo hasta llegar a las técnicas inmuno enzimáticas, que han de inducir cambios en la Inmunoquímica, a manera similar de como las técnicas cinéticas modificarán el campo de la Enzimología Diagnós tica. (24)

### 3.1.1 Técnicas por Electroforesis

**Definición:** Electroforesis es el término que se utiliza, en forma genérica, para describir el desplazamiento de formas moleculares ionizadas, a través de una solución electrolítica, cuando está última se sujeta a la acción de un cam po eléctrico.

**Ionoforesis:** término que emplea cuando las moléculas ionizadas son de - bajo peso molecular, de composición simple y perfectamente definida, como o - curre en el caso de los aminoácidos.

Estrictamente hablando, al decir Electroforesis, se refiere al movimiento de formas moleculares de mucho mayor peso, como las protefnas.

El investigador sueco Arne Wilhelm Tiselius es considerado como el autor de la electroforesis, a raíz de sus trabajos sobre la separación de protefnas - séricas humanas, realizados entre 1937 y 1939, empleando tubos de cuarzo, en forma de U, conteniendo el suero incorporado a una solución electrolítica. (1)

## MEDIOS DE TRANSPORTE.

El proceso de la electroforesis, requiere incorporar la muestra en un medio de transporte, que va embebido en el amortiguador que se haya seleccionado - para la separación electrolítica.

Los medios de transporte tomados como preferentes, han ido variando a medida que las técnicas electroforéticas se fue perfeccionando; el listado siguiente nos indica la evolución sufrida:

papel filtro.

gel de agar

gel de agarosa

gel de poliacridina

acetato de celulosa

### Soluciones amortiguadoras.

En la electroforesis de protefnas, en general, se utilizan, casi -- siempre soluciones amortiguadoras con un pH arriba de 8.0

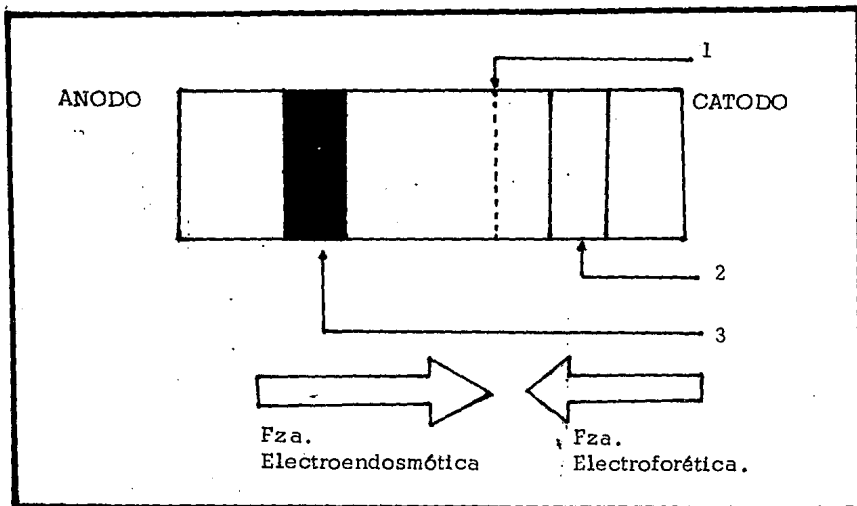
La velocidad de desplazamiento de las protefnas ionizadas, en un medio de soporte amortiguador sobre el que actúa un campo eléctrico, depende, fundamentalmente del pH y de la fuerza iónica provista por la solución -- buffer que se use.

Una solución amortiguadora típica de las que se usan en la electroforesis de protefnas, es el Veronal/veronal sódico, de pH 8.6



Veronal es un nombre comercial, para el barbital o ácido dietil barbitúrico.

Fig. 1 Separación electrofórtica de las proteínas séricas.



- 1.- Punto de aplicación de la muestra.
- 2.- Banda de las gamma globulinas.
- 3.- Banda de la albúmina.

En un campo eléctrico, el flujo de la corriente va del cátodo al ánodo, según se ilustra en la Fig. 1.

La intensidad de corriente, para el caso de una electroforesis, se identifica con la expresión fuerza electroforética. (19)

Pruebas de laboratorio que se realizan por electroforesis.

En la actualidad, los procedimientos de electroforesis se aplican a la realización de aproximadamente unas 15 pruebas de laboratorio, como lo se--  
rían; fraccionamiento de lipoproteínas séricas y de hemoglobinas.

Acido vanillinmandélico (AVM) en orina

Aminoácidos en orina (cromatograma urinario)

Glicoproteínas

Haptoglobinas

Hemoglobinas

Isoenzimas de CK (Creatinoquinasa)

Isoenzimas de DHL (Deshidrogenasa láctica)

Isoenzimas de fosfatasa alcalina

Isoenzimas de glucosa 6-fosfatodeshidrogenasa

Isoenzimas de glutamil transpeptidasa

Lipoproteínas

Proteínas de líquido cefalorraquídeo

Proteínas séricas

Proteínas urinarias

Limitaciones de los procesos electroforéticos.

El uso de tecnologías de electroforesis aplicado al fraccionamiento de proteínas contenidas en líquidos y fluidos biológicos, constituyen un ele--  
mento relativamente valioso, dentro de los recursos de que se dispone en -

Para el tema que nos ocupa, PRUEBAS INMUNOQUIMICAS, las técnicas electroforéticas que caben dentro de él, serían proteínas de líquido cefalorraquídeo, séricas y tal vez las urinarias.

Aún así, estos procedimientos nos detectan grupos de proteínas y no proteínas específicas, como serían los casos de tener que detectar o cuantificar niveles de antígenos y/o anticuerpos en particular.

Es por ello, que dichas pruebas son de poco valor como pruebas inmunológicas de diagnóstico clínico, a la luz de los avances logrados en las últimas décadas, a partir de 1957 con el RIA y más recientemente con los sistemas ELISA desde 1971, y EMIT en 1978. Estos dos últimos sistemas inmunoenzimáticos y sus técnicas correlacionadas, han renovado ampliamente la variedad de pruebas de laboratorio que se pueden realizar actualmente en el campo de la Inmunología. (34)

### 3.1.2 Técnicas de Inmunodifusión.

Los procedimientos de Inmunodifusión radial constituyen un elemento de uso más frecuente que los de electroforesis.

Fundamentos de la Inmunodifusión radial.

Las técnicas de la Inmunodifusión radial se basan en reacciones del tipo antígeno-anticuerpo.

El antígeno, en análisis séricos, está representado por una proteína o por un grupo de ellas correlacionadas entre sí, pero en ambos casos, con la característica de ser específicas para el ser humano.

El anticuerpo, en análisis séricos, está representado por una proteína o por un grupo de ellas correlacionadas entre sí, presentes en el suero de un animal (antisuero humano), cuya producción se ha desarrollado en el mismo - después de habersele inyectado el antígeno humano cuya detección o valoración interesa en particular.

#### Materiales y métodos de la Inmunodifusión Radial.

La inmunoprecipitación es el método más simple y directo para la demostración en el laboratorio, de lo que ocurre en las reacciones antígeno/anticuerpo.

En otras palabras, la finalidad de cualquier técnica de inmunodifusión radial, es identificar una reacción antígeno/anticuerpo mediante una reacción específica de precipitación. Su aplicación clínica más importante se relaciona con la medición de las inmunoglobulinas presentes en muestras de suero humano.

#### Pasos típicos en una técnica de Inmunodifusión.

1) Se trabaja con cajas Petri, cada una de las cuales contiene una solución semisólida de agar a la que se incorpora el antisuero específico para el antígeno o inmunoglobulinas a detectar o valorar en el suero en estudio.

2) Las cajas de Petri son de tipo modificado por que contiene un número variable de copas pequeñas, sobresalientes de la capa de agar, que configuran pequeños pozos, los cuales se llenan con cantidades medidas con presi-

sión, con la muestra en estudio y con controles en diluciones seriadas. Este procedimiento se efectúa una vez que el gel contenido en las cajas haya endurecido.

3) Se deja que las muestras, los controles y sus diluciones se difundan radialmente, desde sus pozos, de 24 a 48 horas

4) La unión del antígeno (inmunoglobulinas de la muestra y sus controles) con su anticuerpo específico presente en el antisuero contenido en el gel, se evidencia por la precipitación que adopta la forma de un borde, alrededor del pozo correspondiente.

5) Los controles que se usan en diluciones seriadas, van formando anillos de tamaño decreciente en relación directa a la concentración de antígeno presente.

6) Los resultados del análisis se expresan en mg/dl y se obtienen de una curva de referencia, que expresa la relación entre el diámetro de los anillos de precipitación y sus correspondencias, con concentraciones del antígeno a valorar en muestras de suero.

Este método de determinación cuantitativa, representa la técnica más sencilla de todas las que actualmente se usan en forma rutinaria en el laboratorio clínico y fue desarrollada por Mancini y sus colaboradores en 1965. Se pueden practicar no menos de 20 tipos de pruebas de valoración de proteínas séricas específicas por este método, las cuales son:

Albúminas

Hemopexina

Antitripsina	IgA
Antitrombina III	IgD
C <sub>3</sub> (complemento activador)	IgE
C <sub>3</sub> (complemento)	IgG
C <sub>4</sub> (complemento)	IgM
Ceruloplasmina	Macroglobulinas
Fetoproteínas	Plasminógeno
Fibrinógeno	Protombina
Haptoglobinas	Transferina

En algunas determinaciones como el caso de la IgE y las IgD sus niveles son muy bajos, y no se expresan en miligramos, sino en unidades.

#### Limitaciones de los métodos por Inmunodifusión:

Los procedimientos por inmunodifusión han sido desplazadas por las técnicas del RIA, por la mayor rapidez y precisión con que se obtienen los resultados, ya que las lecturas se efectúan mediante instrumentos, evitando los errores subjetivos factibles en la inmunodifusión.

No obstante la inmunodifusión, sigue siendo los de preferencia, cada vez que el médico solicite Inmunoglobulinas totales y fraccionadas, ya que el grado de precisión del análisis no es tan crítico, pues el interés del médico está en saber si hay fracciones que se encuentren fuera de sus niveles normales. Desde el punto de vista clínico no es significativo conocer exactamente cuántos miligramos están fuera de sus rangos. (38)

### 3.1.3 Técnicas por Inmunolectroforesis

Es una tecnología refinada, desarrollada originalmente por Grabar y Williams en 1953. Permite diferenciar en el suero humano mas de 20 protefmas es pecíficas en forma simultánea.

En realidad, las técnicas de Inmunolectroforesis precedieron a las de Inmunodifusión radial, siendo estas últimas mas fáciles de realizar y en el comercio hay una amplia variedad de placas Petri preparadas y listas para ser usadas, lo cual representa una clara ventaja de la Inmunodifusión sobre la Inmunolectroforesis, por lo que tiene un lugar mas justificado en estudios de Genética que en el Laboratorio Clínico.

#### Fundamento de la Inmunolectroforesis

Se toma un portaobjeto estándar de 1X3 pulgadas y se cubre con una gel de agar. Se lleva al refrigerador y se mantiene para provocar el endurecimiento de la capa. de 3mm del gel de agar.

En el tercio superior y hacia el centro del portaobjetos se horada un pequeño pozo de unos 2 mm de diámetro, para la aplicación de la muestra del suero. El pozo va marcado con A, en el tercio inferior y a unos 5 mm del mismo borde inferior, se horada a todo lo largo de la capa del gel de agar, un canal de 1 mm de ancho, para aplicar el antisuero animal (monovalente, polivalente) o antisuero humano específico, el canal va marcado con B, en la

Fig. 2

Preparación del portaobjetos para efectuar una prueba de Inmunolectroforesis.

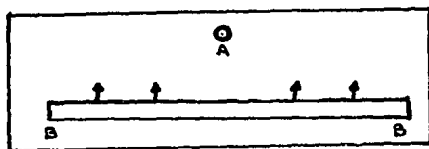


Fig. 2

La inmunolectroforesis se realiza en los siguientes pasos:

- 1) Aplicación de la muestra (antígeno)
- 2) Electroforesis sobre la capa del gel de agar.
- 3) Aplicación y difusión del antisuero en el gel de agar.
- 4) Análisis e identificación de las líneas o bandas de precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo.

Notas complementarias: El portaobjetos se coloca en una cámara electroforética y se dispone de tal forma que las tiras de papel de filtro hacen contacto con la superficie del gel de agar y con el medio amortiguador.

El corrimiento electroforético se hace en unos 30 min. Se separan las albúminas y las fracciones de las globulinas. Las bandas no son visibles, pero es factible usar algún colorante que funcione como indicador, antes de seguir adelante con el procedimiento.

Después de practicada la electroforesis, se coloca el antisuero en el canal preparado a tal efecto y se incuba el portaobjeto en una cámara húmeda a la

tempe-



temperatura ambiente.

Las líneas de precipitación comienzan a aparecer al cabo de unas 6 hrs. de incubación, a la temperatura ambiente.

La inmunoelectroforesis permite la identificación cualitativa simultánea de numerosas fracciones de las proteínas plasmáticas, pero no es aplicable a análisis cuantitativo de las mismas.

#### Limitaciones de los métodos por Inmunoelectroforesis

Consideramos, desde el punto de vista del laboratorio clínico, que estos métodos han encontrado un uso limitadísimo, ya que llevan tiempo, no permiten efectuar análisis cuantitativos, requieren de antiseros especiales, escasos en el mercado del país, además de hacer falta personal experimentado para identificar correctamente las líneas o bandas de precipitación. (1, 4, 5)

#### 3.1.4 Técnicas de Radioinmunoanálisis.

Es frecuente que Hospitales, si cubren servicios generales y si el volumen de pacientes que atienden lo justifica, cuenten con un departamento de Medicina Nuclear. Los estudios que en estos se realizan son del tipo in vivo, vale decir que al paciente se le administra un material radiactivo y su localización en el organismo es rastreada posteriormente, obteniendo datos de valor clínico, para determinar:

a) Captación de yodo por la tiroides.

b) Determinación y localización de tumores malignos.

c) Efectos de radiaciones de la bomba de cobalto sobre cánceres.

Por otra parte, en los laboratorios clínicos siempre han contado con una sección destinada a:

- a) Química especial
- b) Pruebas especiales.
- c) Hormonas.

Y en ellas se efectúan pruebas tales como:

- a) 17- cetoesteroides.
- b) Yodo protéico.
- c) Aldosterona.
- d) Catecolaminas.
- e) Estradiol.
- f) Vitamina B-12.

Entre 1970 y 1980, con el desarrollo de métodos por RIA para valorar hormonas, esteroides, vitaminas y muchos otros compuestos de importancia clínica; los métodos por RIA se popularizaron y simplificaron el trabajo al laboratorio, tendencia que está invirtiéndose a la luz de las metodologías inmunoenzimáticas. (8)

### 3.2 Técnicas básicas de las pruebas Inmunoenzimáticas.

Los principios básicos que fundamentan las técnicas de las pruebas inmunoenzimáticas son, los mismos que se aplican a las metodologías del RIA.

La diferencia fundamental, estriba en el tipo de reactivos usados y en la naturaleza de lo que se mide para obtener el resultado final de los análisis.

En otras palabras, en el RIA, se utiliza un pozo para contar emisiones radiactivas ( medimos radiactividad), en tanto que, en las pruebas inmunoenzimáticas trabajamos con una luz emisora y efectuamos mediciones de absorbancia, (medimos intensidad de color) interponiendo un filtro apropiado, entre la fuente de luz y el sistema reactivo.

En ambos tipos de metodologías, valoramos o detectamos la presencia de proteínas, por formación de nuevos compuestos, generados por uniones no covalentes, las que son del tipo de los compuestos antígeno-anticuerpo.

En ambas metodologías, se puede detectar antígenos y anticuerpos, siendo más fácil y frecuente el valorar niveles de anticuerpos que detectar antígenos, lo que representará un gran progreso, especialmente en el campo de la Parasitología. (32)

### 3.2.1 Fundamentos básicos de las pruebas por RIA.

La metodología general del RIA es, en teoría relativamente simple, el primer paso consiste en preparar antisuero específico contra la proteína a valorar, utilizando para ello especies heterólogas, como conejos, cobayos o cabras,

Si la proteína a valorar no es, inmunogénica por sí misma, o sea que es un hapteno, primero se le liga químicamente a una macromolécula transportadora, por ejemplo, la gamaglobulina de origen bovino, así como complejo, se le emplea para la producción de antisuero específico.

También deberá disponerse de la proteína a estudiarse en el paciente pero como reactivo y patrón de referencia, purificada y marcada generalmente con yodo-125.

#### Antisuero para uso en el RIA

En general, las proteínas de peso molecular relativamente alto y los polipéptidos hormonales tales como:

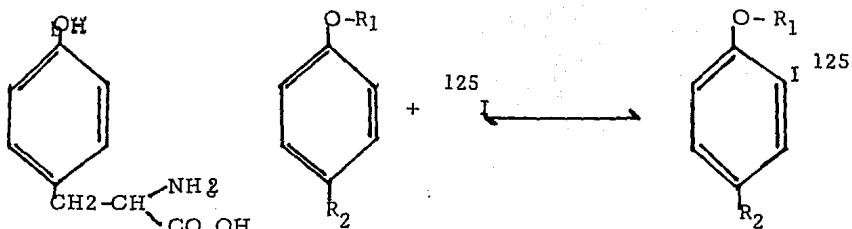
- a) Hormona paratiroidea.
- b) Hormona de crecimiento.
- c) Insulina.

actúan también como inmógenos y así es posible preparar antisueros adecuados para estas hormonas.

#### Marcación radiactiva de antígenos protéicos.

Un método generalmente utilizado es yodar con 125-I o con 131-I, procesos a consecuencia del cual el yodo radiactivo se liga, por covalencia, con un radical

de tirosina presente en el antígeno, esto ocurre así:



TIROSINA  
p-hidroxifenilalanina.

Radical de Tirosina en el antígeno y su  
marcaje con el 125-I.

El antígeno o proteína marcada, reaccionará con su anticuerpo presente en el antisuero específico y se unirá a él para formar el complejo antígeno-anticuerpo.

Ello constituirá el sistema reactivo en el método de RIA.

Al agregar la muestra de suero del paciente a dicho sistema reactivo e incubar, el antígeno o proteína a valorar, no marcada, presente en la muestra, compite y desplaza al antígeno marcado de su unión con el anticuerpo y ocupa su lugar, con lo que disminuye la cantidad de antígeno marcado que permanece en unión con su anticuerpo específico lo que da bases para un sistema de valoración, ilustrado en la figura 3.

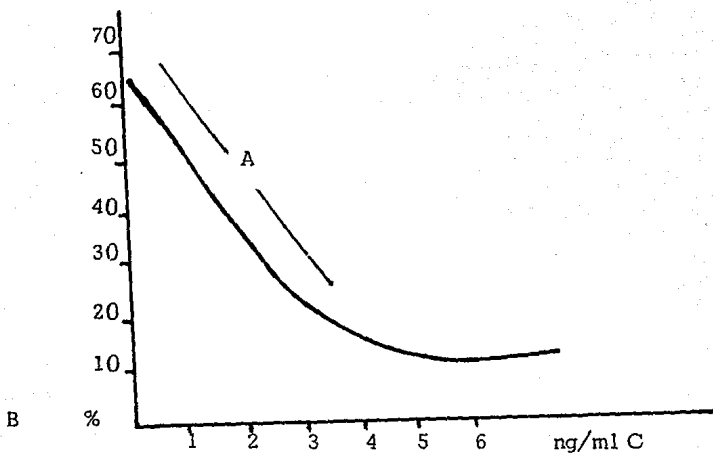


Fig. No. 3

A.- Región lineal de la curva tipo de referencia.

B.- Porcentaje de proteína marcada que permanece fijado a su anticuerpo específico.

C.- Concentración de la proteína a valorar, en el suero sanguíneo.

El suero o muestra agregado al sistema reactivo, contiene proteína no marcada, cuyo nivel se desea determinar, la cual desplaza a la proteína marcada de su combinación con el anticuerpo y la disminución de ella, determinable por medidas de emisión radiactiva, de la pauta de la concentración de proteína no marcada presente en la muestra presente en la muestra del suero en estudio.

Este tipo de metodología de RIA es llamado técnica del tipo por competencia, representa una de las dos técnicas básicas del RIA

En la metodología del tipo por competencia, uno de sus pasos finales implica la necesidad de separar, del sistema reactivo, aquella fracción del complejo

antígeno marcado-anticuerpo, de la fracción que tiene antígeno marcado libre (desplazado por el antígeno no marcado de la muestra), a fin de hacer medición de radiactividad y de ella deducir niveles de antígeno en la muestra. (11)

#### Técnicas del RIA.

Básicamente existen dos tipos de metodologías que son:

- a) Técnicas del tipo por competencia
- b) Técnicas del tipo sandwich.

#### Técnicas del tipo por competencia (o desplazamiento)

Puede definirse diciendo que, una proteína marcada se une a su anticuerpo presente en el antisuero específico, al agregar la muestra, la proteína no marcada, desplaza parte de la proteína marcada unida a su anticuerpo y su disminución, determinada por contaje de emisión radiactiva remanente, permite deducir niveles de la proteína no marcada presente originalmente en la muestra del suero analizada. Estas técnicas pueden realizarse tanto en fase líquida como sólida.

Las técnicas del tipo por competencia se consideran inmunoreacciones directas, en las que básicamente interviene un anticuerpo (el que puede o no estar marcado), un antígeno (el que también puede estar o no marcado), para formar un complejo antígeno-anticuerpo (marcado).

Esquema de la reacción.

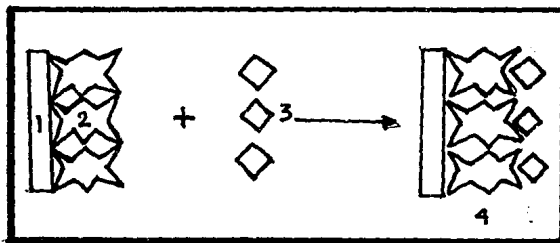


Fig. No 4

- 1.- Fase sólida
- 2.- Anticuerpo
- 3.- Antígeno marcado.
- 4.- Complejo antígeno-anticuerpo (marcado)

Las variantes serían el usar anticuerpos o antígenos marcados, por una parte y por otra, hacer el proceso en fase sólida, es decir, con uno de los elementos fijado a un material sólido, o bien efectuarlo en una fase líquida.

Técnicas de tipo sandwich (o doble anticuerpo).

Aquí el sistema reactivo se integra con:

- a) Antígeno o proteína de la muestra del paciente.
- b) Anticuerpo presente en el suero específico..
- c) Anticuerpo específico marcado con  $^{125}\text{I}$

en este tipo de tecnología se trabaja con un anticuerpo no marcado, adsorbido sobre una fase sólida, por ejemplo las paredes de un tubo de plástico. Ese anticuerpo reacciona con un antígeno específico no marcado, el cual está presente en la muestra a analizar, con la condición de que éste posea más de una agrupación química inmunológicamente reactiva, permitiendo captar un segundo anticuerpo que se le agregue y que haya sido marcado previamente con un elemento reactivo.

En cada paso hay un proceso de incubación, la cantidad de reactividad captada y retenida a consecuencia de la segunda incubación, es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra en estudio.

Las técnicas del tipo sandwich o de doble anticuerpo se considerarán como **inmunoreacciones indirectas (45) (49)**

### Esquema de la reacción.

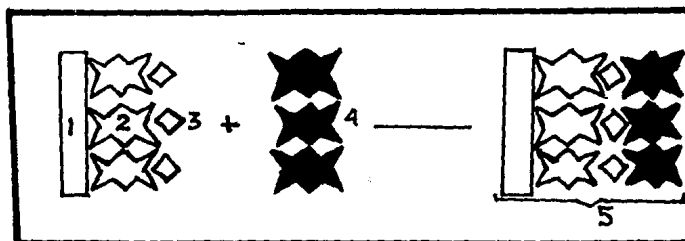


Fig. No. 5

#### 3.2.2 VARIANTES SEGUN EL TIPO DE MARCAJE INDICADOR

Estas técnicas básicas son comunes a tres importantes tipos de metodologías sofisticadas que se usan en el laboratorio clínico para la realización de pruebas especiales. Toda la diferencia radica en el tipo de elemento que se utilice como marcaje indicador, así tendríamos:

##### Procedimientos de inmunofluorescencia

Se basan en el uso de anticuerpos marcados con sustancias fluorescentes que van unidas a ellos, como conjugados. Un ejemplo de dicha sustancia lo tendríamos en el isotiocianato de fluoresceína y lisamina rodamina, estas dos sustancias al ser excitadas con longitudes de onda del rango UV emiten luz de mayor longitud, la que se demuestra por fluorescencia amarillo-verdosa, para el isotiocianato de fluoresceína, o anaranjado-rojiza para la rodamina.

##### Procedimientos de Radioinmunoanálisis.

Se basan, en técnicas del tipo por competencia.

Gozan de especial popularidad, las técnicas por RIA para valorar diversas hormonas, tales como: Testosterona, Cortisol, T-3, T-4, Prolactina, Hormona



Estimulante Folicular, Hormona Luteinizante, Fracción beta de la Hormona Gonadotrofina Coriónica. (49, 50)

Métodos de combinación: es una variante en las metodologías del RIA, consiste en una técnica del tipo por competencia, para la captación de antígeno o compuesto a valorar y en el uso de un sistema separativo basado en una técnica del doble anticuerpo o del tipo sandwich.

Veámos para el caso, como se procede para valorar testosterona por un método de combinación.

Primer paso: la testosterona previamente extraída del suero en estudio, compete con la testosterona reactivo marcada con el 125-I para unirse con el anticuerpo específico para la testosterona contenido en un antisuero reactivo producido en conejos. Este paso consiste entonces, en una técnica del tipo por competencia.

El segundo paso, se procede a separar las fracciones de la testosterona marcada, presentes en ese momento, en el sistema reactivo, ellas son:

testosterona marcada libre (primera fracción)

Testosterona marcada unida a su anticuerpo (segunda fracción)

Para la separación, se hace uso de un segundo anticuerpo reactivo, el cual está contenido en un antisuero reactivo producido en cabras y la cual se comporta como antigamaglobulina de conejo.

El agregado de este antisuero precipita a la segunda fracción que es aquella que contiene la testosterona marcada que ha permanecido unida a su anticuerpo

Este paso consiste en usar técnica del tipo sandwich d del doble anticuerpo.

El tercer y último paso se cumple centrifugando, descartando el sobrenadante y efectuando una cuenta de radiación gama sobre el precipitado remanente. (56)

#### Procedimientos Inmunoenzimáticos

Son metodologías análogas a los procedimientos del RIA, en las que se usan reactivos marcados con enzimas como indicadores.

Estos reactivos pueden ser anticuerpos o antígenos, que han sido conjugados con una enzima, de tal manera que las actividades inmunológicas y enzimáticas, se mantienen aún intactas en los compuestos conjugados resultantes.

El grado de utilidad práctica de los procedimientos inmunoenzimáticos es, indiscutiblemente amplio.

No solamente tienen los mismos alcances que los métodos por RIA, sino que estima que también puede servir de complemento o bien hasta llegar a reemplazar otros tipos de técnicas serológicas, tales como:

Fijación de complemento.

Hemaglutinación

Inmunofluorescencia.

### 3.2.3 Sensibilidad de las pruebas inmunoenzimáticas.

A partir de 1967, año en que se empezaron a desarrollar las técnicas inmunoenzimáticas, su sensibilidad se ha ido incrementando, a medida de que los procedimientos involucrados fueron mejorados, hasta alcanzar el alto grado de sofisticación actual.

Por ello puede decirse que las pruebas inmunoenzimáticas tienen una sensibilidad al menos igual y a veces aún mayor, que las características del RIA. (33)

### GENERACIONES DE LAS PRUEBAS INMUNOQUÍMICAS

Es así que actualmente, mirando en forma respectiva lo ocurrido en los últimos años, podemos hablar de diferentes categorías o generaciones de pruebas inmunoquímicas en general, como serían:

Pruebas inmunoquímicas de primera generación 1969

Pruebas inmunoquímicas de segunda generación 1971

Pruebas inmunoquímicas de tercera generación. 1977

Pruebas inmunoquímicas de cuarta generación 1982

Pruebas inmunoquímicas de primera generación:

Puede decirse que ello nos ubica en el año de 1969, cuando se pudo comenzar a disponer de los primeros métodos para detectar la presencia del antígeno B de superficie en casos de hepatitis viral. Por ese entonces se le llamaba Antígeno de Australia, hoy, conociendo la complejidad estructural del agente viral causante

de la hepatitis se le designa, más correctamente, antígeno asociado con la hepatitis B de localización en la envoltura o superficie del virus causal.

### **Pruebas inmunoquímicas de segunda generación**

Estas pruebas junto con las de primera generación tenían valor como pruebas de detección ya que ambas carecían de la sensibilidad necesaria como para ser usadas como pruebas cuantitativas confiables.

Dentro de esta categoría encontramos las pruebas de hemaglutinación para la detección de casos de hepatitis y rubeola.

Como métodos de sensibilidad de segunda generación han permanecido en uso limitado, los de:

Inmunolectroforesis.

hemaglutinación pasiva con latex.

Inmunodifusión radial.

### **Pruebas inmunoquímicas de tercera generación**

Estas son más actualizadas, y sobre las anteriores presentan:

Una mayor sensibilidad, especificidad y diversidad.

Representan un conjunto de pruebas endócrinas, metabólicas, de monitoreo terapéutico, de valor en enfermedades infecciosas y algunas relacionadas con cáncer.

Las primeras de esta generación fueron del tipo RIA que se comenzaron a emplear en 1972, en base al uso de anticuerpos marcados con I-125 y se vinculan con los antígenos involucrados o

asociados con casos de hepatitis:

uebas inmunoquímicas de cuarta generación

Similares a las de tercera generación pero mostrando mejores grados de sensibilidad y de especificidad. Las aplicaciones diagnósticas más sobresalientes de las pruebas inmunoquímicas pueden condensarse en el siguiente listado:

Antígenos virales asociados a la hepatitis B

Rotavirus.

Ferritina.

Enfermedades transmitidas sexualmente.

Fracción beta de la gonadotropina coriónica.

Monitoreo de tumores cancerígenos (Histoset)

Antígeno canceroembrionario.

Anticuerpo anti-rubeola.

Anticuerpos anti-toxoplasma. (30, 32)

### 3.2.4 SISTEMAS INMUNOENZIMATICOS DERIVADOS DE LAS TECNICAS BASICAS.

Al seleccionar métodos de laboratorio de aplicación diagnóstica hay diversos factores que deben ser considerados, entre ellos, cuando menos, encontramos los siguientes:

Sensibilidad inherente al método.

grado de especificidad para con el medicamento a determinar.

Tiempo requerido para la realización del análisis.

La Histoquímica, suministró los fundamentos que sirvieron de base para el rápido desarrollo de estas nuevas metodologías inmunológicas que en conjunto constituyen lo que hoy llamamos la Inmunoenzimática, lo que en forma directa o indirecta, nos permite identificar antígenos y valorar niveles de anticuerpos.

Las bases de la Inmunoenzimología es similar a la de la Inmunofluorescencia, de la cual se distingue porque emplea anticuerpos a gammaglobulina, marcadas con una enzima capaz de producir una reacción de color.

La enzima más frecuentemente usada, para el marcaje, es la peroxidasa y la reacción de color se desarrolla con bencidina y agua oxigenada. para establecer los resultados finales de la prueba se usa microscopía óptica común, o bien espectrofotómetro operando con zona visible. Se valoran resultados de actividades enzimáticas, ya sea por métodos citoquímicos o bien por cambios de absorbancia a longitudes de onda preestablecidas. (30)

### 3.3 SISTEMAS HETEROGENEOS Y HOMOGENEOS.

Las metodologías inmunoenzimáticas que involucran el empleo de procedimientos separativos del tipo de los que usan el RIA, son llamados sistemas heterogéneos, cuyo prototipo son las técnicas ELISA

Las metodologías inmunoenzimáticas que no requieren del uso de procedimientos separativos del tipo del RIA, son llamados sistemas heterogéneos, cuyo prototipo son las técnicas EMIT

Sistema ELISA, son procedimientos que habitualmente requieren de un tiempo mínimo de 35 a 45 minutos para completarse.

Sistema EMIT, son procedimientos rápidos, una vez trazada la curva de calibración para el lote de reactivos a usar, en la mayoría de los casos los análisis pueden hacerse a razón de una muestra por minuto.

Su aplicación en pruebas de laboratorio clínico:

En la actualidad la Inmunoenzimología, a través del uso de metodologías de los sistemas ELISA Y EMIT, encuentra una muy amplia aplicación diagnóstica en pruebas de laboratorio clínico.

Hay pruebas que pueden hacerse indistintamente por alguno de los sistemas antes dichos, otras solo son practicables con uno de ellos, por lo que a veces, el uso de uno u otro sistema dependerá de la preferencia del laboratorio.

Hablando en forma generalizada podríamos decir que los métodos inmunoenzimático se aplican a la detección o valoración de elementos tales como:

Anticuerpos específicos frente a: rubeola, toxoplasma, virus A de

de la hepatitis, virus B de la hepatitis, tuberculosis, treponema, cisticercosis, etc.

Antígenos: cancroembrionarios, grupo de virus tipo B asociados con la hepatitis, rotavirus, del gonococo, del SIDA, del herpes II, citomegalovirus, etc.

Hormonas: prolactina, Insulina, HEF, HL, Progesterona, Testosterona, Gastrina, HET, T-4, T-4 Neonatal, Fracción beta de la gonadotropina coriónica, etc.

Medicamentos: fenobarbital, fenitoina, digoxina, gentamicina, ácido valpróico, morfina, amikacina, anfetaminas, carbamacepina, teofilina, etosuximida, etc.

Metabolitos: C-3 del complemento.

C-4 del complemento.

Péptido C

Cortisol

Estriol.

Estradiol.

Pre-albúmina, etc. (44,45)



## IV SISTEMA E L I S A.

### 4.1 INTRODUCCION.

En años recientes, diversos laboratorios de investigación se han dedicado al desarrollo de nuevas y mejores técnicas serológicas. Así se llegó a idear técnicas heterogéneas aplicables a pruebas inmunoenzimáticas.

Estas técnicas heterogéneas, en un conjunto son conocidas bajo la denominación genérica de sistema ELISA; dichas técnicas son de una definida utilidad práctica, fáciles de ser realizadas y exhiben un grado notable de buena sensibilidad. (34,36)

### 4.2 ANTECEDENTES HISTORICOS

Se reconoce a Engvall como a uno de los iniciadores de nuevas tecnologías, basadas en lo que hoy conocemos como el sistema ELISA. Este investigador, en 1971, fue uno de los primeros en utilizar y en desarrollar variantes de métodos análogos a los del RIA, pero basandose en el empleo de antígenos marcados con una enzima y en el de anticuerpos específicos adheridos sobre una fase portadora sólida.

El mismo Engvall, un año mas tarde, ya había conseguido llegar a trabajar ahora con anticuerpos marcados con enzimas. Así pudo desarrollar métodos inmunoenzimáticos análogos a los del RIA, del tipo de doble anticuerpo o tipo sandwich. (36)

### 4.3 FUNDAMENTOS DEL SISTEMA ELISA

En sus comienzos los métodos inmunoenzimáticos se usaron con éxito para detectar y localizar antígenos intracelulares empleando tanto el microscópio óptico como el electrónico. De ahí nació la idea de usar los mismos lineamientos básicos para detectar antígenos y anticuerpos solubles en los fluidos del organismo. Las nuevas técnicas inmunoenzimáticas fueron alternativas para el laboratorio. El sistema ELISA permite valorar cuantitativamente los anticuerpos específicos. La muestra de suero en estudio se incuba en un tubo de poliestireno o en una placa del mismo material de las tipo para microdiluciones. Tanto el tubo como la placa son elementos comerciales, ya que actúan sobre una fase portadora sólida, al llevar una capa de antígenos adheridos en el interior de sus paredes. Después se le agrega al sistema reactivo un segundo anticuerpo, una antiinmunoglobulina, este va marcado con una enzima. El primer anticuerpo es el que se busca en la muestra de suero del paciente.

Posteriormente se efectúa un paso de lavado con lo que quedará una porción de enzima adherida a las paredes del tubo o placa. Será sólo aquella que se ha unido al complejo primario anticuerpo-antígeno y es así como de manera indirecta podemos detectar o valorar niveles de anticuerpos específicos. En esencia, el fundamento de este tipo de sistema ELISA, radica en la insolubilización de antígenos solubles por adsorción pasiva sobre una fase portadora sólida, en este caso el poliestireno.(34)

#### 4.4 COMPONENTES QUE INTEGRAN EL SISTEMA ELISA

En todo sistema ELISA, debemos contar con cuatro elementos ellos son:

- 1.- Fase portadora sólida.
- 2.- Conjugados.
- 3.- Sustratos enzimáticos.
- 4.- Técnicas de lavado.

##### 1.- Fase portadora sólida en el sistema ELISA

La fase portadora sólida se comporta como una superficie inerte y pasiva. Puede estar representada por diferentes elementos como son:

- Placas de poliestireno o sensidiscos del mismo material
- Tubos de poliestireno de 50 x 11 mm
- Placas de poliestireno para microhemaglutinación.

Es importante el tipo y la calidad del poliestireno que se emplee en la elaboración de los elementos que han de construir la fase portadora. Las mejores superficies de poliestireno muestra un grado apreciable de porosidad, lo que facilita la fijación del antígeno o anticuerpo del cual habrá de ser portadora. Al final, ya con el material reactivo adsorbido, la superficie presentará un aspecto esmerilado, como el asbesto.

El uso de los tubos de poliestireno en análisis por sistema ELISA, ha ido decreciendo notablemente, por que su aspecto no permite ver lo que está pasando, no son adaptables para ser usados en un espectrofotómetro y las lecturas deben efectuarse

visualmente, acarreado los posibles errores a los que se induce una lectura subjetiva y por lo tanto variable de operador a operador.

El emplear placas de poliestireno, goza de gran popularidad en el momento actual. ya que son de precio relativamente económico, permite operar usando pequeñas cantidades de reactivos y se adaptan bien para realizar varias decenas de análisis en forma simultánea. Sus variantes radican en el diseño de sus pozos, que pueden ser de fondo en V o en U, según sea mas conveniente para el tipo de prueba a realizar y para garantizar y facilitar un lavado inobjetable de los pozos.

Las perlas o sensidiscos tienen ventajas, ya que permiten hacer lecturas en cualquier espectrofotómetro.

Preparación de la fase portadora: en la adsorción pasiva del antígeno o anticuerpo sobre la superficie de poliestireno influyen: el pH, el tiempo y la temperatura a la que se efectue la sensibilización de la fase portadora. Dicha sensibilización se hace con antígenos o anticuerpos, los cuales quedan adheridos o acoplados a la misma en forma de una capa insoluble que se forma mediante un proceso físico de adsorción pasiva.

Esa capa interna de antígeno o de anticuerpo así preparada, nos permite capturar a los anticuerpos o antígenos específicos, respectivamente, que pudieran hallarse en la muestra que está en estudio. Para la sensibilización de la fase sólida, el antígeno

o anticuerpo se usan solubilizados en una solución amortiguadora, la cual es generalmente alcalina de un pH de 9.6, aún cuando ocasionalmente se llegan a utilizar soluciones de pH neutro. El antígeno o anticuerpo están en concentraciones que varían entre 1 y 10 mg/l de solución amortiguadora.

Si lo que estamos sensibilizando son pozos de placas de microhemaglutinación, se colocan 0.3 ml de la solución de antígeno o anticuerpo en cada pozo y se deja reposar por 12 hrs. bajo refrigeración a 4°C. Así se logran capas reactivas uniformes. El proceso antes mencionado también puede ser realizado en una hora, operando a 37°C, pero la calidad de las capas reactivas disminuye apreciablemente.

Una vez sensibilizadas las placas, se deben lavar para lo cual se usa una solución salina amortiguadora con fosfatos para tener un pH de 7.2, se hacen 3 lavados con abundante solución, durante un período de 3 a 5 minutos cada vez. Las placas una vez lavadas, se dejan escurrir bien y una vez secas ya están listas para uso inmediato. Si ello no ocurre, se mantendrán bajo refrigeración hasta su uso.

Si se tratara de sensibilizar tubos de poliestireno, el proceso es semejante y se usa 1 ml de antígeno o anticuerpo solubilizados en el buffer de pH 9.6 por cada tubo. La concentración del antígeno o anticuerpos generalmente oscila alrededor de los 5 mcg/ml de solución.

Los mejores materiales que se adsorben, bien sobre el poliestireno han demostrado ser los anticuerpos específicos de

de agentes infecciosos. Ello ha provocado un gran avance en el tipo de recursos y métodos disponibles para detectarlos mediante pruebas de laboratorio.

También parecen comportarse satisfactoriamente los antígenos de parásitos de ciertos géneros, de las que pueden afectar al ser humano.

La siguiente tabla presenta una información condensada sobre los materiales que se adsorben sobre el poliestireno de placas de microhemaglutinación y sobre la procedencia de los mismos.

Material biológico	Procedencia
<b>VIRUS</b>	
Rubeola	Extracto de cultivo de tejidos infectados.
Herpe simplex	
Citomegalovirus.	
Gripe	
Sarampión- Hepatitis.	
<b>BACTERIAS</b>	
Treponema	Conejos infectados.
Brucella	Cultivos en agar.
Salmonella.	Extracto de lipopolisacáridos solubles.
<b>PROTOZOARIOS</b>	
Entamoeba Histolytica.	Organismos lisados y

Plasmódium.  
Trypanosomas.

fragmentados obtenidos  
por ultrasonido.  
Eritrocitos infectados  
Animales infectados.

#### HELMITOS

Trichinella spiralis.

Larvas extraídas de ra-  
tas infectadas.

#### VARIOS

Inmunoglobulinas.

Precipitadas con sulfa-  
to de sodio al 18%

Anticuerpos específicos.

Purificados por afini-  
dad cromatográfica.

DNA. Extracto de timo de ternera.

#### 2.- Conjugados

En un sistema ELISA se utilizan conjugados, dándose este nombre para el caso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima. Para la preparación de conjugados se han usado diversas enzimas entre las cuales cabe mencionar las siguientes:

Fosfatasa alcalina.

Glucosaoxidasa.

Lisozima (muramidasa)

Peroxidasa. (24,87)

De ellas se prefieren la fosfatasa alcalina y la peroxidasa, especialmente la última, para la elaboración de conjugados que pueden ser adquiridos como reactivos de laboratorio.

La fosfatasa alcalina fue recomendada por Engvall y Perlmann en 1971 y es obtenida de la mucosa intestinal de terneras, empleándose bajo forma de suspensión en sulfato de amonio, debiendo exhibir una actividad de al menos 1000 u/mg de proteínas presentes en la preparación.

Entre las ventajas que presentan se tienen las siguientes.

Se les puede preparar en suspensiones de actividad alta.

Su sustrato es de bajo costo y no es tóxico.

Da un producto final de reacción de color amarillo brillante.

Sus conjugados exhiben una buena sensibilidad.

La peroxidasa se comenzó a usar en productos comerciales (conjugados) a partir de 1975, es obtenida del rábano silvestre, se le prefiere sobre la fosfatasa alcalina en base a las siguientes causas:

Sus preparados exhiben muy buena estabilidad y actividad alta.

Se dispone de buenos métodos para su conjugación.

Reacciona con una variedad de sustratos cromogénicos.

Es de mas bajo costo que la fosfatasa alcalina.

En general, los conjugados son elementos relativamente estables, que deben mantenerse bajo refrigeración a 4°C y a los que se incorpora ázida sódica como agente conservador.



La mayor especificidad de los conjugados se obtiene trabajando con conjugados de anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas presentes en antisueros de conejo, carnero o cabra.

Para mayor especificidad debe preferirse al marcaje de anticuerpos purificados por afinidad cromatográfica. (84, 85)

### 3.- Sustrato enzimático.

Para conjugados con fosfatasa alcalina, uno de los sustratos mas comunmente usados es el fosfato de 4-nitrofenilo, el cual desarrolla un color amarillo al ocurrir la hidrólisis enzimática sobre él. El pico de absorbancia y por ende la zona para las lecturas al espectrofotómetro, ocurre a los 400 nm. Este sustrato se usa en concentraciones de 1 gr/l en medio amortiguador de dietanolamina. También se le puede obtener en tabletas de 5 mg a usar disueltas en 5 ml del mismo medio amortiguador.

Para conjugados con Peroxidasa hay varios tipos de sustratos que pueden usarse, entre ellos, los principales que cabría mencionar serían los siguientes:

3-3 Diaminobencidina.

Acido 5-aminosalicílico.

O-Fenilendiamina.

Cualquiera de ellos requiere de ser usado con agua oxigenada, la que se comporta como un verdadero cofactor de la peroxidasa.

A últimas fechas se prefiere el uso de la o=fenilendiamina, ya que tanto la 3-3 diaminobencidina como el ácido 5-

aminosalicílico son, al menos potencialmente, agentes de posible acción carcinógena. (24)

#### 4.-Técnicas de lavado.

En metodologías del sistema ELISA hay que efectuar de una a tres incubaciones, incluidas en los siguientes pasos:

- a) Sensibilización de la fase sólida.
- b) Conteo y reacción del suero a analizar con la misma fase.
- c) Intervención del conjugado en el sistema reactivo.

Si se trabaja con sistemas reactivos comerciales, la fase portadora ya viene sensibilizada y tiene una fina capa interior de antígenos o anticuerpos, por lo que no necesitan hacerse procesos de lavado.

Pero en los casos b y c, después de cada incubación, hay que efectuar un lavado adecuado del material de poliestireno usado (tubos, pozos de placas de reacción o perlas) a fin de eliminar respectivamente, todo material sérico o de conjugados que no hubiera llegado a intervenir en el sistema reactivivo y que queda sobrante.

Los lavados se efectúan manualmente con piceta o bien con equipo automático diseñado especialmente para tal objeto. Deben efectuarse siempre tres lavados si se trabaja en forma manual, de 3 a 5 minutos de duración cada uno. Si se utiliza el equipo automático, el tiempo de cada lavado es de sólo un minuto ya que el mismo opera a presión de 1 a 2 atmósferas y garantizan un lavado rápido y prácticamente perfecto.

Para el lavado, se utiliza generalmente solución salina fisiológica amortiguadora, para tener una solución de lavado de un pH de 7.2.

Hay quienes usan sólo agua desionizada. (24)

#### 4.5 TECNICAS ANALITICAS

De preferencia se ha de trabajar con muestras de suero sanguíneo, pero también son aceptables muestras de plasma, obtenidas en la forma que se detalla mas adelante. las muestras a utilizar serán:

- a) Suero sanguíneo obtenido de sangre venosa.
- b) Plasma obtenido en tubos capilares heparinizados.
- c) Suero sanguíneo eluido en papel filtro.

##### Suero sanguíneo obtenido de sangre venosa

Para una muestra adecuada, la sangre de punción venosa se deja coagular a la temperatura ambiente durante unas pocas horas y después se extrae cuidadosamente el suero a analizar por medio de una pipeta Pasteur.

En ningún momento, ni la sangre ni el suero debe ser refrigerado ya que ello puede originar pérdidas de cantidades significativas de anticuerpos de tipo IgM y en menor grado de los tipo IgG. (35)

##### Plasma obtenido en tubos capilares heparinizados

Se limpia la yema del dedo del paciente con un hisopo

humedecido con etanol se deja secar bien. para evitar la posibilidad de hemolizar la muestra a obtener. Con una lanceta desechable se punza la yema del dedo descartando la primera gota de sangre que fluya. Después se obtiene la muestra llenando uno o más tubos capilares heparinizados, estos tubos han de tener un diámetro interno mínimo de 1.1 mm y una longitud de 75 mm.

Si es posible, preferir el empleo de este tipo de capilares que además tenga adicionado timerosal como agente antibacteriano, se sella el extremo de los capilares con plastilina opor calor y después de unas pocas horas se llevan a la microcentrífuga para la separación del plasma. Después se cortan los capilares a nivel dela interfase plasma/paquete globular, se descarta la porción que contiene el paquete y la que lleva el plasma se sella en ambos extremos, manteniendose así hasta el momento de analizarse.

#### Suero sanguíneo eluído en papel filtro

La sangre se obtiene de punción capilar y en tubos de 1.1 x 75 mm pero no heparinizados. Estos tubos permiten obtener una muestra exactamente medida y de ellos la sangre se adsorbe sobre el papel filtro.

Debe evitarse que los filtros de papel impregnados con la sangre del paciente entren en contacto con ningún tipo de agente fijador. Se han de desecar con la mayor rapidez posible pero a temperatura que no lleguen a superar los 56°C

La muetra, en papel filtro, ya seca, puede ser transportada a distacia, manteniendo su seroreactividad sin alteraciones a la temperatura ambiente, durante dos semanas máximo.

Lo anterior es válido únicamente para anticuerpos del tipo de las IgG, por lo tanto esta forma de obtener muestra s no es recomendable cuando se investigue la presencia de anticuerpos del tipo IgM.

El material a analizar, son los eluados que contienen los anticuerpos y estos se obtienen de la siguiente manera:

Si se captó la muestra de sangre usando tubos heparinizados, del tipo de los usados en la rutina diaria para hacer macrohematocrito, entonces se ha partido de una muestra de 70 microlitros, con la que se impregnó la tira o disco del papel filtro. Dicho papel se coloca en un tubo de ensaye de tamaño adecuado, el que contiene 0.7 ml de solución amortiguadora de pH 7.2, dejandola toda la noche en refrigeración a 4°C.

Este procedimiento da un eluado de suero en diluciones aproximadas de 1:20 para sangres de un hematocrito de 50%. Para valores más bajos de hematocrito, el margen de error en que se incurre permanece dentro de los límites aceptables.

El sistema ELISA puede aplicarse, en la práctica, bajo forma de:

Macrotécnicas (en tubos)

Microtécnicas (en placas de reacción).

lo que constituye muchas veces una decisión de tipo personal o bien en determinados casos, condicionada al tipo de reactivos que se dispone o sea posible de obtener en un momento dado.

## Macrotécnicas del sistema "ELISA".

Ejemplo: Detección y valoración de la alfa 1-Fetoproteína Humana.

Paso 1: Se dispone de tubos de poliestireno de 11 mm de diámetro interno por 50 mm de largo, los cuales se han sensibilizado con una capa interna de anticuerpos anti-fetoproteína humana, desarrollado en ovejas. Estos tubos vienen en sistemas de reactivos comerciales, listos para ser utilizados. Empleando el número de tubos necesarios, se coloca en cada uno de ellos 200 microlitros de estándares, sueros desconocidos y controles.

Primera incubación: incubar los tubos por un tiempo, de dos horas, a temperatura ambiente. Lo que ocurre en este primer paso es que la fetoproteína presente en los sueros desconocidos (en los que la hubiera), en los sueros control, se habrá de unir a sus anticuerpos específicos adsorbidos sobre la fase sólida.

Paso 2: Primer lavado; se lavan los tubos dos veces con 2 ml de solución de lavado (solución salina fisiológica).

Con este primer lavado se busca eliminar todo material que no haya quedado unido a la fase sólida.

Paso 3: Agregado del conjugado; se adiciona a cada uno de los tubos, 200 microlitros del conjugado enzimático, el cual está constituido por un anticuerpo antifetoproteína, desarrollado en conejos, conjugados con peroxidasa de rábano silvestre.

Segunda incubación: se incuban todos los tubos, el conjugado agregado con el complejo antígeno/anticuerpo adherido a las paredes internas de los tubos, resultante del paso 1. Nuevamente

la incubación se hace durante 2 horas, a temperatura ambiente.

Paso 4: Segundo lavado; se lavan todos los tubos tres veces con 2 ml de solución de lavado. Con este segundo lavado se busca eliminar todo material que no haya quedado unido al complejo antígeno/anticuerpo adherido a la fase sólida.

Paso 5: Agregar el desarrollador de color, se agrega a cada uno de los tubos 200 microlitros del reactivo desarrollador de color, integrado por la O-fenilendiamina y su catalizador (agua oxigenada) en un medio amortiguador apropiado.

Tercera incubación; todos los tubos se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente.

En cada uno de los tubos en que se haya presente la fetoproteína, se desarrollará un color amarillo de intensidad proporcional a la concentración existente de la misma.

Paso 6: nto final de la valoración; exactamente al transcurrir los 30 minutos de la tercera incubación, se detiene y se termina con la reacción en curso de desarrollador de color, mediante el agregado de 1 ml de ácido sulfúrico 0.5 N.

Trazado de la curva de preferencia; la concentración de la fetoproteína puede ser expresada de dos maneras:

Nanogramos/mililitro (ng/ml)

Unidades Internacionales por mililitro (UI/ml)

La equivalencia entre ambas formas de expresión se basa en un patrón definido por la OMS (Organización Mundial de la Salud), el cual nos define que: Una unidad internacional de fetoproteína equivale aun contenido de 1.5 nanogramos de la misma, expresada

en peso.

Para el trazado de la curva de referencia se usan las absorbancias registradas para cada uno de los 5 estándares utilizados para tal motivo, cuyas cifras y concentraciones respectivas podrían ser las siguientes:

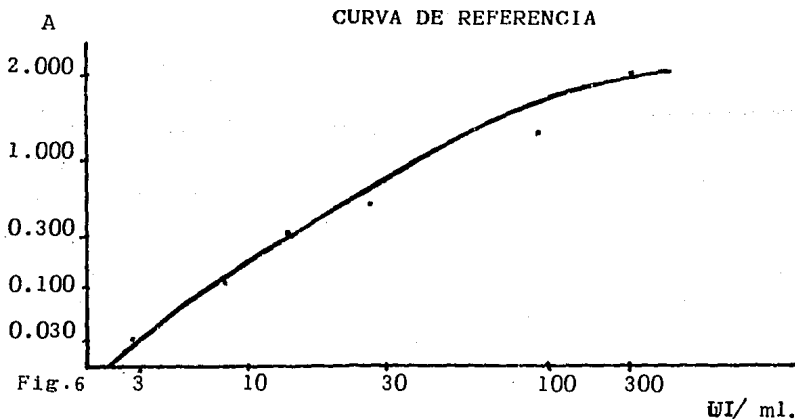
Estándares.	Concentraciones.	Absorbancia
Estándar a	3UI/ml	A 0.025
Estándar b	10UI/ml	A 0.110
Estándar c	30 UI/ml	A 0.305
Estándar d	100 UI/ml	A 0.885
Estándar e	300 UI/ml	A 1.440

Con estos datos, la curva resultante sería la siguiente, trazada en papel similogaritmico.

Abscisa: Concentración de fotoproteína.

Ordenada: Absorbancia.

Zona de lectura: 492 nm.





Obtención de resultados.

Para la lectura directa de absorbancia ver sus concentraciones (A vs UI/ml), usando la curva de referencia trazada para cada lote de reactivos.

Para garantizar la validez y confiabilidad de los resultados, incluir siempre en cada grupo de pruebas, un control normal y otro anormal, de preferencia usandos por duplicado.

En técnicas "ELISA" es del tipo del doble anticuerpo, el primero va adherido a la fase sólida, como una capa interior de antisuero específico de ovino.

Este anticuerpo, es el que se unirá a la fetoproteína que pudiera estar presente en las muestras del suero desconocido, en los estándares y en los sueros control.

En tanto que el segundo anticuerpo que formará el sandwich quedará integrado así primer anticuerpo/antígeno/segundo anticuerpo, es el conjugado, compuesto por el suero antifetoproteína específico de conejo, ligado a la peroxidasa, la que actúa así como la enzima de marcaje o enzima indicadora.

Un punto crítico en estas metodologías, tanto en las macrotécnicas como las microtécnicas, está en la necesidad de efectuar los lavados inobjectables. para asegurar que ello ocurra se han ideado equipos para hacer lavados automáticamente. Son muy recomendables para emplearlos en las macrotécnicas y por cierto se convierte en elemento indispensable para toda vez que se utilicen macrotécnicas de este sistema. (87)

## Microtécnicas por sistema "ELISA"

Ejemplo: Valoración de Ferritina.

En estas técnicas se emplean placas de reacción de polietileno brillante, con pozos de base ancha. El material que actúa como la fase portadora sólida de poliestireno está constituido por esferoperlas recubiertas con anticuerpos, en este caso por anticuerpos a ferritina (primer anticuerpo), generalmente estos anticuerpos se desarrollan en cobayos.

Se han de usar tantas cavidades o pozos de la placa de reacción como pruebas que han de efectuarse, contándose para ello, con sueros desconocidos, estándares y controles que se integran para formar la carga de trabajo a realizar.

Paso 1 En cada pozo de la placa de reacción, se agrega alícuotas de 25 microlitos de cada uno de los sueros desconocidos, de los estándares y de los sueros control y después pipetear el amortiguador diluyente.

Trabajar con sueros control por duplicado, para verificar la precisión con que se trabaja.

Paso 2: A cada cavidad de la placa de reacción que esté utilizada, agregar la esferoperla.

Paso 3: Agregar 300 microlitros del conjugado (segundo anticuerpo/enzima) a cada cavidad de la placa.

Paso 4 Primera incubación; efectuarla durante 1 hora a temperatura ambiente con movimiento de rotación.

Paso 5 lavar 3 veces, el uso del equipo automático permite realizar lavados rápidos, fáciles e inobjectables de cada una de las esferoperlas, pudiendo trabajar sobre 5 cavidades

simultáneamente

Paso 6: Todo lo que interesa en la prueba ha quedado adherido a la esferoperla, la cual, en este paso es transferida a los tubos de lectura.

A cada uno de los tubos se le agrega el sustrato de o-fenilendiamina y agua oxigenada. La cantidad que se agrega a cada tubo es de 300 microlitros.

Paso 7: Segunda incubación: está se realiza a la temperatura ambiente y durante un período de 30 minutos .

terminada la incubación se añade de inmediato a cada uno de los tubos, 1.0 ml de solución 1N de ácido sulfúrico, con la que se detiene la reacción y se termina la parte operativa de la prueba.

Paso 8: Lectura de absorbancia, el sustrato a base de la o-fenilendiamina forma un color amarillo anaranjado, el que puede ser medido a 492 nm y en base al valor de la absorbancia, obtener el resultado a reportar por la lectura directa de una curva de referencia, previamente trazada por el lote de reactivos empleado.

Para este paso final de lecturas de absorbancia, puede emplearse cualquier tipo de espectrofotómetro de uso diario, ya que se lee a 492 nm en zona visible. (88)

#### 4.6 VARIANTES DE TECNICAS

En las metodologías por el sistema "ELISA", ya sea que se usen macrotécnicas o se recurra a las microtécnicas, son ampliamente flexibles y nos brindan la oportunidad de practicarlas bajo un aplicable número de variantes en un enfoque básico.

Mencionaremos algunas de estas variantes.

- 1.- Técnicas sandwich de doble anticuerpo, para detectar o valorar anticuerpos, haptenos, antígenos.
- 2.- Técnicas sandwich de triple anticuerpo, para detectar la presencia de antígenos específicos.
- 3.- Técnicas por competencia, para detectar o valorar antígenos o anticuerpos.
- 4.- Técnicas por inhibición, para detectar antígenos específicos
- 5.- Técnicas para antígenos univalentes.
- 6.- Técnicas por inversión, para detectar o valorar anticuerpos del tipo de las IgM. (91)

#### 4.7 APLICACIONES CLINICAS.

Se han propuesto con éxito, aplicar el uso de las metodologías por el sistema "ELISA" a la realización de pruebas de laboratorio clínico, relacionadas con los siguientes campos de la Medicina y terapéutica.

- 1.- Infectología
- 2.- Parasitología.
- 3.- Endocrinología.
- 4.- Enfermedades de tipo autoinmune.
- 5.- Enfermedades neoplásicas.
- 6.- Monitoreo terapéutico.

A continuación se comenta brevemente la aplicación de las metodologías por el sistema "ELISA".

##### Métodos "ELISA" en enfermedades infecciosas.

Casi todas las metodologías de este sistema, se aplican al diagnóstico de enfermedades infecciosas, a través de la detección o valoración de anticuerpos específicos, principalmente para casos de fiebre tifoidea, meningitis tuberculosa, hepatitis de virus B, rubeola, herpes, citomegalovirus.

En la actualidad, el uso más frecuente de estas metodologías, en relación con las enfermedades infecciosas, lo encontramos en las pruebas que se integran en el llamado perfil "TORCH", ellas son pruebas que buscan detectar o titular anticuerpos contra:

Citomegalovirus.

rubeola.

Virus B asociado a la hepatitis.

Virus del herpes 2.

### Métodos "ELISA" en problemas de Parasitología

En la actualidad, el uso más frecuente de estas metodologías lo encontramos en la realización de pruebas vinculadas a casos de:

Amibiasis.

Toxoplasmosis.

otros tipos de parasitosis en los que puede aplicarse, es en la detección y evaluación de niveles de anticuerpos específicos de:

Malaria (Paludismo).

Schistosomiasis.

Oncocercosis.

Tripanosomiasis.

Quieste hidático.

triquinosis.

Sin embargo, aún subsiste para estas parasitosis la dificultad de lograr técnicas y reactivos que permitan reacciones específicas. Hay problemas de reactividad cruzada que ún impiden disponer de metodologías confiables por este sistema.

### Metodologías "ELISA" en casos de endocrinología

En este caso se han estado desarrollando técnicas para estudios de la función tiroidea principalmente. Unlistado mas o menos completo, se integraría con pruebas para valorar niveles de los

siguientes parámetros en suero:

Cortisol.

Insulina.

Tiroglobulina (TBG).

T-3 (Triyodotironina)

T-4 (Tetrayodotironina).

TSH (Hormona estimulante tiroidea).

Sin embargo, en este terreno las metodologías de preferencia aún siguen siendo, las del Radioinmunoanálisis

Métodos "ELISA" aplicables a enfermedades del tipo autoinmune

Aquí los parámetros que han hecho estudios para obtener métodos confiables son:

Anticuerpos antinucleares.

Anticuerpos antitiroideos.

Factor reumatoide.

En este campo dichas metodologías, se encuentran en pleno desarrollo y aún no son de uso generalizado.

Métodos "ELISA" en enfermedades Neoplásicas

Se relacionan con la evaluación de niveles del antígeno canceroembrionario (CEA), para el monitoreo de la evolución de cáncer tratados quirúrgicamente o con quimioterapia.

En este aspecto dichos métodos van desplazando a los del "RIA" y junto con ellos son los más específicos para la detección temprana de niveles anormales del (CEA).

Otra de las pruebas "ELISA" que entraria dentro de esta categoría, es la que determina la actividad de la fracción prostática de la fosfatasa ácida sérica, por su conocida relación con casos de carcinoma de próstata.

#### Métodos "ELISA" en monitoreo terapéutico

Pese a que se han desarrollado métodos elegidos selectivamente para cuantificar niveles séricos de medicamentos por sistema "ELISA", entre ellos, algunos realmente importantes por su frecuencia de uso y de su reconocida utilidad terapéutica, como lo son, para el caso de la Digoxina y de la Teofilina, en ningún caso ellos superan a los métodos de monitoreo terapéutico empleados en el sistema "EMIT" (96



#### 4.8 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL SISTEMA "ELISA".

VENTAJAS; en esencia podríamos enumerar nueve elementos ;

- 1.- Contando con un buen antígeno, exhiben una buena especificidad, lo que los hace de valor en clínica.
- 2.- Dan lecturas de punto final en zona visible del espectro o se adaptan para operar con técnicas cinéticas, midiendo cambios de absorbancia.
- 3.- Son técnicas fáciles de practicar y adaptables para su uso en rutina.
- 4.- Son metodologías susceptibles a ser automatizadas.
- 5.- Usan reactivos de larga vida útil.
- 7.- Al no emplear materiales radiactivos o potencialmente carcinogénicos, su práctica no implica riesgos para la salud del operador.
- 8.- Permite detectar la presencia de antígenos solubles circulantes en los fluidos del organismo.
- 8.- Por prueba son de costo relativamente bajo.
- 9.- Permiten la detección simultánea de varios tipos de anticuerpos en muestras de suero sanguíneo. (90)

## DESVENTAJAS.

1.- Son técnicas que no pueden considerarse rápidas, por lo tanto no son útiles como pruebas de emergencia.

Las pruebas de este sistema, pueden llevar varias horas en completarse y raramente pueden hacerse en menos de 45 minutos, en el mejor de los casos.

2.- En general, no funcionan bien cuando se trata de detectar o valorar compuestos de peso molecular inferior a los 10,000 Daltons, por lo que su uso no es recomendable para problemas de monitoreo terapéutico de medicamentos, ni para casos de intoxicaciones por los mismos.

Además usan metodologías de sistemas heterogéneos, los que siempre requieren de un paso separativo y no constituyen a la simplicidad del procedimiento analítico. (90)

## V. - SISTEMA "EMIT"

### 5.1 INTRODUCCION

Esta metodología comenzó a ser desarrollada a partir de hace poco más de una década, es un método rápido, aplicado a la detección y valoración - de compuestos de bajo peso molecular, en especial de medicamentos, en estudios de toxicología y de monitoreo terapéutico.

El monitoreo terapéutico consiste en determinar concentraciones de medicamentos selectivos, en muestras de plasma o suero.

Tiene aplicación únicamente cuando se trata de medicamentos que exhiben un alto grado de correlación entre sus niveles en plasma o en suero y - sus respectivas actividades farmacológicas.

En la actualidad, los procedimientos de laboratorio vinculados al monitoreo terapéutico constituyen elementos bien consolidados a una terapéutica racional y eficaz en el manejo de diversas enfermedades serias del ser - humano.

Cada ser humano es un sistema único y diferente. No hay dos personas - en las cuales una misma dosis de un medicamento determinado le produzca el mismo efecto. Ellas presentan entre sí diferencias en la forma y -- manera en que se absorben, distribuyen, metabolizan y excretan el fármaco de que se trate.

Incluso un mismo individuo puede variar en su propio patrón o manera de

responder ante un fármaco, según cambios que en él ocurran, afectando su estado físico, o por el uso simultáneo de otros medicamentos, etc.

A continuación se mencionan algunos términos que se usa al analizar los resultados de monitoreo terapéutico, los principales serían los siguientes.

a) Vida media de un medicamento.

Dicha expresión, nos describe las características específicas que el mismo presenta sobre el tiempo en que tarda en eliminarse del organismo humano. (38)

Su definición, la vida media de un medicamento es el tiempo requerido para que su concentración sérica pico, alcanzada después de administrar a un paciente una única dosis del mismo, registre una caída de nivel de 50 por ciento. Se le expresa en unidades de tiempo. (38)

Se ilustra un ejemplo en la siguiente figura. en la cual se tiene clara la referente información:

20 mcg/ml. concentración sérica tope o pico (A).

8 horas vida media del medicamento considerado (B).

10 mcg/ml caída de nivel al 50% del pico. (B)

El tiempo empieza a contarse desde el momento en que se administra la dosis única del medicamento, aún cuando su nivel pico se logre dos horas después, figura. ( ). Se procede así para poder determinar los intervalos a guardar entre dosis y dosis. (37)

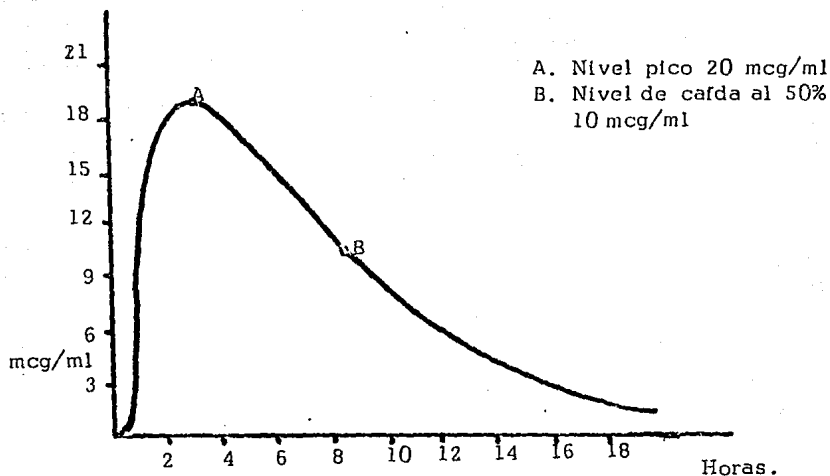


Fig. 7

b) Niveles pico para una dosis dada,

Para determinar el nivel pico o tope, después de administrar una dosis única de un medicamento, se valoran sus niveles en las muestras seriadas tomadas a intervalos regulares y frecuentes, los que habitualmente son variables entre 15 y 30 minutos. Lo que se determina son niveles del medicamento administrado.

El conocimiento de la vida media de cada medicamento resulta ser algo esencial para el médico, por ella determinará cuál es el régimen de dosificación óptima para el paciente, iniciará las fluctuaciones de niveles que ocurren entre diferentes dosis y permitirá decidir si es necesario o no administrar al enfermo una dosis inicial de carga de medicamento, para asegurar una rápida obtención de concentraciones séricas de utilidad terapéutica. (28)

c) Niveles dinámicos estables de un medicamento.

El estudio cuantitativo de los procesos metabólicos y de las relaciones entre una dosis de un medicamento y su concentración en los fluidos biológicos, ha permitido determinar que si un medicamento se da por intervalos, entre dosis y dosis, iguales a su vida media, al cabo de 4 a 6 veces en esta forma, se asegura, en suero, niveles dinámicos, entre límites estables. Lo antes dicho resulta ser de fundamental importancia para trazar esquemas de dosificación que garanticen niveles séricos constantes, dentro de los rangos terapéuticos efectivos, de un medicamento dado.

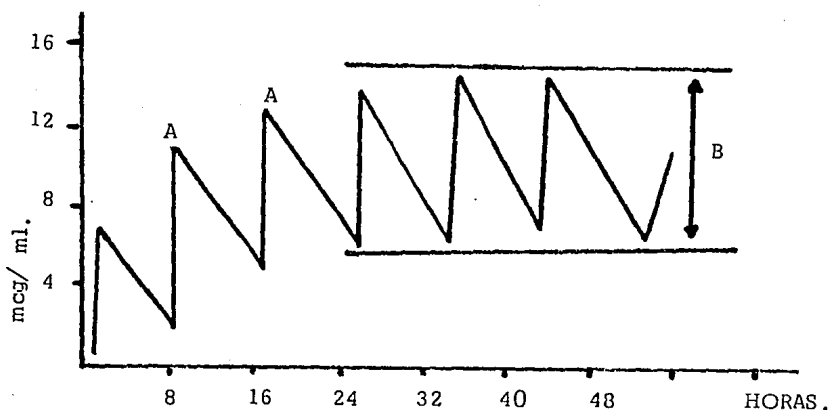


Fig. 8

La gráfica que antecede nos ilustra lo dicho. En ella, en la abscisa, se marca el tiempo en horas y en las ordenadas, las concentraciones séricas en microgramos por mililitro.

Los puntos A, marcan los niveles topes y la zona B nos indican el rango de los niveles dinámicos, sus variaciones y los límites estables logrados.

En el caso ilustrado, los niveles dinámicos estables se han alcanzado - después de la administración de cuatro dosis idénticas del medicamento, dadas a intervalos de tiempo iguales al de su vida media de 8 horas, la - cual fuera establecida previamente. (29), (87)

## 5.2 DESARROLLO DEL SISTEMA "EMIT"

El sistema "EMIT" abarca metodologías de inmunoanálisis enzimático de - tipo homogéneo y fue desarrollado por la compañía Syva en USA.

Lo dicho antes, es válido considerando, desde el punto de vista comercial ya que esta compañía tiene por lo menos 20 medicamentos de reconocido valor y utilidad en la misma terapéutica, disponibles en sistemas de reactivos, todos ellos se basan en el sistema "EMIT".

Una reciente revisión de estado de las técnicas inmunoenzimáticas por sistema homogéneos como lo es el sistema "EMIT" fue efectuada en 1978 por K.E. Rubenstein.

En su trabajo Rubenstein afirma que el sistema "EMIT" representa una significativa simplificación en la tecnología de determinar concentraciones séricas de diversos medicamentos.

Las metodologías "EMIT" suministran resultados comparables a los que -- brindan otros diversos tipos de técnicas pero sin requerir instrumentación costosa ni el manejar y tener que eliminar adecuadamente material y reactivos. Con este tipo de inmunoensayos, las determinaciones de concentraciones séricas de medicamentos, queda accesible prácticamente a cualquier

laboratorio clínico razonablemente equipado.

Son verdaderas microtécnicas que exhiben una sensibilidad y una especificidad adecuadas y aceptables para su uso en rutina en la clínica médica. Lo más atractivo del sistema "EMIT", radica en que son tecnologías bien probadas, confiables y procesan la muestra con mucha rapidez, usando procedimientos sencillos. Tal vez su ventaja más significativa sea la del tiempo que se requiere para hacer y completar una prueba individual, tiempo--- que en general es de aproximadamente sólo un minuto, toda vez que, ya se cuenta con la curva de calibración de referencia, que se establece inicialmente para cada lote de reactivos. (19)

### 5.3 FUNDAMENTOS DEL SISTEMA "EMIT"

En la realización de un análisis típico por sistema "EMIT" se puede usar muestras de 50 microlitros (0.05 ml) de :

- Orina.
- Plasma sanguíneo
- Suero sanguíneo

y en todos los casos la muestra utilizada se mezcla con un primer reactivo (reactivo A) que contiene anticuerpos específicos para el medicamento, sus derivados y sus metabolitos, y sustratos específicos para la enzima reactiva y seleccionada.

El anticuerpo específico reconoce a su correspondiente fármaco y se liga a él en un tipo de reacción antígeno (medicamento)/anticuerpo.

En un segundo paso del procedimiento se agrega un segundo reactivo (reac



tivo B) que contiene el conjugado del fármaco con la enzima.

Vale decir que el sistema reactivo, estará interviniendo un mismo fármaco pero bajo dos formas, una como elemento desconocido de la muestra en estudio en la que se le desea detectar o valorar en base a su unión con su antfcuerpo especifico y otro, agregado como un compuesto marcado con una enzima al que se identifica como "reactivo conjugado", cuya intervención nos permite obtener el resultado final de la prueba en proceso.

Concretamente lo que ocurre en el segundo paso del método es lo siguiente el fármaco marcado o conjugado se une a los antfcuerpos que quedarán libres, al no intervenir en el paso previo y con ello se reduce proporcionalmente la actividad enzimática presente en el sistema reactivo.

Sólo resta un tercer paso en el método, el cual es de medir la actividad enzimática residual que ha quedado presente, mediante una reacción cinética de cambio de absorbancia del NAD a NADH.

NAD: Dinucleótido de la nicotinamida y adenina, forma oxidada.

NADH: Dinucleótido de la nicotinamida y adenina, forma reducida.

Del cambio de absorbancia que se registre, se infiere la presencia y nivel o concentración del fármaco en la muestra en estudio. (19), (29)

#### 5.4 COMPONENTES QUE INTEGRAN EL SISTEMA "EMIT"

Los elementos que integran una metodología "EMIT", son los que a continuación se indican:

- Muestra en estudio.
- Anticuerpos contra un medicamento específico.
- Sustrato enzimático de diversos tipos.
- Conjugados
- Coenzima NAD.

Muestra en estudio:

Como se señaló anteriormente, este tipo de metodologías "EMIT" permiten analizar muestras de orina, plasma sanguíneo o suero sanguíneo. Para una prueba en general se usan muestras de tan sólo 50 microlitros, por lo que los procedimientos son, en todos los casos, verdaderas microtécnicas.

Anticuerpos contra un medicamento específico:

Se dispone de una variedad de reactivos a base de anticuerpos específicos contra el medicamento cuya presencia se desea detectar o bien cuantificar según sea el caso.

El avance en métodos "EMIT" ya permite aplicarlo no sólo a casos de monitoreo terapéutico, sino también a la detección de drogas de abuso y a la de ciertos y seleccionados metabolitos, estos últimos con técnicas cuantitativas.

Los reactivos de los sistemas "EMIT", emplean anticuerpos específicos -- para el medicamento a detectar o valorar en la muestra en estudio. (5)

Estos anticuerpos específicos se desarrollan o inducen en animales, generalmente en carneros inmunizados contra un antígeno artificial, parte del cual es el medicamento que se trate en particular, el cual ha sido ligado químicamente a una macromolécula portadora, para conferirle propiedades de antígeno al nuevo compuesto resultante. (29)

Sustratos enzimáticos de diversos tipos.

Integran reactivos comerciales que se obtienen en forma liofilizada y varían según la enzima que se haya seleccionado, como la más apropiada para la prueba "EMIT" a realizarse.

- Glucosa 6-fosfo-deshidrogenasa.
- Máltico-deshidrogenasa.
- Muramidasa (Lisozima)

Así que los sustratos serán sales, como fosfatos derivados del ácido málico, para las dos primeras enzimas.

El caso de la muramidasa presenta un caso especial ya que esta enzima requiere un sustrato bacteriano. Por definición, la muramidasa o lisozima como se le identificaba antiguamente, es una enzima que exhibe la propiedad de lisar las paredes celulares de algunas bacterias, entre ellas:

- Micrococcus lysodieticus.
- Micrococcus luteus
- Sarcina lutea.

- Bacillus magaterium

El substrato para la muramidasa se obtiene como un reactivo de bacterias no patógenas (generalmente la M. luteus.), muertas, desecadas y se prepara para una solución amortiguadora, en la que se suspenden las bacterias que han de actuar como substrato de la muramidasa. La acción de esta se centra en las paredes celulares de determinadas bacterias, degradando mucopolímeros que las integran y que contienen residuos alternantes de ácido N-acetilmurámico y de N-acetilglucosamina. (35)

Conjugados:

El conjugado se integra con el fármaco a detectar o valorar en la muestra que ha de analizarse, unido químicamente con la enzima que se haya seleccionado para emplear en la prueba.

Coenzima NAD:

Si en una reacción enzimática, se puede hacer actuar como cofactor a una coenzima tal como el NAD (Dinucleótido de nicotinamida y adenina), que cumple la función de captar hidrógenos o bien cederlos si se le usa bajo su forma reducida (NADH), es posible seguir paso a paso el desarrollo de dicha reacción en un instrumento que opere en zona UV, lo dicho anteriormente es posible gracias a cualquiera de esas formas de la coenzima que se caracteriza por absorber la luz UV en su estado reducido (NADH), pero no en su estado oxidado. (NAD) (29) (93)

Esto se ilustra claramente en la siguiente figura:

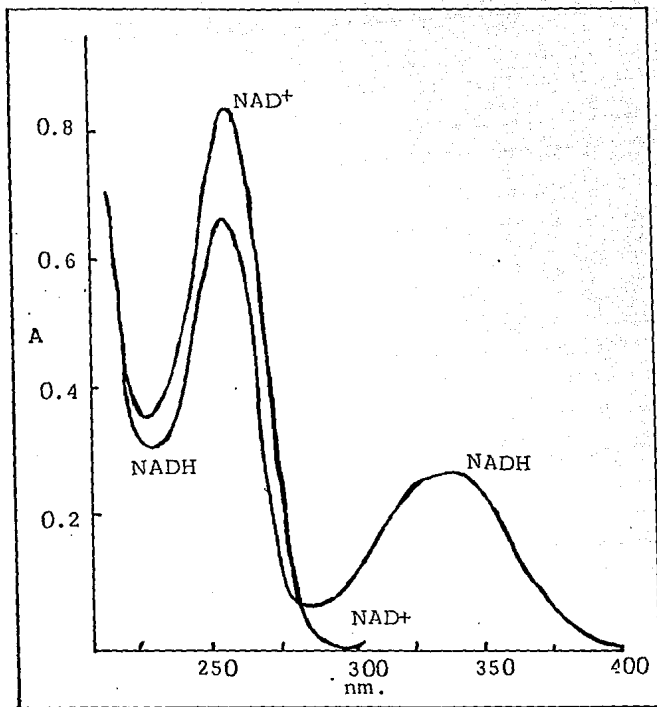


Fig. 9 Curvas de absorción a pH 7.5 del NAD<sup>+</sup> y NADH.

Las lecturas se hacen de preferencia a la longitud de onda de los 340 nm por ser una zona de máxima absorción para el NADH y mínima o prácticamente nula para la forma oxidada de NAD. (93)

## 5.5 TECNICAS ANALITICAS BASADAS EN EL SISTEMA "EMIT"

Las técnicas analíticas que se emplean en el sistema "EMIT" pueden ser, de cuando menos, tres tipos diferentes.

- De detección o cualitativas.
- Semicuantitativas.
- De valoración o cuantitativas.

En ellas se usan controles negativos y controles positivos, con el fin de operar con referencia a una curva de calibración individual para cada lote de reactivos. (34)

Ejemplos de técnicas analíticas por el sistema "EMIT".

### 5.5.1 Detección de drogas de abuso en muestras de orina.

Fundamento de la prueba:

Prueba inmunoquímica rápida, semicuantitativa para la detección de drogas de abuso o de sus metabolitos en orina, la cual permite detectar si un individuo ha ingerido o se ha administrado, en forma voluntaria o involuntaria, alguna o algunas de las siguientes drogas:

- Morfina
- Metadona
- Anfetaminas
- Secobarbital
- Benzoil-ecgonina (metabolito de la cocaína)
- Oxacepan

- Propoxifeno

La prueba tiene como finalidad la de ser una prueba de detección o es--  
crutíneo. Cada prueba permite obtener sus resultados en aproximadamente  
un minuto y se practica en forma simple, mezclando los reactivos "EMIT"  
con una pequeña cantidad de orina, la cual no requiere ningún tratamiento  
previo. (28)

Obtención y manejo de las muestras de orina.

Las muestras de orina, pueden ser colocadas, indistintamente en recipien-  
tes de vidrio o de material de plástico. No es recomendable agregarles --  
preservativo alguno. Su pH óptimo ha de ser entre 5.5 y 8.0 y la muestra  
puede ser mantenida a temperatura ambiente hasta por 4 días o bajo refri-  
geración hasta por 20 días, como precaución adicional, se recomienda cen-  
trifugar la orina, antes de analizarla y trabajar con el sobrenadante, una  
turbidez excesiva, puede llegar a afectar adversamente el análisis y tornar  
lo menos confiable los resultados. (28)

Reactivos que se utilizan en las pruebas;

Para la detección de drogas de abuso en muestras de orina humana, se re-  
quiere disponer de 3 diferentes tipos de reactivos:

- calibradores o controles de referencia
- substrato bacteriano
- reactivos "EMIT" específicos para cada droga.

Calibradores o controles de referncía. - comercialmente pueden adquirirse 3  
tipos de calibradores identificados como:

- calibrador negativo.
- calibrador de nivel bajo
- calibrador de nivel medio.

Estos calibradores son preparados de orinas humanas, suministrados bajo forma liofilizada y se reconstituyen con 3.0 ml de agua destilada. Son estables por dos semanas, si se mantienen refrigerados mientras no se esten utilizando. Los calibradores sirven como elementos de referencia para cualquiera de las drogas o metabolitos cuya presencia se desee investigar, con ellos se pueden hacer curvas de calibración. Sus valores típicos se incluyen en la sig. tabla N6. , expresados en microgramos por mililitro de orina.

Drogas y metabolitos	calibradores			Lim. de detección
	Neg.	bajo.	medio.	
Morfina	0.0	0.3	5.0	0.5
Metadona	0.0	0.3	5.0	0.5
Anfetaminas	0.0	1.0	5.0	2.0
Secobarbital	0.0	1.0	5.0	2.0
Benzolecgonina	0.0	1.0	5.0	1.6
Oxacepam	0.0	0.5	5.0	0.7
Propoxifeno	0.0	1.0	5.0	2.0

Tabla: Calibradores para drogas de abuso y sus niveles de referencia para muestras de orina. (34)



Substrato bacteriano.

Consiste en una suspensión de microorganismos no patógenos. Generalmente se recurre al uso de Micrococcus luteus que se obtiene como un producto desecado, conteniendo bacterias totalmente inactivas. Para la preparación de este elemento como reactivo, los microorganismos desecados se suspenden en una solución amortiguadora de pH 6.0 constituida por tro metamina (TRIS) (amino-hidroximetil-propanodiol) y una sal de ácido málico. Para cada prueba se usan 0.2 ml de la suspensión de microorganismos. (28)

Reactivos "EMIT" específicos, para cada droga buscada.

Como mencionamos anteriormente, las drogas o medicamentos cuya detección suelen requerirse con más frecuencia y cuyos nombres comerciales van entre paréntesis, son las siguientes:

Morfina.- principal y más activo de los alcaloides del opio, la prueba también detecta su glucurónico, metabolitos de la heroína o diacetil-morfina y la codeína o metil-morfina.

Metadona.- la cual es un narcótico analgésico cuya fórmula química responde al nombre de dimetilamino-difenil-heptona.

Anfetaminas.- la prueba detecta tanto a la anfetamina propiamente dicha (Benzedrine) (Dexedryne) como la metanfetamina (Desoxyn).

Secobarbital.- Es un barbitúrico de acción corta, de 3 a 6 horas, según la dosis, cuyo nombre químico es alil-metilbutil-malonilurea (Seconal).

La prueba también detecta la presencia de otros agentes barbitúricos de acción similar, entre ellos, amobarbital (Butisol) - y pentobarbital (nembutal).

Benzoil-ecgonina un metabolito de la cocaína (metilbenzoi-ecgonina), un narcótico y estimulante presente en las hojas de coca.

Oxacepam.- un metabolito de la benzodiazepina, lo cual permite la detección de compuestos como el clordiazepóxido (librium), el diazepam (Valium) y otros tranquilizantes de composición química similar.

Propoxifeno.- un compuesto analgésico de nombre químico, propionato de dimetilamino-difenil-metilbutanol (Darvon). (25)

Presentación de los reactivos "EMIT" específicos.

Para cada uno de los tipos de drogas indicadas, pueden obtenerse reactivos que suministran dos tipos de reactivos, siendo uno de ellos, anticuerpos contra metabolitos de la droga correspondiente (Reactivo A) y otro, constituyendo el conjugado (reactivo B) integrado por la unión de una enzima (en este caso lisozima o muramidasa) con la droga que se trate o uno de sus metabolitos principales. (28).

Procedimientos analíticos para la detección de drogas de abuso.

En forma genérica podríamos resumir la técnica en los pasos siguientes:

- 1.- Colocar 0.2 ml del sustrato enzimático en un recipiente adecuado
- 2.- Agregar 0.05 ml de la muestra de orina junto con 0.25 ml del -

amortiguador.

- 3.- Agregar 0.05 ml del reactivo A (anticuerpos) junto con 0.25 ml del amortiguador.
- 4.- Agregar 0.05 ml del reactivo B (conjugado) junto con 0.25 ml del amortiguador.
- 5.- Aspirar los contenidos en la celda de flujo, del espectrofotómetro previamente llevado a una absorbancia de 0.00 con agua destilada, esperar 10 segundos y efectuar dos lecturas de absorbancia, la primera a los 10 segundos y la segunda exactamente 50 minutos más tarde.
- 6.- Calcular los resultados usando la diferencia de absorbancias usando para ello la curva de calibración trazada previamente.

#### Comentario:

Como puede apreciarse, el volumen total final es de 1.1 ml y el tiempo para realizar el análisis no llega a ser mayor de dos minutos. (34)

#### Equipo necesario.

Espectrofotómetro.

Pipetor dilutor.

Impresor

Vasos de precipitación descartable de fondo cónico.

Pipetor para la suspensión de bacterias.

## - Cuantificación de Teofilina en muestras de plasma o suero

Fundamento de la prueba.

La metodología inmunoenzimática de tipo homogéneo o "EMIT" para la valoración cuantitativa de teofilina en muestras de suero o plasma, se basan en los conceptos de competencia entre proteínas, usando una enzima como marcador y un anticuerpo como la proteína específica de enlace.

En la actualidad, la teofilina es considerada como uno de los medicamentos de primera opción para la prevención o tratamiento de la sintomatología del asma en niños y en adultos.

El metabolito de la teofilina puede presentar notables variaciones de persona a persona pese a que se le administra en dosificaciones idénticas.

De ahí la importancia del monitoreo terapéutico, ello permite afinar en extremo las dosis que resultan ser de mayor beneficio en un determinado paciente.

Obtención y manejo de las muestras de sangre.

Para cada valoración de Teofilina se requiere una muestra de 50 microlitros de suero o plasma sanguíneo.

Para el caso de tener que trabajar sobre plasma, los anticoagulantes que pueden usarse son los de empleo acostumbrado, es decir, heparina, sales sódicas o potásicas de EDTA. u oxalatos.

Reactivos a utilizar.

Para la valoración de niveles de Teofilina en muestras de suero o plasma, debemos de contar con cuatro tipos de reactivos:

- Controles o calibradores de referencia.
- Anticuerpos contra Teofilina y sustrato enzimático. (reactivo A).
- Conjugado (enzima/teofilina) (reactivoB)
- Solución amortiguadora de pH 8.0

Calibradores o controles de referencia, comercialmente pueden adquirirse equipos que contienen todos los reactivos para valorar teofilina, en los que incluyen un juego de seis calibradores y un control o nivel conocido.

Calibrador negativo	0.0	microgramos/ml.
Calibrador 1	2.5	"
Calibrador 2	5.0	"
Calibrador 3	10.0	"
Calibrador 4	20.0	"
Calibrador 5	40.0	"
Control de valor conocido	15.0	"

Todos ellos vienen en forma liofilizada, en ampollitas y se reconstituyen con 1.0 ml de agua destilada, mantenidos bajo refrigeración ya reconstituidos, mantienen sus niveles de teofilina por lo menos durante 3 meses. Son preparados de suero humano adicionados de teofilina. Los calibradores 1 a 5 se usan para elaborar la curva de calibración está servirá como referencia para cada lote de reactivos. El calibrador negativo y el control de valor conocido, se corren por duplicado en cada serie de muestras a analizar.

Anticuerpos a Teofilina y sustrato enzimático (reactivo A).

Este reactivo contiene anticuerpos contra un derivado de la Teofilina, para poder inducir la formación de este tipo de anticuerpos, se acopla la Teofilina a una macromolécula que actúa como portadora y el antígeno así producido se emplea para inmunizar carneros induciendo en ellos la producción de anticuerpos específicos. (35)

Además se incorpora a este mismo reactivo un par de componentes esenciales: la glucosa 6 fosfato que ha de actuar como sustrato de la enzima a utilizar, que para el caso es la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y la coenzima NAD. (34)

Este reactivo A se suministra bajo forma liofilizada y se reconstituye con 6 ml de agua destilada. Bajo refrigeración se mantiene estable durante no menos de tres meses. Tiene un pH de 5.2 dado por un medio amortiguador apropiado. (28)

Conjugado (Enzima/Teofilina) (reactivo B).

Este reactivo se prepara acoplado químicamente a la teofilina con la enzima G6PD, se suministra también bajo forma liofilizada y se reconstituye así mismo con 6 ml de agua destilada. Bajo refrigeración se mantiene estable durante no menos de tres meses. Tiene un pH de 8.0 dado por un medio amortiguador apropiado. (34)

Solución amortiguadora de pH 8.0

Es un amortiguador TRIS como clorhidrato en solución al 0.055 M.

### Procedimiento an tico para la valoración de Teofilina.

Las técnicas podrían resumirse en los pasos siguientes, se recomienda - que tanto las muestras desconocidas, como el calibrador negativo y el -- control de valor conocido se corran en duplicado y se promedien los resul tados finales que para ellos se obtengan. (35)

- 1.- Primera dilución usando un pipetor dilutor colocar 50 microlf-- tros de la muestra (desconocido, calibrador negativo o control de valor conocido) junto con 250 microlfros de la solución - amortiguadora de pH 8.0 en un recipiente adecuado.
- 2.- Segunda dilución usando un pipetor dilutor colocar 0.05 ml de la primera dilución junto con 0.25 ml de la solución amortigua dora en un segundo recipiente.
- 3.- Agregar al segundo recipiente 0.05 ml del reactivo A y 0.25 ml de la solución amortiguadora.
- 4.- Agregar al mismo recipiente 0.05 ml del reactivo B y 0.25 ml - de la solución amortiguadora.
- 5.- Colocar los contenidos en la celda de flujo del espectrofot me tro previamente llevado a una absorbancia de 0.0 con agua des tilada y dejarla estar por 15 segundos.

Posteriormente hacer dos lecturas de absorbancia separadas 30 segundos - entre sí, el cambio registrado entre ambas se usa para obtener los resul tados de los análisis, los cuales son leidos directamente de la curva de calibración trazada con anterioridad. (34)

**Comentario:**

Como puede apreciarse, el volumen total del sistema reactivo es de 0.9 ml y el tiempo para realizar un análisis no llega a ser mayor de dos minutos.

### 5.6 APLICACIONES CLINICAS.

Las aplicaciones de las metodologías del sistema "EMIT" se pueden agrupar en tres tipos de categorías:

Análisis para Monitoreo Terapéutico de Medicamentos.

Análisis para detectar Drogas de Abuso.

Análisis para compuestos Endócrinos.

Análisis para Monitoreo Terapéutico de Medicamentos.

Las principales categorías de medicamentos serían:

- a) Anticonvulsivos: Fenitoína, Fenobarbital, Primidona, Etosuximida, Carbamacepina, Acido Valpróico.
- b) Cardiotónicos y antiarrítmicos: Digoxina, Lidocaína, Procainamida, N-acetilprocainamida, Quinidina, Disopiramida.
- c) Antibióticos: Gentamicina, Tobramicina, Amikacina, Netilmicina.
- d) Antiasmáticos: Teofilina.
- e) Antineoplásicos: Metotrexato.



## Detección de Drogas de Abuso.

Morfina, Metadona, Anfetaminas, Secobarbital, Benzoi-ecgonina (metabolito de la cocaína), Oxacepam (metabolito de la benzodiazepina), Propoxifeno.

## Compuestos Endócrinos.

Esteroides      Cortisol

De función Tiroidea    Tiroxina. (87)

## 5.7 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL SISTEMA "EMIT"

### Ventajas:

- 1.- El ser técnicas rápidas, adaptables para ser incluidas como una categoría por sí misma dentro de las pruebas de emergencia.
- 2.- El ser especialmente útiles para problemas de monitoreo terapéutico, - en los que las dosis de un medicamento tiene que ser ajustadas individualmente en cada paciente de acuerdo a su estado general y a su propio tipo de metabolismo en particular. (34)

### Desventajas:

- 1.- Fundamentalmente, el no ser adaptables para la valoración de hormonas y compuestos protéicos cuando su peso molecular supere los --- 10,000 Daltons. (35),(82)

## VI FUNDAMENTOS DE LA INMUNOFLUORESCENCIA

### 6.1 INTRODUCCION

Las técnicas básicas de la Inmunofluorescencia tienen sus orígenes en - los trabajos efectuados por el inmunólogo A.H. Coons a partir de 1941. Sin embargo, dichas técnicas entrarón en la rutina de procedimientos del laboratorio clínico muchos años más tarde, concretamente desde los alrededores de 1959. (23)

Los estudios iniciales de Coons más bien tendrían a encontrar aplicaciones en el Laboratorio de Patología y no en el área del Laboratorio Clínico ya que tendrían por finalidad desarrollar métodos para la localización de antigenos y detectar la presencia de anticuerpos en tejidos y no en fluidos - del organismo. (27)

Ya en la actualidad, los métodos basados en la Inmunofluorescencia se - emplean para detectar, y a veces hasta para cuantificar, niveles de anti--cuerpos específicos y también para comprobar la presencia de antígenos - determinados en muestras de fluidos orgánicos, mediante técnicas de tipo directo o indirecto. (28)

La esencia de estos métodos tiene una base de Inmunología ya que se - fundamenta en conjugar un anticuerpo específico con un fluorocromo, tal como la fluoresceína y en tornarlo fluorescente, detectando la fluorescencia consecuente mediante un sistema óptimo.

Se han desarrollado una amplia variedad de técnicas de Inmunofluorescencia de valor diagnóstico, bajo la forma de pruebas de Laboratorio Clínico, una de las primeras fue la detección de anticuerpos fluorescentes a *Treponema* en casos de pacientes con sífilis.

Una de las recientes metodologías basadas en la Inmunofluorescencia que - está usándose cada vez con mayor frecuencia es aquella que nos permite detectar la presencia de una forma extracelular de *Chlamydia trachomatis*, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales marcados con fluorescencia.

La *Chlamydia trachomatis* ha sido reconocida como un agente causal de uretritis y exhibe una marcada prevalencia entre hombres y mujeres jóvenes, que mantengan una vida sexual activa. (28)

## 6.2 TECNICAS BASADAS EN EL USO DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES.

Estas técnicas han venido a resolver problemas de trabajo de laboratorio, - relacionados con la identificación de microorganismos en materiales infectados. El marcaje de los anticuerpos se efectúa con sustancias fluorescentes, tales como:

- Isotiocianato de fluorescencia.
- Lisamina-rodamina

Estas sustancias, al ser excitadas con longitudes de onda del rango ultravioleta cercano, emiten luz de una mayor longitud de onda, misma que se manifiesta por la fluorescencia, la cual es:

- Amarillo verdosa para el isotiocianato de fluoresceína
- Anaranjado rojiza para la lisamina rodamina.

La inmunofluorescencia puede realizarse mediante técnicas directas o indirectas. (27)

#### Técnicas Directas.

En ellas lo que se marca es el anticuerpo que habrá de interaccionar directamente con el antígeno.

Metodología: consiste en colocar sobre un portaobjetos la muestra en estudio en la cual se busca detectar la presencia de un determinado antígeno. Se cubre la laminilla con el antisuero marcado con fluoresceína y después se efectúa un lavado de la misma para eliminar todo resto de material fluorescente que no haya sido específicamente fijado.

Finalmente, se hace la observación al microscopio, utilizando una fuente de luz ultravioleta y filtros adecuados para el caso.

Si el antígeno ha fijado el anticuerpo marcado, el complejo emitirá fluorescencia al ser excitado por la radiación ultravioleta. (28)

#### Técnicas Indirectas.

Aquí se emplea como reactivo marcado un suero antigammaglobulina humana, el cual se hace actuar sobre el complejo antígeno-anticuerpo no marcado, formando en un primer paso de la técnica, al reaccionar un reactivo (antígeno) con la muestra de suero del paciente la que contiene los anticuerpos - cuya presencia se desea detectar.

Metodologías: cuando se emplea este tipo de procedimientos, lo que se añade al portaobjetos que contiene la muestra, es un antisuero específico para el antígeno a investigar, pero en este caso se trata de un antisuero no marcado.

Después de que transcurra un cierto tiempo de contacto, el preparado se lava, se cubre con un segundo suero, ahora del tipo de una antiglobulina humana, se le deja reaccionar y se lava nuevamente.

Este segundo suero o antigammaglobulina humana sí está marcado con fluoresceína. El último paso es una observación microscópica, similar a la mencionada para la técnica directa.

El antígeno fija su anticuerpo específico no marcado, pero sobre este se ha de acoplar la antigammaglobulina humana marcada, que es la que finalmente ha de emitir fluorescencia al ser excitada por la luz ultravioleta.

#### Reactivos marcados.

Se obtiene un buen reactivo marcado cuando el anticuerpo específico ha fijado dos o tres grupos fluorescentes en cada una de sus moléculas.

Si el anticuerpo queda excesivamente marcado, pueden ocurrir tinciones fluorescentes inespecíficas en el material de estudio. Para minimizar este inconveniente, se elimina la mayor parte del material protéico reactivo muy marcado por procedimientos de filtración sobre resinas intercambiadoras, o bien recurriendo a técnicas de adsorción.

Finalmente cabe decir que la experiencia nos indica que si disponemos de

un antisuero reactivo marcado con un título de anticuerpos (3 a 5 mg/ml) la dilución previa a su uso, nos reduce a un mínimo de posibilidades de que ocurran tinciones fluorescentes inespecíficas. (28)

#### Influencia de la temperatura.

En la mayoría de los casos las técnicas de inmunofluorescencia se practican en un grado satisfactorio, trabajando a la temperatura ambiente. No obstante, en algunas de ellas se especifica la necesidad de incubar a 37°C. Se tendrá el cuidado de mantener las laminillas en ambiente húmedo para evitar de que ocurra una evaporación de los reactivos. (28)

#### 6.3 EQUIPO NECESARIO

El principio básico de la microscopía de fluorescencia radica en el uso de una fuente de luz, que le suministre longitudes de onda de más allá del espectro visible, en ondas de la zona ultravioleta del espectro.

Como ya se ha señalado antes los colorantes fluorescentes o fluorocromos, al ser expuestos ante la luz UV, se excitan y emiten luz visible; vale decir emiten fluorescencia muy particular.

De ahí que el equipo necesario sea relativamente simple; un microscopio provisto de una lámpara UV, la luz que este emite se pasa por un filtro selectivo para que la luz que se transmite sea de una longitud de onda óptima para lograr la mejor y mayor excitación del fluorocromo con el que se trabaje. (28)

Así mismo se usa un segundo filtro, este de protección, que se coloca

entre el objetivo del microscópio y el ojo del analista. Este filtro absorbe el remanente de luz que no haya quedado retenido en la imágen que se está visualizando.

Material vinculado con la muestra en estudio.

Ejemplo; Prueba para *Chlamydia trachomatis*.

En esta técnica se trabaja sobre una muestra directa, los resultados se obtienen en media hora y no requiere un cultivo. La muestra se logra con el uso de un hisopo especial, de la uretra o del canal endocervical uterino.

La muestra se aplica en laminillas excavadas en su centro, las que se obtienen en el comercio, son especiales para esta prueba. Toda la técnica de inmunofluorescencia se realiza sobre estos portaobjetos.

La *Chlamydia trachomatis* se considera responsable de un alto porcentaje de uretritis y cervicitis no gonocócicas. (24)

#### 6.4 REACTIVOS DE USO HABITUAL.

En su preparación se utilizan colorantes sintéticos o naturales, caracterizados por comportarse como fluorocromos sensibles, o sea, capaces de emitir una fluorescencia substancial y específica.

Entre los colorantes más usados caben mencionarse:

Auramina.

Naranja de acridina

Rodamina B

Tripaflavina

Isotiocianato del fluoresceína

Lisamina-rodamina.

Normalmente, los reactivos para pruebas de inmunofluorescencia se adquieren ya preparados y las más de las veces formando parte integral de "kits" o sistemas reactivos completos de marcas de reconocido prestigio.

## 6.5 APLICACIONES CLINICAS.

Entre las aplicaciones clínicas de mayor importancia en la actualidad encontramos pruebas para detectar antígenos y pruebas para detectar anticuerpos específicos. (31)

Para detectar antígenos de:

Candida Albicans.

Chlamydia trachomatis.

Treponema pallidum.

Virus (Rubeola, sarampión y otros)

Para detección de anticuerpos:

A la cisticercosis.

Al Treponema pallidum

Antinucleares.

Antitiroideos.

Autoanticuerpos (de enfermedades autoinmunes)

Monoclonales

Tipificación de inmunoglobulinas en linfocitos)



## VII. - CLASIFICACION DE LAS PRUEBAS INMUNOQUIMICAS

Como un ejemplo ilustrativo veamos el tipo de unidades que pueden ser manejados en reportes de pruebas inmunoquímicas en la actualidad.

Decigramo	dg	$10^{-1}$	g
Centigramos	cg	$10^{-2}$	g
Miligramos	mg	$10^{-3}$	g
Microgramos	$\mu$ g	$10^{-6}$	g
Nanogramos	ng	$10^{-9}$	g
Picogramos	pg	$10^{-12}$	g
Femtogramos	fg	$10^{-15}$	g
Attogramos	ag	$10^{-18}$	g

De ahí que el conglomerado de pruebas que constituyen hoy el campo de la Inmunoquímica Clínica requiera de ser clasificadas en una forma que a la vez sea integral y práctica de asimilar.

Para que este trabajo cumpla con su objetivo de suministrar una información condensada, actualizada y de uso práctico en el acontecer diario del trabajo - del Laboratorio Clínico, se han utilizado una base de clasificación de las Pruebas fundamentada no en el tipo de técnicas inmunoquímicas de que se trate, - pero sí, en el campo de aplicación clínica correspondiente a cada prueba.

De ahí que haya sido posible agrupar las " Pruebas Inmunoquímicas " en sie-

de grupos o categorías.

El orden de las mismas se ha fijado según la frecuencia de requisición por parte del médico y el mayor o menor grado de su importancia para el manejo del paciente.

1ra. Valoración de Hormonas	19 pruebas
2da. Perfiles de prevención y orientación diagnóstica	10 "
3ra. Valoración de medicamentos y drogas	29 "
4ta. Valoración de metabolitos	7 "
5ta. Marcadores tumorales	6 "
6ta. Factores inmunológicos.	50 "
7ma. Pruebas inmunoquímicas diversas	4 "

En este breve y último capítulo se detallarán las pruebas que integran cada categoría a fin de que su lectura permita una apreciación de la gran variedad de pruebas que integran este creciente segmento del Laboratorio Clínico.

### 7.1 VALORACION DE HORMONAS.

Integrán esta primera categoría, 19 pruebas inmunoquímicas.

- 1.- ACTH (Hormona adrenocortitrófica).
- 2.- HEF (Hormona estimulante del folículo)
- 3.- HET (Hormona estimulante tiroidea)
- 4.- HET (Neonatal)
- 5.- HL (Hormona luteinizante)

- 6.- Hormona de crecimiento.
- 7.- Hormona lácteo placentaria.
- 8.- Insulina
- 9.- Progesterona
- 10.- Prolactina
- 11.- Captación de  $T_3$  (Triyodotironina)
- 12.-  $T_3$  libre
- 13.-  $T_3$  reserva.
- 14.-  $T_3$  total
- 15.-  $T_4$  Tiroxina
- 16.-  $T_4$  libre
- 17.-  $T_4$  neonatal
- 18.- Testosterona
- 19.- Testosterona libre

## 7.2 PERFILES DE PREVENCIÓN Y DE ORIENTACIÓN DIAGNÓSTICA.

Integran esta segunda categoría, 10 perfiles diferentes.

- 1.- De esterilidad.
- 2.- De inmunoglobulinas
- 3.- Ginecológico.
- 4.- Ginecológico seriado.
- 5.- Hormonal completo
- 6.- Inmunológico de hepatitis.

- 7.- Metabólico de recién nacido.
- 8.- Testicular.
- 9.- Tiroideo.
- 10.- TORCH completo (Citomegalovirus, Rubeola, Virus B de la hepatitis y Virus del Herpes 2)

### 7.3 VALORACION DE MEDICAMENTOS Y DROGAS.

Integrán esta tercera categoría, 29 pruebas inmunoquímicas.

- |                     |                                |
|---------------------|--------------------------------|
| 1.- Acido valpróico | 16.- Fenobarbital              |
| 2.- Amikacina       | 17.- Gentamicina               |
| 3.- Anfetaminas     | 18.- Lidocafna                 |
| 4.- Barbitúricos    | 19.- Metacualona               |
| 5.- Benzodiazepinas | 20.- Metadona                  |
| 6.- Canabinoídes    | 21.- Metotrexato.              |
| 7.- Carbamacepina   | 22.- Morfina                   |
| 8.- Cocafna         | 23.- N-acetilprocaína<br>mida. |
| 9.- Diazepam        | 24.- Opiáceos.                 |
| 10.- Digitoxina     | 25.- Primidona                 |
| 11.- Digoxina       | 26.- Procafnamida.             |
| 12.- Disopramida    | 27.- Propoxifeno.              |
| 13.- Etosuximida    | 28.- Teofilina                 |
| 14.- Quinidina      | 29.- Tobramicina.              |
| 15.- Fenitofna      |                                |

#### 7.4 VALORACION DE METABOLITOS.

Integrán esta cuarta categoría, 7 pruebas inmunoquímicas.

- 1.- Aldosterona
- 2.- Cortisol
- 3.- Estradiol
- 4.- Estríol
- 5.- Prealbúmina
- 6.- Preinsulina
- 7.- Péptido-C

#### 7.5 MARCADORES TUMORALES.

Integran esta quinta categoría, 6 pruebas inmunoquímicas.

- 1.- AFP (Alfa-fetoproteína)
- 2.- Antígeno carcinoembrionario (CEA)
- 3.- Calcitonina
- 4.- Ferritina
- 5.- Gonadotropina beta coriónica
- 6.- Gastrina.

#### 7.6 FACTORES INMUNOLOGICOS

Integran esta sexta categoría, la más numerosa, 50 pruebas inmunoquímicas que se han agrupado en cinco subcategorías.

### 7.5.1 Inmunoglobulinas (6 pruebas)

- |         |                      |
|---------|----------------------|
| 1.- IgA | 4.- IgG              |
| 2.- IgD | 5.- IgG <sub>4</sub> |
| 3.- IgE | 6.- IgM              |

### 7.6.2 Factores de complemento C (8pruebas)

- |                                    |                             |
|------------------------------------|-----------------------------|
| 1.- Complemento hemolítico total C | 5.- Fracción C <sub>3</sub> |
| 2.- Fracción C <sub>1</sub>        | 6.- Fracción C <sub>4</sub> |
| 3.- Fracción C <sub>9</sub>        | 7.- Fracción C <sub>5</sub> |
| 4.- Fracción C <sub>2</sub>        | 8.- Fracción C <sub>7</sub> |

### 7.6.3 Anticuerpos (27 pruebas)

- 1.- Anti-amibas
- 2.- Anti-bacilo tuberculoso (Prueba de Calderón)
- 3.- Anti-cisticercosis
- 4.- Anti-coccidoides
- 5.- Anti-Chlamydia
- 6.- Anti-DNA
- 7.- Anti-factor reumatoide
- 8.- Anti-herpes I
- 9.- Anti-herpes II
- 10.- Anti-histoplasma
- 11.- Anti-Lysteria

- 12.- Anti- Mycoplasma
- 13.- Anti-microsoma
- 14.- Anti-mitocondrias
- 15.- Anti-músculo liso
- 16.- Anti- nucleares.
- 17.- Anti- RNA
- 18.- Anti-rubeola
- 19.- Anti-sarampión
- 20.- Anti-SIDA
- 21.- Anti-tiroideos
- 22.- Anti-tiroglobulina
- 23.- Anti-Toxoplasma gondii
- 24.- Anti- Treponema pallidum
- 25.- Anti- virus de Enstein Barr (Prueba de Paul Bunnell)
- 26.- IgM a Toxoplasma
- 27.- IgM al virus A de la hepatitis.

#### 7.6.4 Marcadores de la hepatitis (6 pruebas).

- 1.- Anticuerpos anti-antígeno A
- 2.- Anticuerpos anti-antígeno HB<sub>S</sub>
- 3.- Anticuerpos anti- antígeno de centro HB<sub>C</sub>
- 4.- Antígeno A de la hepatitis viral
- 5.- Antígeno B de superficie de la hepatitis viral (HB<sub>S</sub>Ag)

6.- Antígeno B de centro de la hepatitis viral.

#### 7.6.5 Diversos (dos pruebas)

1.- Proteína de Bence Jones

2.- Factor células LE.

#### 7.7 PRUEBAS INMUNOQUÍMICAS DIVERSAS.

Integran esta séptima categoría, 4 pruebas inmunoquímicas.

1.- Alcohol etílico. \*

2.- Ácido fólico.

3.- HISTOSET.

4.- Vitamina B<sub>12</sub>

\*Nota: aún cuando la valoración del alcohol etílico en sangre u orina, no es una verdadera prueba inmunoquímica ya que la técnica es por medio de métodos enzimáticos, se le incluye en este trabajo dado que es una prueba complementaria que investiga las drogas de abuso.



## CONCLUSIONES.

Al final de este trabajo, nos hemos podido dar cuenta del campo de aplicación de cada uno de los métodos inmunoquímicos, así como sus ventajas de los mismos.

A continuación comentaremos brevemente las conclusiones a las que se llegaron, de cada una de las pruebas inmunoquímicas.

**ELECTROFORESIS:** se aplica para aproximadamente 15 pruebas de laboratorio, básicamente proteínas y lipoproteínas.

Estas técnicas detectan grupos de proteínas y no proteínas específicas como es el caso de tener que detectar niveles de antígenos o anticuerpos, - por lo cual son de poco valor como pruebas de detección o escrutinio, en un limitado número de procesos patológicos que reconozcan causas inmunológicas.

**INMUNODIFUSION RADIAL:** representa la técnica mas sencilla para la cuantificación de inmunoglobulinas séricas de todas las que actualmente se usan en forma rutinaria en el Laboratorio Clínico.

Se pueden valorar no menos de 20 tipos de pruebas de valoración de proteínas séricas específicas. Dichos procedimientos han sido desplazados por los del RIA, fundamentalmente por la mayor rapidez que se obtienen los resultados, además de una mayor precisión ya que las lecturas se realizan por medio de instrumentos y no acusan errores de tipo subjetivo, factibles

en la inmunodifusión al tener que medir mm de los anillos de precipitación. No obstante siguen siendo de preferencia cuando solicitan inmunoglobulinas totales y fraccionadas ya que en este tipo de pruebas nos interesa el análisis cualitativo.

**INMUNOELECTROFORESIS:** son técnicas más refinadas, permiten diferenciar en el suero humano, más de 20 proteínas en una forma simultánea.

Sus limitaciones:

- a.- requieren mucho tiempo para su realización.
- b.- no permiten efectuar análisis cuantitativos.
- c.- requieren antisueros especiales, escasos en el mercado.
- d.- se requiere de personal especializado para identificar las bandas de precipitación.

**PROCEDIMIENTOS INMUNOENZIMATICOS.** (Sistemas "ELISA" y "EMIT" )

Son técnicas con una amplia utilidad, ya que tienen los mismos alcances del "RIA" y también sirven de complemento y pueden llegar a reemplazar a técnicas serológicas tales como: fijación de complemento, hemaglutinación, inmunofluorescencia.

- 1.- Ambos sistemas involucran metodologías inmunoenzimáticas, las que derivan de los principios fundamentales del radioinmunoanálisis, pero que no requieren del uso de materiales radiactivos.

- 2.- El sistema "ELISA" se adapta mejor para la detección o valoración de compuestos de alto peso molecular y el sistema "EMIT" para compuestos de bajo peso molecular, en especial el de medicamentos de uso delicado y frecuentemente en terapéutica.
  - 3.- Las técnicas "ELISA" son metodologías inmunoenzimáticas de tipo heterogéneo, es decir sistemas que involucran el empleo de procedimientos separativos. Por consiguiente son técnicas lentas que generalmente requieren de una o varias horas para completarse.
  - 4.- Las técnicas "EMIT" son metodologías inmunoenzimáticas de tipo homogéneo en las cuales no se requiere el uso de procedimientos separativos. Por lo tanto son técnicas rápidas que se completan en contados minutos.
  - 5.- Las técnicas "ELISA" son, generalmente técnicas colorimétricas con lecturas en el rango visible del espectro. Usan reacciones de desarrollo de color y lecturas de punto final a tiempo fijo.
  - 6.- Las técnicas "EMIT" son, verdaderas técnicas inmunoenzimáticas de tipo cinético, ya que van midiendo reacciones enzimáticas en el momento en que va ocurriendo y operan en la zona ultravioleta. La rapidez con que pueden reportarse y la mínima cantidad de muestra requerida hacen que las microtécnicas "EMIT" encuentren amplio uso en urgencias de servicios de Pediatría, Geriátrica, Oncología, Cardiología, Unidad de Cuidados Intensivos, Unidad Coronaria entre otros.
- Lo antes mencionado, explica claramente su creciente aceptación y popu-

laridad alcanzada en la actualidad. Además los resultados pueden ser apreciados usando equipos normales de encontrar en todo laboratorio de análisis clínicos como es el espectrofotómetro.

COMPARACION DE LOS SIGUIENTES METODOS INMUNOENZIMATICOS RADIOINMUNOANALISIS (RIA), INMUNOFLUORESCENCIA (IF), INMUNOENZIMATICO (IE).

CARACTERISTICAS ESPECIFICAS.	IF	RIA	IE
1.- Sensibilidad	baja	alta	alta.
2.- Especificidad	alta	depende del antígeno	depende del antígeno.
3.- Precisión	aceptable	aceptable	aceptable
4.- Forma de lectura	subjetiva	objetiva	objetiva
5.- Preparación del Ag	fácil	difícil	difícil
6.- Uso del conjugado	confiable	evaluándose	evaluándose
7.- Para uso de rutina	intermedio	difícil	fácil
8.- Automatización	difícil	factible	factible
9.- Costo de la prueba	alto	alto	bajo
10.- Vida media de los reactivos.	larga	corta	larga.
11.- Peligrosidad.	mínima	real	mínima.

Al analizar la tabla anterior notamos las principales desventajas del "RIA": alto costo por prueba, corta vida de los reactivos, su potencial peligrosidad.

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

- 1.- KAPLAN, L.A. Y PENCE A.J.  
TÉCNICAS DE LABORATORIO, FISIOLÓGIA Y MÉTODOS DE ANÁLISIS  
TEORÍA, ANÁLISIS Y CORRELACIÓN.  
ED. MÉDICA PANAMERICANA, BUENOS/AIRES ARGENTINA, 1986.
- 2.- FISCHBACH F.  
A MANUAL OF LABORATORY DIAGNOSTIC TEST.  
J.B. LIPPICOTT COMPANY (ED) PHILADELPHIA PA. USA. 1987.
- 3.- GURPIDE E., GIEBENHAIN M.E., TSENG L. AND KELLY W.G.: RADIO  
IMMUNOASSAY FOR ESTROGENS IN HUMAN PREGNANCY URINE, PLASMA  
AND AMNIOTIC FLUID, AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AN GINE  
COLOGY 109; 897-906, 1981
- 4.- TODD, SANFORD, DAVIDSOHN.  
CLINICAL DIAGNOSIS AND MANAGEMENT BY LABORATORY METHODS.  
W.B. SAUNDERS COMPANY (ED) PHILADELPHIA, PA. USA. 1980
- 5.- MARGI R.A.  
FUNDAMENTOS DE INMUNOQUÍMICA.  
ED. MÉDICA PANAMERICANA, ARGENTINA 1983
- 6.- AUREBT M.L. RADIOIMMUNOASSAY FOR HUMAN PROLACTIN.  
HANDBOOK OF RADIOIMMUNOASSAY  
G.F. ABRAHAN ED. N.Y. 1980
- 7.- KLOPPER A.: MONITORING THE FETOPLACENTAL UNIT THE FETUS.  
POSTGRADUATE MEDICAL JOURNAL 51; 227-230, 1980
- 8.- STAFFORD J.E.H. A VERSATILE RADIOIMMUNOASSAY FOR THE DETER-  
MINATION OF SERUM OESTRIOL IN PREGNANCY. ANNALS OF CLINICAL  
BIOCHEMISTRY 10, 156-160, 1983

- 9.- CATT K.L. INSULIN AND GLUCOSE HOMEOSTASIS. LANCET 2, 353-358, 1977.
- 10.- FEELBER J.P.: CLINICAL USE OF RADIOIMMUNOLOGICAL PLASMA INSULIN ASSESSMENT KLINISCHE WOCHENSCHRIFT 51: 63-67; 1985.
- 11.- STUDIES ON PHENOLIC STEROIDS IN HUMAN SUBJECTS. JOURNAL OF -- CLINICAL INVESTIGATION 44: 694-702, 1975.
- 12.- PADOBA V., RIZKALLAH T.H. AND KELLY W.C.: RADIOIMMUNOASSAY FOR ESTROGENS IN MATERNAL BLOOD IN LATE PREGNANCY, VALUES FOR NORMAL AND COMPLICATED PREGNANCY. AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GINECOLOGY 117: 321-330; 1982.
- 13.- ADLERCREUTZ AND LAUKKAINEN T.: IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF ESTROGENS IN VARIOUS BIOLOGICAL MATERIALS IN PREGNANCY. ANNALS OF CLINICAL RESEARCH, 2: 365-380; 1975.
- 14.- TOWNSLEY, J.D., DUBIN, N.H., GRANNIS, G.F., FARTMAN, L.J., -- AND CRYSTLE C.D. CIRCADIAN RHYTHMS OF SERUM AND URINARY ESTROGENS IN PREGNANCY. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 36: 289-295, 1960.
- 15.- SAIRAM M.R., LI C.H.: HUMAN PITUITARY THYROTROPIN, ISOLATION AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF ITS SUBUNITS. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 51: 336-342, 1983
- 16.- VARAS A; RUÍZ F.; ORELLANA J.; IZQUIERDE L.; SILVA M.: ELECTROPHORESIS DE PROTEINAS SÉRICAS. REVISTA CHILENA DE PEDIATRÍA 55:2; 85-88, 1984
- 17.- SAIRAM M.R., PAPKOFF H., LI C.H.: HUMAN PITUITARY INTERSTITIAL CELL STIMULATING HORMONAS; PRIMARY STRUCTURE OF THE ALFA SUBUNIT. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 48: 530-537, 1980.
- 18.- SHOME B. PARLOR A.F.; HUMAN FOLLICLE STIMULATING HORMONE (HFS), FIRST PROPOSAL FOR THE AMINO ACID SEQUENCE OF THE ALFA SUBUNIT AND FIRST DEMONSTRATION OF ITS IDENTITY WITH THE ALFA SUBUNIT OF HUMAN LUTEINIZING HORMONE. J. CLIN ENDOCRINOL METAB 39: 199-202, 1980.

- 19.- SAXENA B.B.; RATHNAM P; AMINO ACID SEQUENDE OF THE BETA SUB-UNIT OF FOLLICLE STIMULATING HORMONE FROM HUMAN PITUITARY -- GLAND. J. BIOL CHEM 251: 1993-2005, 1980
- 20.- KESSLER M.J.; MISE T.; GHAI R.D.; STRUCTURE AND LACATION OF THE O-GLYCOSIDE CARBOHYDARTE UNITS OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN. J. BIOL CHEM 245: 7909-7914; 1983.
- 21.- BAHL O.P.; STUDIES ON THE PRIMARY STRUCTURE OF HCG AND ITS -RELATION SHIP TO OTHER GLYCOPROTEIN HORMONES. SAXENA B.B. GANGY H.M. (EDS) NEW YORK USA, 1980
- 22.- CATT K.J., DUFU M.L., TSURUHARA T.; ABSENCE OF INTRINSIC -- BIOLOGICAL ACTIVITY IN LH AND HCG SUBUNITS. J. CLIN ENDOCRINOL METAB 36:2 673-680, 1980.
- 23.- BELLISARIO R.; CARLSEN E.R.; BAHL O.P.; LINEAR AMINO ACID -- SEQUENCE OF THE ALFA SUBUNIT OF HCG. J. BIOL CHEM 200: 1840-1903
- 24.- MISHELL D.R. JR. THORNEYEROFT I.H.; NAGATA Y. ET AL: SERUM - GONADOTROPIN AND STEROID PATTERNS IN EARLY HUMAN GESTATION. AM. J. OSTET GYNECOL 117: 631-639; 1980.
- 25.- BELL J.J., CANFIELD R.E., SCIARRA J.J.; PURIFICATION AND CHA RACTERIZATION OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN. ENDOCRINOLOGY 84: 298-307, 1979.
- 26.- CANFIELD R.E., AGOSTO G.M., BELL J.J.; STUDIES OF THE CHEMIS TRY OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN. GONADOTROPIN AND OVARIANN DEVELOPMENT. BUTT W.R., CROOKE A.C., (EDS) EDINBURGH LIVINGSTONC 1975.
- 27.- LEE TYREY; HUAMAN CHORIONIC GONADOTROPIN: STRUCTURAL, BIOLOGICAL AND IMMUNOLOGIC ASPECTS. SEMINARS IN ONCOLOGY VOL. 9 - 163-170, 1986.
- 28.- VECSEI P. GLUCOCORTICOID: CORTISOL, CORTICOSTERONE AND COMPO UND. S. METHODS OF HORMONE RADIOIMMUNOASSAY Es. AC. PRESS -- 393, 1979.

- 29.- GIRUADO CONESA LC; PAULOVSKY A.; TÉCNICAS DE RADIONMUNOENSA  
YO, REVISTA DE LA ACADEMIA NAL. DE MEDICINA DE BUENOS AIRES  
572 291-299; 403-408, 1983.
- 30.- HUMPHREY, J.H. Y WHITE, R.G.  
INMUNOLOGÍA MÉDICA.  
ED. TORAY S.A., BARCELONA 1979.
- 31.- RUBENSTEIN, K.E. HOMOGENEOUS ENZYME IMMUNOASSAY TODAY. SCAN-  
DINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY 8; 57-62, 1980.
- 32.- AYALA A.R.; EMPLEO DE LECITINAS EN EL RADIOINMUNOANÁLISIS -  
DE HORMONAS GLUCOPROTEÍCAS. REVISTA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA -  
CA. CTO. MÉDICO INFANTIL 33/2 187-190, 1983.
- 33.- CASTILLO ALVAREZ D; MANEJO DE APLICACIÓN DE PRUEBAS IMMUNO-  
LÓGICAS: INMUNOELECTROFORESIS, ELECTROFORESIS Y CUANTIFICA-  
CIÓN DE PROTEÍNAS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS. REVISTA DEL INSTI-  
TUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE 24/2 100-114; 1985.
- 34.- HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ L.R.; DÍAZ ALMEIDA J.G.; MATARAMA PENA-  
TE M.; ESTUDIOS INMUNOELECTROFORÉTICOS DEL SUERO DE PACIEN-  
TES DE SÍFILIS RECIENTEMENTE ADQUIRIDA NO TRATADA. REVISTA  
CUBANA DE MEDICINA TROPICAL 30/3 139-146, 1980.
- 35.- FUNDENBERG, H.H. Y COLABORADORES  
MANUAL DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA.  
ED. EL MANUAL MODERNO S.A, MÉX. 1980.
- 36.- BEDOLLA TOVAR N.; ULLOA AGUIRRE A.; LANDEROS VALDEPENA J.;  
PÉREZ PALACIOS ANÁLISIS DE DATOS Y CONTROL DE CALIDAD EN EL  
RADIOINMUNOANÁLISIS, REVISTA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA INT.  
NAL. DE NUTRICIÓN 36/2 179-192, 1985



- 37.- MARTÍNEZ T.R.L.; AURIEMO C.R.C.; NACIMIENTO H.M.; LIVIERO - L.; MARTÍNEZ E.E.: EVALUATION OF ELECTROPHORETIC AND IMMUNOLOGICAL INHIBITION METHODS FOR THE DETERMINACIÓN OF CREATINE KINASE ISOENZYME ACTIVITY. REVISTA BRASILEÑA DE PATOLOGÍA CLÍNICA 19; 11-18, 1983.
- 38.- CLACK, A.J.  
APPLIED PHARMACOLOGY  
J. AND A. CHURCHILL 2DA. ED. LONDON 1960
- 39.- PARTIGEN: DISCOS DE INMUNODIFUSIÓN.  
FOLLETO INSTITUTO BEHRING, BARCELONA ESPAÑOLA 1976
- 40.- LYNCH M.J. Y COLABORADORES.  
MEDICAL LABORATORY TECHNOLOGY AND CLINICAL PATHOLOGY  
W.E. SAUNDERS COMPANY (ED) PHILADELPHIA PA, USA, 1965
- 41.- BONAVERA J.J.; VERGES E.; TORTONES D.J.; RADIOIMMUNOANÁLISIS DE PROGESTERONA EN PLASMA DE BOVINO, COMPARACIÓN DEL USO DE 125-I, 3-H COMO TRAZADORES. REVISTA DE BIOQUÍMICA CLÍNICA LATINOAMERICANA 21/1 6797-6809, 1982.
- 42.- MUNEVER E.; ORTÍZ B.L.; ESTRADA R.; MARCACIÓN DE YODO 125 - Y RADIOIMMUNOANÁLISIS DE HORMONAS FOLÍCULO ESTIMULANTE - - (FSH) Y LUTEINIZANTE (LH). REVISTA COLOMBIANA DE QUÍMICA -- 9/1 71-72, 1980.
- 43.- MIDDLEY A.R. JR., PIERCE G.B. JR.: IMMUNOCHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN. J. EXP. MED. -- 115; 289-294, 1969.
- 44.- MIDDLEY A.R., REBAR R.W. AND NISWENDER G.D.: RADIOIMMUNOASSAY EMPLOYING ANTIBODY TECHNIQUES. ACTA ENDOCRINOLOGICA SUPPLEMENT 142, 247-254, 1980.
- 45.- SWAMINATHAN N., BAHL OP.: DISSOCIATION AND RECOMBINATION OF THE SUBUNITS OF THE SUBUNITS OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 40: 422-427, 1980.

- 46.- MORGAN F.J.; CANFIELD R.E.; NATURE OF THE SUBUNITS OF HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN ENDOCRINOLOGY 88: 1045-1053, 1976
- 47.- BAHL OP: HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN, II NATURE OF THE CARBOHYDRATE UNIT J. BIOL CHEM. 244: 575-583, 1984
- 48.- CLACK C.A.  
PREVENTION OF RHESUS ISO-IMMUNIZATION  
LANCET ED. 4; 86-89 N.Y. 1980
- 49.- MANCINI G. Y COLABORADORES,  
INMUNOCHEMISTRY  
J.B. LIPPINCOTT COMPANY (ED) PHILADELPHIA PA. USA. 1969
- 50.- FLETCHER P., BENAVIDES S., AYALA A., REYES V.; SISTEMA QUE MEJORA LA DETECCIÓN DE GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA. GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA DE MÉXICO 55 169-173, 1988
- 51.- KOLMER J.A. Y TURFT L.  
INMUNOLOGÍA CLÍNICA, BIOTERAPIA Y QUIMIOTERAPIA  
ED. SALVAT, BARCELONA ESPAÑA 1978.
- 52.- DRAKE M.E. AND MING C.: GAMMA GLOBULIN IN EPIDEMIC HEPATITIS JAMA 21/2; 198-214, 1982
- 53.- CATT K., TREGEAR G.W; SOLID-PHASE RADIOIMMUNOASSAY IN ANTI-BODY-COATED TUBES. SCIENCE 158, 1570, 1982
- 54.- FRIESEN H. G.: HUMAN PROLACTIN IN CLINICAL ENDOCRINOLOGY -- THE IMPACT OF RADIOIMMUNOASSAY. METABOLISM 22, 1039, 1979.
- 55.- RUDER H. I., GUY., LIPSETT M.B.: RADIOIMMUNOASSAY FOR CORTISOL IN PLASMA AND URINE. J. CLINC ENDOCR. 35, 219, 1983.
- 56.- ROLLERI E., ZAMNINO M., ORLANDINI S., MALVANO R.: DIRECT -- RADIOIMMUNOASSAY OF PLASMA CORTISO. CLIN. CHIM. ACTA 66, -- 319, 1982.

- 57.- SALAS VALDES A., SÁNCHEZ HIDALGO V.M., NIETO CASTILLO S., -  
CERVANTES CAMPOS C., PARRA A.: CONCENTRACIÓN Y HETEROGENEIDAD DE LAS HORMONAS HIPOFISIARIAS EN LA INFANCIA. ARCHIVOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA CTO. MÉDICO NAL. 11/4 507-521, 1985.
- 58.- NAKANE P.K. Y PIENCE G.B.: HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY: JOURNAL OF IMMUNOLOGY 14, 929, 1970.
- 59.- HAN YUNFANG LI: USE OF ELISA TO DETERMINE THE ACTIVITY OF ANTISERUMS TO INSULIN. JOURNAL I, IMMUNOL 16/4 73-77, 1985
- 60.- LIU, LINXING, CHAN, KARJAN: COMPARISON OF THE MEASUREMENT OF PLATELET-ASSOCIATED IgG USING HORSE RADISH PEROXIDASE CONJUGATED POLYCLONAL ANTIBODY, JOURNAL IMMUNOL 8/3 273-277, 1987.
- 61.- COLL JULIO M.: PEROXIDASE ANTIBODY CONJUGATES STABILITY ENHANCEMENT BY USE IN ELISA JOURNAL I, IMMUNED 104/2, 259-268, 1987.
- 62.- WINTHERPOON L.R., SHULER S.E., GARCÍA M.M.; THE DESIGN OF A SIMPLE COMPETITIVE ELISA USING HUMAN PRO INSULIN ALKALINE PHOSPHATASE CONJUGATES BY GENEFUSION J. BIOCHEM 149/2 607-614, - 1987.
- 63.- COLL JULIO M.: POTENCY EVALUATION OF INSULIN IN MANUFACTURING PROCESS BY ELISA JOURNAL IMMUNOL. 16/1 47-51, 1985
- 64.- NIPPON JUI, CHI KUSAN, DAI GAKY: MICRO METHOD OF MEASUREMENT OF PLASMA INSULIN LEVELS BY ELISA. JOURNAL DIABETOLOGÍA 32, 48-51, 1983.
- 65.- BRANDERBUG D., DOZIO N., KOCH M.: IMMOBILIZATION OF RECEPTOR MOLECULES TO HYDROPHOBIC WATER SOLUBLE POLYMER IN SEPARATION METHODS ASSAYS PARTICULARLY ELISA. PATET C.T. INTERNATIONAL - 88/1 9-10, 1988

- 66.- BAUER JOHN D. CLINICAL LABORATORY METHODS.  
THE C.V. MOSBY COMPANY (ED) ST. LOUIS MISSOURI, USA 228-253,  
1982
- 67.- OCHOA ROJO E.A. Y GATICA LABORDE U.E.  
INTEERPRETACIÓN DE RESULTADOS EN PRUEBAS DE LABORATORIO.  
ASESORÍA PARA CONTROL CLÍNICO S.C. ED. MÉXICO 1982.
- 68.- PORTER R.P. Y COLABORADORES  
ESTRUCTURA Y BIOLOGÍA DE LOS ANTICUERPOS  
ESCRERPTA MÉDICA FUNDATION, AMSTERDAM 1970
- 69.- SALAZAR SCETTINO P.M. Y DE HARO ARTEAGA T.  
MANUAL DE TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO DE LAS -  
PARASITOSIS. FCO. MÉNDEZ CERVANTES (ED) MÉXICO 1979.
- 70.- BALAGUERA S. FRANTZ A.G., HOUSEPIAN E.M.: COMPARISON OF ELI  
SA AND RADIOIMMUNOASSAY FOR ANTIINSULIN ANTIBODIES DETERMI-  
NATION JOURNAL IMMUNOL 37/2; 117-121, 1987.
- 71.- YUNFENG H.A., LI JUXIAN,: HIGH SENSITIVITY IMMUNOASSAY USING  
TWO SOLID CARRIED REAGENTS. PATENT EUROPEAN 32/2, 30-31,1989
- 72.- LITTER MANUEL  
FARMACOLOGÍA EXPERIMENTAL CLÍNICA.  
ED. ATENEO MÉX. 1975
- 73.- DORLANDS MEDICAL DICTIONARY  
SAUNDERS W.B. (ED). PHILADELPHIA USA. 1980.

- 74.- BUSCH H. AND LANCE M: CHEMOTHERAPY AND INTRODUCTORY TEXT.  
YEAR BOOK MEDICAL PUBLISHERS, CHICAGO, 1970.
- 75.- LISKER R., PÉREZ BRISEÑO R., RAVE V., YOSHIDA A.: GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA. REVISTA DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA -- INT. NAL. DE NUTRICIÓN 33/2, 209-211, 1984
- 76.- HUNTER OB: PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST DNA SINGLE RING DIAMINES ADDUCTS. JOURNAL HYBRIDOMA 7/2 193-203, 1988.
- 77.- PANUSH RICHARD S., SEARLE MARY A.: SUBSTANTIALLY INCREASED SENSITIVITY OF THE SPOT EMIT FOR THE DETECTION OF ANTIBODY SECRETING CELLS USING A CAPTURE ANTIBODY AND ENZYME CONJUGATED JOURNAL I. IMMUNOL 126/1 89-94; 1990.
- 78.- INGBAR S.A., WOEBER K.A.: REGULATION OF LIPOPROTEIN LIPASE IMMUNOREACTIVE MASS IN ISOLATED HUMAN ADIPOCYTES. JOURNAL - J. CLIN INVEST. 81/2 398-406; 1988
- 79.- GEVINUP G., JOHNDON B.: PANCREAS TRANSPLANT 19/5 3921-3922, - 1987.
- 80.- KAMOUN P, Y FREJAVILLE L.P.  
GUÍA DE EXÁMENES DE LABORATORIO.  
SALVAT EDITORES, BARCELONA 1981
- 81.- MONTOYA CABRERA M.A.  
MANUAL DE INTOXICACIONES Y ENVENENAMIENTOS.  
FCO. MÉNDEZ CERVANTES (ED) MÉXICO 1984.
- 82.- SOSOYEZ GAFFAUXF., KOCH M., DOZIO N.; ADVANTAGES AND PITFALLS OF RADIOIMMUNE AND ENZYME LIKED IMMUNOSORBENT ASSAY OF INSULIN ANTIBODIES JOURNAL IMMUNOL 31/9, 694-702, 1988
- 83.- EHRENGUT W.  
INMUNIZACIÓN ACTIVA DE LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS.  
ED. CIENTIFICO MÉDICA BARCELONA 1987.

84.- JAWETZ E., MELNICK J.L. Y ADELBERG E.A.

MANUAL DE MICROBIOLOGÍA MODERNA

ED. EL MANUAL MODERNO S.A. MÉX. 1978.

85.- SALLE A.J.B.

BACTERIOLOGÍA.

ED. G.GILI S.A. BARCELONA ESPAÑA 1960

86.- BUYNAC E.B., HILLEMANN M.R., WEIBEL E.R. AND STOKES J.: LIVE ATTENUATED RUBELLA VIRUS CACCINES PREPARED IN DUCK EMBRYO - CELL CULTURE. BIOL CHEM 128; 679-683, 1983

87.- VARELA DÍAZ V.M., COLTORTI E.A.: TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO DE LA HIDATOSIS HUMANA. SERIE DE MONOGRAFÍAS CIENTÍFICAS. CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS. 7 1-48; 1983