

92
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

IMPORTANCIA DE LA DETERMINACION DE
ALFA-FETOPROTEINA EN SUERO MATERNO Y EN
LIQUIDO AMNIOTICO COMO AUXILIAR EN EL
DIAGNOSTICO PRENATAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO - FARMACEUTICO - BILOGO

P R E S E N T A :

CRISELDA MENDOZA MILLA



MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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

INTRODUCCION	1
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	4
I. GENERALIDADES	
a. Defectos de cierre del tubo neural (DCTN):	
i. Embriología	6
ii. Incidencia y nomenclatura	7
iii. Etiología	12
iv. Diagnóstico prenatal. Alfa-fetoproteína (AFP)	15
b. Pruebas de diagnóstico inmunológico:	
i. Inmunoprecipitación	18
ii. Electroforesis	20
iii. Inmunoensayo	21
Radioinmunoanálisis	23
Enzimoimmunoensayo	26
II. PARTE EXPERIMENTAL	
i. Material y equipo	
a) Material y equipo de laboratorio	35
b) Material biológico	35
c) Reactivos y material de control de calidad	36
ii. Metodología	
a) Fundamento de la prueba	38
b) Procedimiento del ensayo	38
c) Determinación de la dilución adecuada para líquido amniótico	40
d) Determinación de Alfa-fetoproteína en suero materno y líquido amniótico	40
e) Validación del estudio	41
iii. Resultados	45
iv. Discusión de resultados	67
CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFIA	74

INTRODUCCION

En los últimos años, las enfermedades genéticas y los defectos congénitos han ido adquiriendo cada vez mayor importancia en nuestro medio, debido principalmente a la frecuencia con la que se presentan y por ser causas de mortalidad y morbilidad elevadas en América Latina y el Caribe (42). Estas enfermedades y sus efectos, incluyen malformaciones congénitas como los defectos de cierre del tubo neural, retraso mental, sordera y la ceguera congénitas, las anomalías cromosómicas como el síndrome de Down y cerca de 4.000 enfermedades hereditarias entre las que se encuentran las hemoglobinopatías, la fibrosis quística, las hemofilias, las distrofias musculares, las enfermedades neurológicas degenerativas y las anomalías congénitas del metabolismo, entre otras. (8,42)

Los defectos congénitos, incluyen enfermedades genéticas, trastornos parcialmente genéticos y defectos no genéticos. Las enfermedades genéticas se deben a alteraciones cromosómicas, mientras que los trastornos parcialmente genéticos tienen un origen multifactorial, e incluyen las malformaciones congénitas, como los defectos de cierre del tubo neural y algunas enfermedades comunes. Por último, dentro de los defectos congénitos no genéticos se encuentran todos aquellos provocados por agentes ambientales teratogénicos (42).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha realizado

relevantes actividades en cuanto a la prevención de enfermedades genéticas a nivel comunitario, en especial, en países en desarrollo (incluyendo México), con el fin de recomendar las acciones necesarias y prestar los servicios preventivo-asistenciales a individuos y familias afectados o en riesgo de padecer o transmitir enfermedades genéticas a su descendencia (42). Se pretende que dichos servicios preventivo-asistenciales, se centren hacia la detección de grupos de alto riesgo en la población en general, para lo cual es necesario considerar los factores que pueden ser indicativos de riesgo genético aumentado y que se enlistan a continuación:

- Historia familiar positiva para defectos congénitos.
- Edad materna avanzada.
- Origen étnico geográfico.
- Nivel anormal de alfa-fetoproteína (AFP) sérica materno durante la gestación.

Por lo que respecta a la alfa-fetoproteína (AFP), se le ha atribuido importancia como auxiliar en el campo de la oncología para detección, tratamiento y monitoreo de tumores productores de dicha proteína. Sin embargo, en años más recientes (1972), se evidenció su utilidad en el área de la gineco-obstetricia como ayuda para detectar anomalías fetales. La determinación de alfa-fetoproteína está recomendada por la Sociedad Americana de Genética Humana que ha dictado medidas relativas a la realización de programas para la evaluación de AFP en suero materno de mujeres gestantes en general, así como de control de calidad para laboratorios que efectúan dicha determinación (2). El Comité de

Genética de la Academia Americana de Pediatría (16) y el Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos, apoyados por la Food and Drug Administration (49), también han recomendado la realización de dichos programas, lo que ha conducido a demostrar que la medición de AFP sérica entre las semanas 16 y 18 de la gestación, es un método de tamizaje que identifica a una parte importante de las mujeres portadoras de fetos con defectos "abiertos" del tubo neural (VER GENERALIDADES), es decir, una anomalía en la formación de canal espinal y espina dorsal o médula espinal, así como aquellas que portan fetos con síndrome de Down y otras cromosomopatías.

El interés por la realización de este trabajo, se debe a la alta incidencia que en nuestro país presentan los defectos de cierre del tubo neural, lo cual hace pensar en la necesidad de disponer de un método confiable que identifique dichos problemas en etapa prenatal temprana y con un mínimo de inconvenientes y riesgos para la madre y el feto; la determinación de AFP por el método de ELISA en suero materno primero y, posteriormente y sólo en caso necesario, en líquido amniótico, presenta grandes ventajas principalmente por ser un método no invasivo, comparativamente con otras técnicas entre las que se encuentran la muestra de vellosidades coriónicas y la fetoscopia, también utilizadas en diagnóstico prenatal.

HIPOTESIS.

La elevación de la concentración de AFP tanto en suero materno como en líquido amniótico es un parámetro auxiliar útil en el diagnóstico prenatal temprano de algunos defectos de cierre del tubo neural; mientras que la elevación de AFP sólo en suero materno, indica embarazo de alto riesgo, como en el caso de embarazo gemelar, producto de bajo peso al nacimiento, amenaza de aborto, etc..

OBJETIVOS.

- a) Determinar la concentración de alfa-fetoproteína en muestras de suero materno y líquido amniótico a través de la técnica ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), utilizando un estuche comercial.
- b) Evidenciar la utilidad de la determinación de alfa-fetoproteína en suero materno y en líquido amniótico como auxiliar en el diagnóstico prenatal temprano de defectos de cierre del tubo neural.
- c) Comparar esta técnica con otras, utilizadas para discriminar los embarazos normales de aquellos afectados por una anomalía de cierre del tubo neural.

- d) Estudiar la relación de los resultados obtenidos con las manifestaciones clínicas, mediante el análisis retrospectivo y ciego de una población seleccionada.

I. GENERALIDADES

a. Defectos de cierre del tubo neural (DCTN)

i. Embriología

El sistema nervioso central se desarrolla a partir de un engrosamiento neuroectodérmico dorsal del disco embrionario llamado placa neural; esta placa aparece aproximadamente a la mitad de la tercera semana de gestación y comienza a plegarse formando el surco neural y los pliegues neurales; cuando dichos pliegues neurales se fusionan forman el tubo neural, cuyo extremo craneal origina el cerebro, que consiste de prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. El prosencéfalo da origen al cerebro, el mesencéfalo al mesencéfalo definitivo y el rombencéfalo origina el puente, el cerebelo y el bulbo raquídeo. La porción restante y más larga del tubo neural se convierte en la médula espinal. El interior del tubo neural forma los ventrículos cerebrales y el epéndimo. Las paredes del tubo neural se engrosan por proliferación de células neuroepiteliales que dan lugar a todas las células nerviosas y de la macroglía del sistema nervioso central. (30, 39)

Las malformaciones congénitas del sistema nervioso central son muy frecuentes y la mayor parte corresponden a defectos de cierre del tubo neural. Las malformaciones pueden estar limitadas a sistema nervioso o incluir tejidos circundantes (cartílago, hueso,

músculo y tejido conectivo).

Se sabe que el desarrollo de algunas malformaciones depende de anomalías a nivel genético, otras resultan de factores ambientales (agentes infecciosos, fármacos, radiaciones y enfermedades metabólicas). Sin embargo, se cree que la mayor parte de ellas dependen de la combinación de factores ambientales y genéticos. (5.30,39)

Casi todas las anomalías mayores (por ejemplo anencefalia), son incompatibles con la vida; otras relativamente menos graves que las anteriores, suelen derivar en incapacidad funcional (parálisis muscular de miembros inferiores, incontinencia de esfínteres, hidrocefalia). (8.56)

ii. Incidencia y nomenclatura

La incidencia de los defectos de cierre del tubo neural en general, varía de un reporte a otro y dependiendo de la zona geográfica en estudio. No se han reportado datos relativos a población mexicana; sin embargo, a través de comunicación personal se sabe que es de 5:1000 en recién nacidos vivos y muertos en población del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Los defectos de cierre del tubo neural se clasifican de acuerdo a: 1) la región afectada del sistema nervioso central, 2) las estructuras anatómicas que quedan dentro del defecto y 3) las características del mismo (36); generalmente no se observan como

un daño puro de alguno de ellos, sino como una combinación de dos o más, con base en lo cual algunos autores señalan la siguiente clasificación general: (8,56)

- a) Anencefalia: con o sin espina bífida
con o sin encefalocele
- b) Espina bífida: sin anencefalia
con o sin encefalocele
- c) Encefalocele: sin espina bífida
sin anencefalia

De acuerdo a la región del sistema nervioso central afectada y las estructuras anatómicas involucradas, tenemos la siguiente caracterización:

1) Defectos de la zona craneal del tubo neural que formará el encéfalo, los podemos dividir en:

ANENCEFALIA.- es el defecto más impresionante y de mayor gravedad dentro de este grupo ya que es incompatible con la vida extrauterina: el producto nace muerto (mortinato) o muere poco después del nacimiento. Es una malformación frecuente, 1:1000 de acuerdo a datos de Inglaterra (30,39), que se manifiesta como falta de desarrollo del encéfalo o una parte importante del mismo (prosencefalo o hemisferios cerebrales), lo cual da por resultado una masa amorfa de tejido neural. Esta malformación se acompaña invariablemente de **acranea** (anomalía en el desarrollo del cráneo y cuero cabelludo) y frecuentemente de **raquisquisis** (falta de fusión de varios arcos vertebrales).

EXENCEFALIA.- es la exteriorización del encéfalo anormalmente

desarrollado que se observa en la etapa fetal; se cree que puede ser resultado de una malformación anatómicamente semejante en recién nacidos muertos o vivos.

ENCEFALOCELE.- son defectos quísticos del tubo neural del encéfalo, con alteraciones variables de cráneo y cuero cabelludo (36), son análogos a los meningoceles que se producen en la médula espinal. En el encefalocele, parte del cerebro y las meninges experimentan herniación por un defecto del cráneo (bífido) por, lo regular en la región occipital; este estado ocurre aproximadamente una vez en 2.000 nacimientos. Dependiendo del sitio en que se encuentre ubicada la lesión, será la parte del cerebro que se hernie. El encefalocele suele acompañarse de hidrocefalia (acumulación de líquido cefalorraquídeo en las meninges). Si el saco meníngeo contiene solamente líquido, se denomina meningocele craneal.

INIENCEFALIA.- es un defecto raro del tubo neural, que abarca la base del cráneo, las vértebras cervicales y las estructuras nerviosas subyacentes. Se caracteriza por una fisura occipital y protrusión del encéfalo (36.56).

2) Defectos de fusión de la línea media de los arcos vertebrales dorsales: son malformaciones acompañadas frecuentemente por defectos de la médula espinal y se denominan colectivamente **disrafismo raquídeo o espina bífida**, lo cual denota un defecto del raquis. Si el defecto involucra varias vértebras, se produce una hendidura extensa de la columna

vertebral, estado conocido como **raquisquisis**. El término "espinas bífidas" se utiliza para denominar estados en los cuales existen defectos vertebrales y nerviosos, siendo esta malformación más frecuente en las regiones torácica inferior, lumbar y sacra.

Además la espina bífida puede ser "abierta", si el tejido neural está completamente expuesto o solamente cubierto por una membrana delgada y transparente; y "cerrada" si la lesión está completamente cubierta por piel o por una membrana gruesa y opaca. También puede ser "oculta", cuando existe falta de fusión de los arcos vertebrales; o "quistica" cuando hay defectos saculares acompañantes de los elementos neurales (36,56).

ESPINA BIFIDA OCULTA O MIELODISPLASIA.- incluye las diversas malformaciones menos manifiestas y menos graves de la médula espinal (36), que resultan del desarrollo defectuoso del tubo neural caudal, en ellas se advierte falta de fusión de las mitades del arco vertebral, por lo regular en las regiones lumbar o sacra (39). El defecto está cubierto por piel y es posible descubrirlo por radiografía del raquis. Estas alteraciones a menudo se caracterizan por trastornos de los tejidos blandos (lipoma), o cambios cutáneos (penacho de pelo, hoyuelos, trayectos sinusales o zonas de pigmentación). Por lo regular no se advierten trastornos neurológicos ni músculo-esqueléticos relacionados con la espina bífida oculta, ya que el estado es resultado de desarrollo óseo defectuoso y no neurológico (39); sin embargo, algunos autores (36) sostienen que pueden presentarse problemas neurológicos y ortopédicos que pueden ser

resultado de un mecanismo embriológico semejante al de otros defectos del tubo neural.

ESPINA BIFIDA QUISTICA.- son casos graves de espina bífida, en los que hay protrusión sacular externa de las meninges, o de la médula espinal y meninges, debido a defectos dorsales en las vértebras. Se presenta con grado variable de "ataque neurológico", según el sitio y extensión de la lesión. Suele haber pérdida de la sensibilidad con parálisis muscular esquelética total o parcial. El nivel de la lesión determina la zona en la que se pierde la sensibilidad dérmica y los músculos que son atacados. En el mielomeningocele es frecuente que se vean afectados los esfínteres vesical, anal o ambos, por lo cual se advierte pérdida de la sensibilidad en la zona que corresponde a la región de glúteos, perineo y caras internas de los muslos. La incidencia de la espina bífida quística, varía de acuerdo a la zona geográfica en estudio (39); por ejemplo, se ha demostrado que tan sólo en las Islas Británicas, la frecuencia varía de 4.2 por cada 1,000 nacidos vivos en Gales del Sur a 2.8 por cada 1.000 en Buckinghamshire y aproximadamente 1.5 por cada 1,000 en la región sureste.

- **Mielomeningocele:** cuando el saco contiene únicamente meninges y líquido cefaloraquídeo el estado se conoce como espina bífida con mielomeningocele. Si en el saco quedan incluidas médula espinal y raíces de la cola de caballo, la malformación se conoce como "espina bífida con mielomeningocele". Algunos autores emplean como sinónimos meningocele y mieloccele, pero es más

adecuado el término mielomeningocele, ya que como se mencionó antes, raramente se advierte un tipo puro de cualquier malformación. El mielomeningocele es una malformación mucho más frecuente (1:1000 en nacidos vivos) y más grave que el meningocele, ambos pueden ocurrir en cualquier nivel del eje raquídeo, pero son más frecuentemente observados en la región lumbar.

- Espina bífida con mielosquisis: se observa generalmente en la región lumbar (36) y como un defecto fetal temprano (39). Ocurre como consecuencia de una falla en la fusión de los pliegues neurales, por lo que la placa neural queda expuesta a la superficie y no está cubierta por piel. En los fetos afectados, la lesión puede ser extensa y abarcar casi toda la longitud de la médula espinal. Se sospecha que la mielosquisis y la espina bífida resultante, son consecuencia del excesivo crecimiento en forma local de la placa neural, lo cual deriva en la falta de fusión de los pliegues neurales. Los productos que nacen con malformaciones graves de este tipo no tienen oportunidad de sobrevivir.

iii. Etiología

Es probable que la mayor parte de las malformaciones, dependan de la combinación de factores genéticos y ambientales (82), sin embargo, no se conoce con certeza la etiología de los defectos "aislados" del tubo neural; la mayor parte de ellos parece tener

un origen multifactorial. lo cual indica predisposición genética (siguiendo un patrón de herencia Mendeliana) y exposición a agentes ambientales o desconocidos que en conjunto producen un error en la morfogénesis del sistema nervioso central. A continuación se mencionan las causas principales que se supone son factores desencadenantes de este tipo de malformaciones (81) y otras que algunos autores sugieren como predisponentes:

- Alteraciones maternas intrínsecas (fiebre)
- Componentes dietéticos (té, alcohol, patatas con roya)
- Variaciones geográficas, étnicas y raciales
- Predisposición en "años pico"
- Variación estacional en algunas regiones (invierno)
- Relación con la paridad (mayor frecuencia en primeros nacimientos y baja en segundos nacimientos)
- Estado socioeconómico bajo
- Esterilidad
- Edad materna
- Disminución sérica de vitaminas y ácido fólico

Las diversas investigaciones han generado especulaciones e interés sobre los factores ambientales potenciales que podrían tener importancia etiológica. sin embargo no se ha comprobado que alguno de ellos sea un factor predisponente a defectos de cierre de tubo neural. (33,8,5)

iv. Diagnóstico prenatal

El diagnóstico prenatal es el conjunto de medidas encaminadas a la detección de grupos de alto riesgo durante la gestación, con el fin de tomar la decisión adecuada con respecto al cuidado prenatal y considerar como embarazo de alto riesgo aquél en el que existe un aumento en la probabilidad de que se presente un defecto congénito; las principales actividades que se incluyen dentro de un programa adecuado de diagnóstico prenatal son: (20.34.38)

a) Detección sistemática de antecedentes familiares en las consultas médicas generales.

b) Detección de heterocigotos para ciertos genes recesivos frecuentes (como la anemia de células falciformes en la población negra).

c) Examen sistemático de alfa-fetoproteína (AFP) sérica materna durante el embarazo.

El diagnóstico prenatal se clasifica en función del momento de la gestación durante el cual se practique, como: a) diagnóstico prenatal temprano, que se lleva a cabo durante el segundo trimestre de la gestación, preferentemente entre las semanas 16 y 18, y se enfoca hacia la detección temprana de algunos desórdenes fetales entre los que se encuentran los defectos de cierre del tubo neural, con el fin de someter a la consideración de los padres y del médico la decisión de continuar o dar término al embarazo; b) diagnóstico prenatal tardío, el cual se lleva a

cabo hacia el final del segundo trimestre de gestación, con el propósito de detectar sensibilización Rh e inmadurez fetal.

Alfa-fetoproteína (AFP).

La AFP es la proteína sérica principal de las primeras etapas de la vida fetal, se produce inicialmente en el saco vitelino y posteriormente en el hígado fetal durante el desarrollo temprano. La producción de dicha proteína aumenta gradualmente durante la primera mitad del embarazo hasta alcanzar concentraciones máximas aproximadas de 2-3 mg/ml (1180 UI/ml) en suero fetal entre las semanas 13 y 18 de la gestación. Con el progreso del embarazo, el aumento en el tamaño del feto, reditúa en la disminución de AFP circulante, por lo que después de la semana 32, en el momento del parto y durante el período neonatal temprano, se encuentran concentraciones relativamente bajas de AFP sérica fetal y neonatal. (7.8.56.57)

En líquido amniótico la fuente principal de AFP es la orina fetal, consecuentemente las concentraciones en dicho espécimen, se elevan y disminuyen paralelamente a como ocurre en suero fetal, sólo que en este último se encuentra en concentración 100 a 200 veces más alta que en líquido amniótico (36), por lo que en suero fetal es del orden de mg/ml, mientras que en líquido amniótico la concentración es de $\mu\text{g/ml}$, lo que hace necesario sobre todo para analizar este último, emplear métodos de determinación sensibles, precisos y específicos, tales como los métodos Inmuno Enzimáticos o RIA (Radio Inmuno

Assay). (3,4,8,17,56,17)

Por otro lado, se ha demostrado la presencia de AFP en suero materno, lo cual puede deberse a un aumento de la permeabilidad placentaria a medida que avanza la gestación, ya que se observa un aumento progresivo durante el segundo trimestre y concentraciones séricas pico entre las semanas 32 y 34, para después comenzar a disminuir. Después del parto y en mujeres adultas normales y sanas, la concentración sérica de AFP disminuye a niveles bajos o imperceptibles (menores de 10 a 20 ng/ml), al igual que en varones adultos sanos, lo que también requiere de métodos con elevada sensibilidad para su determinación. (3,4,7,8,51,53,56,57)

La medición de AFP sérica entre las semanas 16 y 18 de la gestación es un método de tamizaje que identifica a una parte importante de las mujeres portadoras de fetos con defectos "abiertos" del tubo neural (7), (ver incidencia y nomenclatura).

La elevación de AFP en mujeres gestantes, se dedujo gracias a la observación de que en anencefalia y otros defectos del tubo neural, se produce elevación de pigmentos de bilirrubina en líquido amniótico, lo cual sugirió la posibilidad de que pudieran ocurrir fugas de componentes del suero fetal (entre ellos la AFP) hacia la cavidad amniótica, mediante un mecanismo de difusión a través de los vasos sanguíneos expuestos en la lesión. Sin embargo, es importante señalar que con esta técnica no es posible detectar defectos "cerrados" (cubiertos por piel)

del tubo neural, lo cual es equivalente aproximadamente al 10% del total de este tipo de malformaciones. (6.8.16.56.57)

La elevación de AFP no es exclusiva de los defectos de cierre del tubo neural, ya que puede ocurrir bajo otras circunstancias anormales entre las que se incluyen: (24)

- Edad gestacional errónea
- Hemorragia feto-materna
- Onfalocele
- Nefropatías proteinúricas congénitas
- Teratoma sacrococcíqueo
- Muerte intrauterina
- Atresia esofágica
- Hidrocefalia
- Embarazo gemelar
- Higroma quístico
- Gastroquisis
- Neoplasias maternas productoras de AFP

b. Pruebas de diagnóstico inmunológico

La detección de las reacciones antígeno-anticuerpo es posible gracias a la disponibilidad de diversas pruebas inmunológicas de laboratorio, tanto sencillas como sofisticadas y que presentan grandes ventajas en cuanto a tiempo, sensibilidad, especificidad, asequibilidad, precisión y exactitud, lo cual nos permite la interpretación y evaluación adecuada de los resultados.

i. Inmunoprecipitación

Es uno de los métodos más simples y directos para la demostración de las reacciones antígeno-anticuerpo. La formación de complejos antígeno-anticuerpo en un medio semisólido como el gel, está influenciada por las condiciones de pH, temperatura, amortiguadores y principalmente por las concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo, ya que la concentración excesiva de anticuerpo, puede favorecer el fenómeno de prozona que constituye una fuente de error en la interpretación de resultados. Las técnicas de inmunoprecipitación se aplican principalmente para la cuantificación de inmunoglobulinas. Las reacciones de inmunodifusión pueden clasificarse como únicas o dobles, siendo las primeras aquellas en las que el antígeno (Ag) o el anticuerpo (Ac) permanece fijo, y el otro reactivo difunde para unirse con él. En la inmunodifusión doble, tanto el Ag como el Ac difunden uno hacia el otro para acoplarse y precipitar.

El punto de equivalencia o punto de máxima precipitación tiene lugar en el momento en que la cantidad de moléculas de Ag y Ac

que integran los complejos antígeno-anticuerpo, se encuentran en proporción de 3-4:1; por lo tanto, ésta condición se cumple esencialmente con los antígenos fácilmente solubles y que poseen un número pequeño de puntos antigénicos reactivos en cada molécula, lo que permite la formación de estructuras trabeculares insolubles que precipitan. (52)

Dentro de las técnicas de inmunodifusión más conocidas, se encuentran las siguientes:

- Difusión doble en agar o análisis de Ouchterlony.- el antígeno y el anticuerpo difunden libremente en un medio semisólido y forman complejos inmunes que precipitan y pueden ser analizados visualmente. Se utiliza un gel de agar como soporte (en caja Petri o portaobjetos), en el que se horadan pequeños pozos separados algunos milímetros. El Ag y el Ac se colocan en pozos opuestos y después de 18-48 horas en cámara húmeda los reactantes se pondrán en contacto al difundir, formando una banda de precipitación en el punto de equivalencia. Este método se puede utilizar en forma semicuantitativa a través de diluciones seriadas del Ag o del Ac. (24,52)

- Difusión radial única.- se incorporan anticuerpos específicos en una placa de agar y el antígeno colocado en un pozo horadado en el gel difunde a través de éste, formándose halos de precipitación al interaccionar el antígeno y el anticuerpo. Dichos halos se forman cuando la reacción alcanza su punto de equivalencia, es decir, el punto de relación óptima antígeno/anticuerpo. Es posible realizar la prueba en forma

cuantitativa mediante la comparación gráfica con preparaciones de estándares de antígenos para determinar la cantidad de antígeno desconocido.

ii. Electroforesis

Se utiliza principalmente para analizar la heterogeneidad de las proteínas individualmente. la separación de los componentes proteicos de una muestra se lleva a cabo en un campo eléctrico con base en la carga eléctrica superficial, peso molecular, punto isoelectrico, pH y electrolitos del amortiguador, utilizando como soporte gel de agarosa, papel, acetato de celulosa, gel de almidón o gel de poliacrilamida.

- Electroforesis de zona.- la separación se efectúa exclusivamente sobre la base de la carga eléctrica de las proteínas. utilizando un medio de soporte inerte (tiras de papel o acetato de celulosa) y soluciones amortiguadoras alcalinas. La identificación se realiza mediante posterior tinción y evaluación densitométrica. Tiene su aplicación principal en el diagnóstico de paraproteinemias humanas como el mieloma múltiple y las macroglobulinemias e hipogammaglobulinemias, entre otras.(52)

- Inmuno-electroforesis (IEF).- es un método que combina la difusión por separación electroforética y la precipitación inmunitaria de las proteínas en una placa de vidrio cubierta con agar o con agarosa en solución amortiguadora, en la que se practica una depresión larga y estrecha para el anticuerpo (suero

anti-humano) y un pozo para el antígeno (muestra); se coloca primero el antígeno, el cual se separa electroforéticamente de 30 a 60 minutos. posteriormente se adiciona el antisuero y se deja difundir durante un tiempo preestablecido (18 a 24 horas), después de lo cual se formarán bandas de precipitación al ocurrir la interacción antígeno/anticuerpo. Esta prueba se aplica en el diagnóstico de laboratorio de las paraproteinemias, así como en la identificación de cadenas L en la orina de pacientes con trastornos autoinmunitarios.

- Electroinmunodifusión.- en las técnicas de inmunodifusión, se aumenta la probabilidad de que el antígeno y el anticuerpo se encuentren, ya que ambos se impulsan mediante corrientes eléctricas, lo cual aumenta la velocidad de aparición de la línea de precipitación. Existen numerosas variantes, entre las cuales las de mayor aplicación clínica son la electroinmunodifusión unidimensional doble (contraimmunoelectroforesis) y la electroinmunodifusión única unidimensional (electroforesis en cohete de Laurell). (52)

iii: Inmunoensayo.

El desarrollo de la técnica del inmunoensayo ha tenido gran relevancia en diversas áreas de la medicina, principalmente por su alta especificidad y sensibilidad, las cuales permiten la detección de una amplia variedad de sustancias de importancia clínica y biológica utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales. Entre las moléculas detectables a través de este

método se encuentran las hormonas, fármacos, vitaminas, marcadores tumorales y anticuerpos relacionados con alergias, con infecciones bacterianas y virales (hepatitis y SIDA), presentes en tejidos o líquidos biológicos en concentraciones reducidas.

El primer método de valoración de ligandos que se desarrolló fue el radioinmunoanálisis (RIA), cuyo principio tiene sus antecedentes en los estudios realizados por Yalow en 1960. En términos generales, los requerimientos para realizar la valoración de una sustancia a través de un inmunoensayo son: (14,24,52)

a) Reactivos de fijación específica: anticuerpos específicos para el antígeno.

b) Marcador: la molécula indicadora (antígeno o anticuerpo) usada en el ensayo se marca para permitir la amplificación de la señal original: dicho marcaje involucra, ya sea radiactividad, actividad enzimática o fluorescencia, en función de lo cual se deriva una gran variedad de metodologías.

c) Una preparación estándar de la sustancia a determinar, teniendo presentes factores de importancia definitiva inherentes a dicho estándar como: estabilidad, comportamiento en el sistema, afinidad, matriz empleada, etc.

d) Un sistema para separar las fracciones unida y libre, como ejemplos tenemos: migración diferencial de la fracción ligada o libre, precipitación de la fracción ligada, adsorción de la fracción ligada o libre, fijación de algunos de los reactantes del sistema a una fase sólida, etc.

La combinación de todas las variantes posibles en el inmunoensayo, ha permitido el desarrollo de una amplia diversidad

de metodologías, que se clasifican, entre otras, de la siguiente manera basada en el tipo de marcador utilizado (de acuerdo a la I.F.C.C.):

MARCADOR	REACTIVO MARCADO	DESIGNACION PROPUESTA (abreviación)
RADIO-ISOTOPO	ANTIGENO ANTICUERPO	RADIOINMUNOENSAYO (RIA) ENSAYO INMUNORADIOMETRICO (IRMA)
ENZIMA	ANTIGENO ANTICUERPO	ENZIMOINMUNOENSAYO (EIA) ENSAYO INMUNOENZIMOMETRICO (IEMA)
METAL	ANTIGENO ANTICUERPO	METALINMUNOENSAYO (MIA) ENSAYO INMUNOMETALOMETRICO (IMMA)
FLUOROFORO	ANTIGENO ANTICUERPO	FLUOROINMUNOENSAYO (FIA) ENSAYO INMUNOFLUOROMETRICO (IFMA)
VIRUS	ANTIGENO ANTICUERPO	VIROINMUNOENSAYO (VIA) ENSAYO INMUNOVIROMETRICO (IVMA)

De los ya mencionados en el cuadro, solamente se describen a continuación el RIA y EIA.

A. RADIOINMUNOANALISIS (RIA).

Es una técnica empleada para la valoración de analitos o ligandos (antígenos) a través de la unión de éstos a una proteína de unión que comunmente es un anticuerpo. Existen analitos de tamaño tan reducido que no permiten la producción de anticuerpos (in vivo), por lo cual es necesario que se una a una molécula de mayor tamaño para inducir dicha producción, en este papel el analito o ligando se conoce como hapteno.

Para su evaluación se establecen varios pasos de reacción que

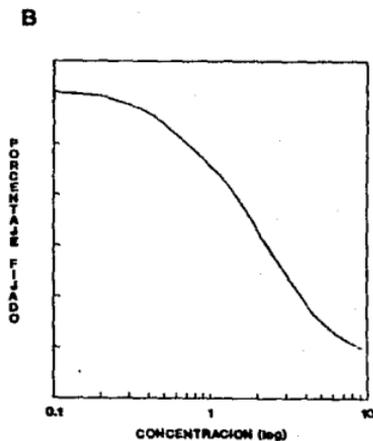
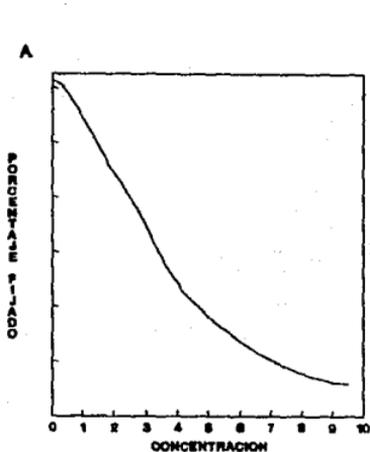
consideran una concentración fija y conocida de anticuerpo (ligando) y del antígeno (analito) marcado con isótopos radiactivos y diluido para elaborar una curva de calibración; en otro vaso de reacción se adiciona además, la muestra que contiene el antígeno que se investiga. El fenómeno principal es la competencia entre el antígeno marcado y el no marcado (de la muestra) por los sitios de unión del anticuerpo. Las fracciones unida (antígeno unido a anticuerpo) y libre (antígeno marcado libre en solución), se someten a un proceso de separación física; los métodos que atrapan al anticuerpo (unidor) y los complejos antígeno/anticuerpo pueden ser (14,24,52):

- a) Precipitación salina de la proteína mediante sulfato de amonio o sodio.
- b) Desnaturalización y precipitación de la proteína utilizando solventes como metanol, etanol o acetona.
- c) Precipitación con polietilén glicol.
- d) Segundo anticuerpo dirigido contra el primero.
- e) Inmovilización del anticuerpo (unidor) a una fase sólida (tubo de reacción o partículas microscópicas).
- f) Adsorción del ligando libre con talco, carbón, sílice, resina de intercambio iónico, celulosa sefadex o arcilla de batán.
- g) Otros que se utilizan con menor frecuencia son: electroforesis, filtración en gel y diálisis de equilibrio.

El método final de medición de la respuesta es el conteo radiactivo, que depende del tipo de radiación emitida por el marcador, se utiliza un contador de centelleo líquido para emisiones alfa y beta, y un contador gamma de cristal sólido para

emisiones gamma.

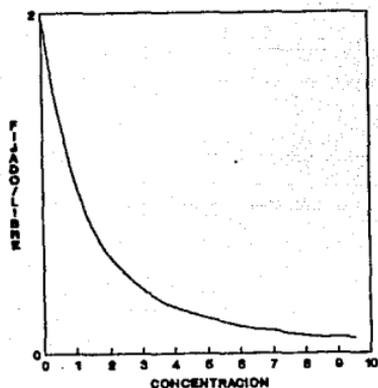
La evaluación de la muestra se realiza a través de una curva de calibración conocida como curva dosis-respuesta, de la cual existen varios métodos de representación (14,24,45):



a) Porcentaje o fracción del marcador fijado con respecto a la concentración del estándar.

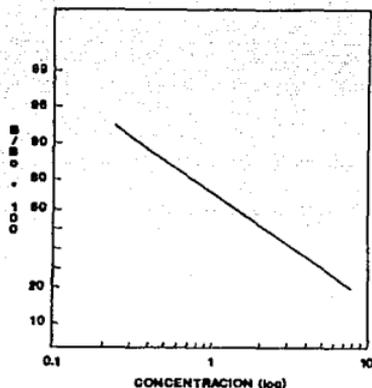
b) Porcentaje o fracción de marcador con respecto al logaritmo de la concentración del estándar

C



c) Cociente de fracción fija-
da/marcador libre con respecto
a la concentración del estándar

D



d) Logaritmo B/B_0 (donde B es la
fracción de marcador fijado y B_0
la fracción fijada cuando no ex-
isten antígenos no marcados en
el sistema) con respecto al lo-
garitmo de la concentración del
estándar.

Una vez que se dispone de la curva de calibración, es posible estimar la concentración del analito en la muestra mediante la interpolación de la respuesta obtenida, en dicha curva.

B. ENZIMOINMUNOENSAYO O INMUNOANÁLISIS ENZIMÁTICO (EIA).

Estos ensayos emplean enzimas como marcadores, en sustitución de los radioisótopos utilizados en el Radioinmuno Análisis. Como todos los métodos, éste presenta ventajas (sensibilidad, bajo

costo relativo, equipo accesible y barato, elimina riesgo por radiaciones, adaptabilidad a la automatización, entre otras) e inconvenientes (la medición de actividad enzimática puede ser mas compleja que la medición de la actividad de algunos isótopos, la actividad enzimática puede verse interferida por componentes del plasma, los reactivos de EIA homogéneos para moléculas proteicas grandes son complejos, etc.).(14,24,52)

La clasificación de los EIA, se basa en los siguientes puntos:

- a) El reactivo que se investiga (antígeno o anticuerpo).
- b) El reactivo marcado (antígeno o anticuerpo).
- c) La naturaleza competitiva o no del ensayo.
- d) El método de separación de las fracciones unida y libre.

El EIA puede ser Homogéneo conocido como EMIT (Técnica de Inmunoanálisis Enzimático Multiplicado o Enzyme-multiplied immunoassay Technique) y Heterogéneo conocido como ELISA por sus siglas en inglés (Análisis de Inmuno Absorción Enzimática o Análisis por Enzimas Fijadas a Inmunoabsorbentes o Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

En cuanto al marcador enzimático, éste debe reunir los requisitos de elevada velocidad de recambio de sustrato, pureza, ausencia de interferencia con el espécimen de análisis, estabilidad, facilidad y velocidad de detección. Las enzimas utilizadas con mayor frecuencia por reunir los requisitos mencionados son: peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, B-D-Galactosidasa, Glucosa-oxidasa, Gluco-amilasa, Anhidrasa

carbónica, Acetilcolinesterasa, catalasa, Lisozima, Malato-deshidrogenasa, Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, Fosfolipasa C y β -D-Galactosidasa.

B.1. EIA heterogéneo.

El principio básico de éstos métodos es similar al de RIA, excepto en que se mide actividad enzimática en lugar de radiactividad. Los principales métodos de separación de los reactivos libres y combinados que se basan en el uso de un soporte de fase sólida al que se adosa el antígeno o anticuerpo, los cuales se unen covalentemente a material particulado como celulosa o poliacrilamida, y a tubos, discos y microplacas de nylon, poliestireno, polivinilo o polipropileno, así como perlas de agarosa, poliacrilamida o magnéticas.

Existe un gran número de variantes de EIA, de las cuales solamente se describen brevemente a continuación las más usuales, clasificados en "competitivos" y "no competitivos".

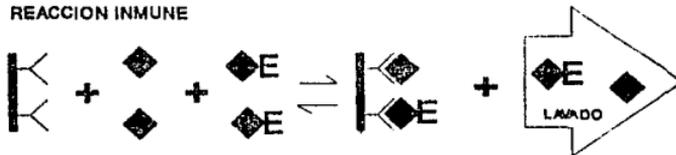
EIA competitivos:

B.1.1. EIA con conjugado antígeno-Enzima para detectar antígeno (hapteno).

Durante la reacción inmune, el antígeno (Ag) de la muestra y el Ag marcado, compiten por los sitios de unión de una cantidad limitada del anticuerpo (Ac) específico unido a una fase sólida; a través de un paso esencial de lavado se eliminan las fases no unidas, en la etapa subsecuente se adiciona el sustrato de la enzima y el cromógeno para formar finalmente un compuesto colorido medible fotométricamente. La concentración de Ag por

determinar será inversamente proporcional a la actividad enzimática. A continuación se muestra esquemáticamente la reacción que se lleva a cabo, así como la grafica que se obtiene:

REACCION INMUNE



REACCION REVELADORA



ACTIVIDAD ENZIMATICA



FIG.1: EIA con conjugado Antígeno-Enzima para Ag

- ◆ ANTIGENO DE MUESTRA
- ◆E ANTIGENO MARCADO CON ENZIMA
- K ANTICUERPO ESPECIFICO INMOVILIZADO

B.1.2. Ensayo inmunoenzimométrico de doble anticuerpo para detectar antígeno. (14)

En esta variante de EIA el Ag conocido se encuentra unido a una fase sólida; se adiciona un exceso de Ac que reacciona de acuerdo a la concentración, con el Ag libre de la muestra y con el de fase sólida (en el caso del estándar, éste reaccionará solamente con el Ag fijo en fase sólida). Previo paso de lavado se adiciona un segundo Ac (marcado con enzima) directamente contra el primero, formándose así complejos "sandwich" que serán detectados

después de adicionar el sustrato y cromógeno adecuados. La concentración de Ag es inversamente proporcional a la intensidad de color del compuesto formado.

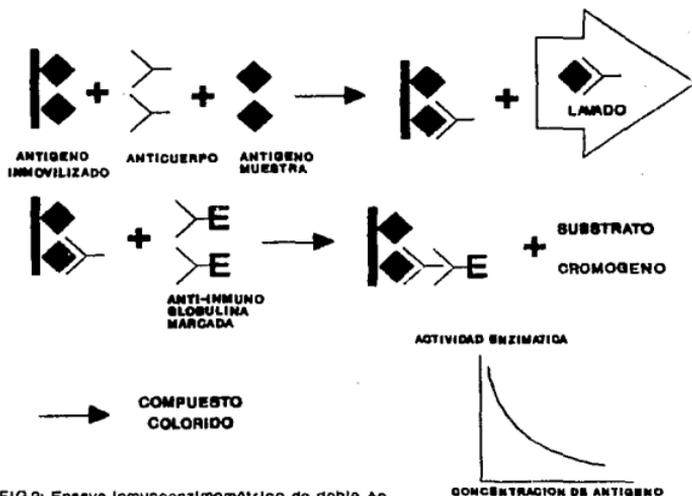


FIG.2: Ensayo Inmunoenzimométrico de doble Ac

B.1.3. Doble anticuerpo en fase líquida (DALP).

El principio de competencia por el Ac soluble, tiene lugar durante la primera inmunoreacción entre el Ag de la muestra y el Ag marcado; los complejos antígeno-anticuerpo antes formados, se adicionan a un segundo anticuerpo unido a fase sólida y dirigido contra el primero. Un paso posterior de separación unido/libre, elimina todos los componentes en fase líquida que no reaccionaron, después de lo cual se adiciona el sustrato y el cromógeno para finalmente medir fotométricamente la intensidad

del color desarrollado. La intensidad de dicho color, es inversamente proporcional a la concentración de Ag en la muestra.

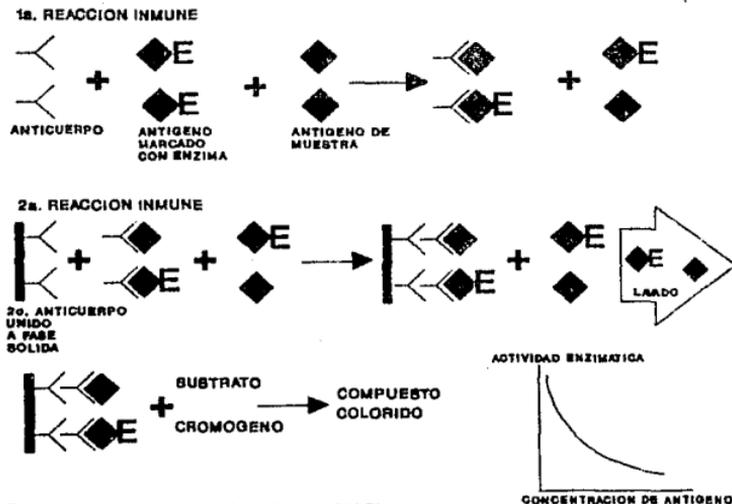


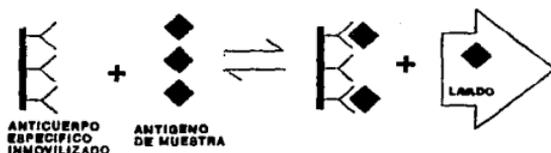
FIG.3: Doble anticuerpo en fase líquida (DALP)

B.1.4. Principio de titulación, saturación secuencial o principio de competencia modificado.

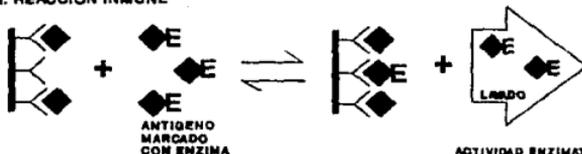
Este procedimiento se basa en una reacción inmune de dos pasos, con lo cual se consigue un incremento de la sensibilidad. En la primera reacción inmune, el Ag de la muestra reacciona con el Ac en fase sólida; en la segunda reacción los sitios libres del Ac en fase sólida son saturados por el Ag marcado. Después del lavado se adiciona el sustrato y el cromógeno: la intensidad de la señal es inversamente proporcional a la concentración de Ag. En la figura No.4 se muestra la reacción que se lleva a cabo y la

gráfica obtenida.

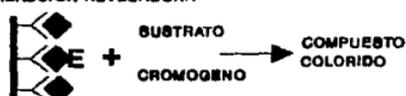
1a. REACCION INMUNE



2a. REACCION INMUNE



REACCION REVELADORA



ACTIVIDAD ENZIMATICA



FIG.4: Principio de saturación secuencial

EIA no competitivo (ensayo "sandwich").

Un requisito para todos los ensayos "sandwich" es que el Ag tenga al menos dos sitios de unión para el Ac suficientemente alejados para que no ocurra impedimento estérico.

B.1.5. Análisis inmunoenzimométrico de dos lugares (ensayo "sandwich" para antígeno).

El primer Ac se encuentra unido en exceso a una fase sólida; en el primer paso el Ag que se investiga reacciona con el Ac, formando complejos Ag-Ac. En la reacción subsecuente, un segundo Ac marcado con enzima reacciona con el Ag unido para dar un

complejo "sandwich" . Después de adicionar el sustrato y el cromógeno se mide espectrofotométricamente el compuesto colorido formado. La intensidad de la señal es directamente proporcional a la concentración de antígeno.

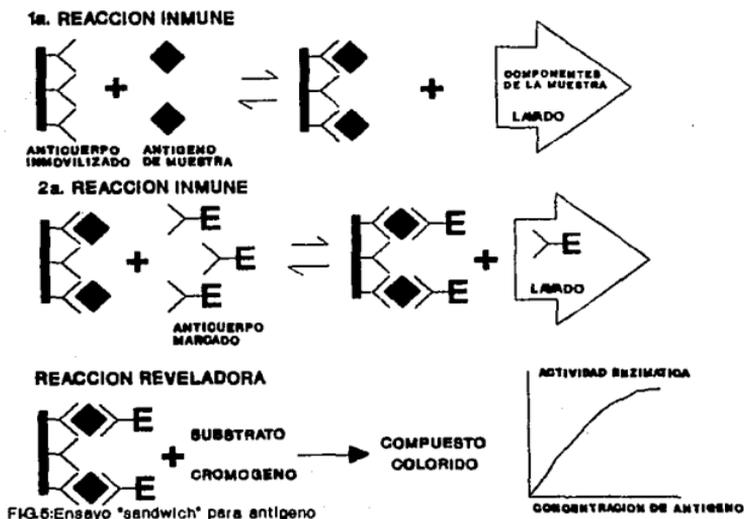


FIG.5:Ensayo "sandwich" para antígeno

B.1.6. Inmunoanálisis indirecto para la detección de anticuerpo.

El antígeno se encuentra unido a la fase sólida; la reacción del Ac presente de la muestra se une al Ag de fase sólida, esta reacción antígeno/anticuerpo es medida a través de un segundo Ac, ésta vez marcado, que reacciona directamente contra el primero. La respuesta fotométrica es medida después de agregar el sustrato y cromógeno, y es directamente proporcional a la concentración de

Ac en la muestra.

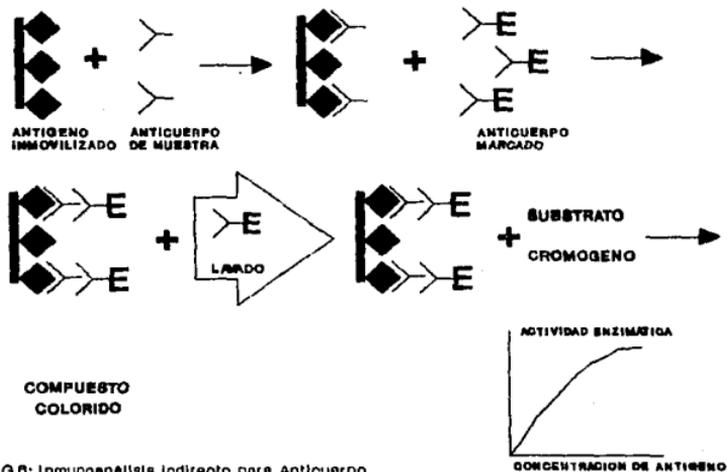


FIG.6: Inmunoanálisis indirecto para Anticuerpo

II. PARTE EXPERIMENTAL

I. MATERIAL Y EQUIPO

(a) Material y equipo de laboratorio

Pipetas automáticas de 10, 20, 100, 200, 500 y 1000 μ l, puntas para pipeta desechables, tubos de ensayo de 13x100, probetas de 100ml, pipetas serológicas de diversos volúmenes, frasco dosificador de volumen variable, bomba de succión, espectrofotómetro y sistema automatizado ES-22 de Boehringer Mannheim.

(b) Material biológico. (Especímenes de muestra)

- 58 muestras de suero provenientes de mujeres embarazadas entre las semanas 12 y 30 de gestación, incluyendo siete sueros control (como parte del programa de control de calidad United Kingdom External Quality Assessment Schemes) y uno proveniente de una mujer portadora de feto con defecto de cierre de tubo neural.

- 52 muestras de líquido amniótico de mujeres entre las semanas 15 y 21 de gestación, incluyendo 2 muestras provenientes de una mujer portadora de feto con defecto de cierre de tubo neural.

Los especímenes fueron proporcionados en forma ciega y retrospectiva como se explica en la parte de validación de este capítulo; cabe mencionar que la literatura recomienda realizar el

análisis de AFP tanto en suero materno como en líquido amniótico preferentemente entre las semanas 15 y 18 de gestación, sin embargo debido a que las muestras se proporcionaron en forma ciega no fue posible controlar esta variable.

Las muestras se mantuvieron congeladas a -4°C durante períodos de tiempo variables desde cero días (especímenes frescos) hasta uno y dos años antes de su análisis.

(c) Reactivos y material de control de calidad

- * Suero control para inmunoensayos Precipath IM (Boehringer Mannheim).- suero humano liofilizado, concentración conocida de AFP. Valor asignado para AFP: **50.8 UI/ml** (40.4 a 61.6 UI/ml).
- * Solución de lavado.-solución salina fisiológica (0.85g/dl) diluida 1:100
- * Diluyente para alfa-fetoproteína (Boehringer Mannheim) suero humano prácticamente libre de alfa-fetoproteína (AFP), utilizado sólo para diluir muestras de suero materno de concentración elevada y de líquido amniótico.
- * Estuche comercial para la determinación de AFP en suero, plasma y líquido amniótico (Enzymun-test AFP de Boehringer Mannheim), que consta de los siguientes reactivos:
 - 1.- Amortiguador de incubación.- amortiguador de fosfatos, 40 mmol/l a pH 6.
 - 2.- Amortiguador de conjugado.- amortiguador de fosfatos, 40 mmol/l a pH 7.2.
 - 3.- Conjugado anticuerpos-POD.- anticuerpos

- policlonales anti-AFP marcados con peroxidasa a una actividad de aproximadamente 1.3 U/ml.
- 4.- Estándares "a" al "e".- suero humano conteniendo AFP en diferentes concentraciones : 1.6, 2.7, 26.7, 69 y 140 UI/ml.
 - 5.- Solución sustrato/amortiguador.- amortiguador de fosfato y citrato (100 mmol/l, pH 4.4) y perborato sódico (3.2 mmol/l).
 - 6.- Cromógeno.- 2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina ácido sulfónico-(6)]-sal diamónica (ABTS). 1.9 mmol/l.
 - 7.- Tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos policlonales anti-AFP (de oveja), con una capacidad de fijación de aproximadamente 30 UI de AFP/tubo.
 - 8.- Solución 2a.- solución de conjugado-anticuerpos-POD, preparada con una parte de conjugado anticuerpos-POD y cien partes de amortiguador de conjugado (v/v).
 - 9.- Solución 6a.- el contenido del frasco 6 se vierte en la solución sustrato/amortiguador y se protege de la luz.

11. METODOLOGIA

(a) Fundamento de la prueba

La determinación se basa en el principio de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) por la técnica de "sandwich", en la cual el antígeno presente en la muestra se une durante la primera incubación al anticuerpo adsorbido en la pared del tubo; posteriormente, un anticuerpo policlonal anti-AFP marcado con peroxidasa (POD) se liga al antígeno ya unido al primer anticuerpo, formándose así los complejos "sandwich"; en la tercera incubación se lleva a cabo una reacción enzima-substrato en la que se produce un compuesto colorido medible fotométricamente a 405 nm. cuya intensidad es proporcional a la concentración de AFP contenida en la muestra. (18,55)

(b) Procedimiento del ensayo

La cuantificación de alfa-fetoproteína se realizó por duplicado en todas las muestras de suero materno (SM) y líquido amniótico (LA) proporcionadas, prediluyendo el líquido amniótico 1:100 con diluyente para AFP debido a que se esperaban concentraciones superiores al límite máximo medible indicado por el fabricante (150 UI/ml). Las determinaciones se realizaron siguiendo las especificaciones del inserto del equipo de reactivos y elaborando una curva de calibración por duplicado en cada ensayo, e incluyendo el suero control Precipath IM. (Boehringer Mannheim).

Se utilizó el método manual, en el que, como su nombre indica, todos los pasos del procedimiento se realizan manualmente; en el caso de algunas muestras de SM, se utilizó el método automatizado (sistema automatizado ES-22 de BM), en el cual solamente se lleva a cabo manualmente la dosificación de la muestra en el tubo de reacción; los pasos sucesivos de dosificación de reactivos, succión, lavado, control de tiempo de incubación y lectura, son realizados automáticamente por el equipo. Esto se efectuó con el fin de agilizar el procedimiento, aumentar la precisión y con base en que no se esperaban diferencias significativas en los resultados obtenidos por uno y otro métodos.

En ambos casos, los pasos seguidos son fundamentalmente los mismos y consisten de:

Primera incubación: depositar en los tubos de plástico del estuche, 200 μ l de muestra de suero materno sin diluir o de líquido amniótico diluido 1:100, así como 1000 μ l de amortiguador de incubación. Incubar una hora a temperatura ambiente. Succionar el contenido de los tubos y lavar una vez con aproximadamente 2 ml de solución de lavado.

Segunda incubación: depositar 1000 μ l de la solución conteniendo el conjugado en cada tubo. Incubar una hora a temperatura ambiente. Succionar el contenido de los tubos y lavar una vez con aproximadamente 2 ml de solución de lavado.

Tercera incubación: depositar 1000 μ l de solución de sustrato/cromógeno en cada tubo. Incubar una hora a temperatura ambiente protegiendo de la luz.

Lectura: leer a 405 nm contra blanco de reactivo (solución sustrato-cromógeno) tanto la curva como los problemas.

Las porciones no unidas y los componentes del suero, plasma o líquido amniótico, se eliminan mediante los lavados entre cada incubación, y la evaluación del contenido de AFP en las muestras, se efectúa a través de interpolación de las extinciones correspondientes medidas frente a blanco de reactivo, en la curva de calibración elaborada en cada ensayo.

(c) Determinación de la dilución adecuada para líquido amniótico (LA).

Previo al análisis de AFP en los especímenes de LA, se procedió a determinar la dilución adecuada para éstos, ya que la concentración esperada era superior a 150 UI/ml (límite superior de detección del estuche comercial). Para ello se seleccionaron al azar tres LA, cada uno de los cuales se diluyó 1:50, 1:100, 1:500 y 1:1000 con líquido diluyente para AFP; posteriormente se analizaron tanto las diluciones como los concentrados. Finalmente se determinó que la dilución conveniente para obtener resultados adecuados con los reactivos utilizados es 1:100.

(d) Determinación de AFP en suero materno (SM) y líquido amniótico (LA).

- En este estudio se analizó la concentración de AFP en todas las muestras de SM y de LA proporcionadas (el LA diluido 1:100 con diluyente para AFP), con el objeto de determinar si la concentración de la proteína en estudio era la adecuada para la semana de gestación en la cual se obtuvo la muestra. De las

muestras de SM. algunas se analizaron por método manual y otras por método automatizado.

(e) Validación

Se realizó un estudio observacional, transversal, retrospectivo y ciego, de todas las muestras disponibles de suero materno y líquido amniótico.(43,44)

Observacional.- es aquel en el que se observa un fenómeno sin modificar intencionalmente sus variables.

Transversal.- es aquel en el que se examinan las características de un grupo en un momento dado y durante un tiempo limitado.

Retrospectivo.- es aquel que se basa en la revisión de expedientes, cédulas de pacientes o individuos que han sido previamente estudiados sin que se hayan precisado las condiciones del estudio.

Ciego.- es aquel en el que el investigador desconoce las condiciones principales que pueden modificar las características del estudio.

Conjuntamente al análisis de las muestras, se decidió medir una serie de parámetros estadísticos que sirvieron como base para la evaluación del estudio, dichos parámetros se describen a continuación.

A) Perfil de precisión.

Una vez que se hubo determinado por duplicado la concentraci

de AFP en todas las muestras, se procedió a calcular la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%CV) de los duplicados, después de lo cual se graficó el %CV de cada una contra la concentración respectiva. Cabe aclarar que en el caso de algunas muestras de suero materno, el volumen disponible estaba limitado, por lo cual no se realizó la determinación por duplicado y consecuentemente no fue posible el cálculo de %CV; dichas muestras no se consideran en el perfil de precisión. Por último, se elaboró el perfil de precisión para LA y para SM por separado, con el fin de conocer la zona de concentración en la cual existen mayores variaciones, evaluadas éstas a través del porcentaje del coeficiente de variación.(4,13,14,15,16,22,45,54)

B) Precisión intraensayo.

Se analizó treinta veces el suero control Precipath IM dentro de la misma serie, es decir dentro del mismo ensayo, después de lo cual se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación en dicha serie; un coeficiente de variación (%CV) menor del 10% se considera aceptable.(3,4,14,15,16,45,54)(* ver pag.44)

C) Precisión interensayo.

Se determinó a través del análisis doble de tres líquidos amnióticos de concentraciones alta, baja e intermedia durante cinco días consecutivos; posteriormente se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación de los resultados obtenidos para cada muestra en el período de tiempo establecido; la variación interensayo se evalúa con base en el coeficiente de variación calculado utilizando el mismo criterio que para conocer

la variación intraensayo. (3.4.14,15,16.45,54). (* ver pag.44)

D) Variación entre diluciones.

Se determinó por duplicado la concentración de AFP en tres diluciones 1:100 de tres líquidos amnióticos con concentraciones alta, baja e intermedia, preparadas en diferentes momentos, con el objeto de conocer la variación debida a la dilución previa del líquido amniótico mediante el coeficiente de variación. (* ver pag.44)

E) Linearidad.

A partir de un líquido amniótico diluido 1:100 (el cual se consideró como 100% por ser ésta la dilución seleccionada a la que se analizaron todas las muestras de líquido amniótico), se prepararon diluciones al 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 %, a las que se realizó la determinación por duplicado. Los resultados de concentración obtenidos se graficaron contra el porcentaje de dilución correspondiente, para obtener el gráfico de linearidad incluido en la parte de resultados. (* ver pag.44)

F) Curvas patrón promedio.

En cada uno de los ensayos realizados, se elaboró por duplicado la curva patrón correspondiente. Posteriormente se calculó el promedio para cada uno de los puntos de la curva en todos los ensayos realizados en el curso del experimento, con el fin de conocer si el hecho de haber utilizado dos lotes diferentes de reactivos (ya que no fue posible disponer de la cantidad de reactivos de un mismo lote, suficiente para realizar

en su totalidad el estudio), pudo tener alguna influencia sobre los resultados obtenidos de las muestras desconocidas.

* No fue posible efectuar el estudio con muestras de suero materno debido al pequeño volumen de muestra disponible.

111) RESULTADOS

a) Determinación de AFP en suero materno.

Se determinó por duplicado la concentración de alfa-feto-proteína en todas las muestras de suero materno de las cuales se tenía suficiente volumen de muestra, las restantes se evaluaron por análisis sencillo.

Debido a que no se esperaba diferencia significativa en los resultados obtenidos por los métodos manual (descrito en el capítulo de material y métodos) y automatizado (sistema automatizado ES-22 de Boehringer), las muestras se analizaron por uno y otro indistintamente. En la siguiente tabla se señalan los resultados obtenidos por ambos.

Los resultados comparativos entre éstos, se observan en la tabla No. 4.

TABLA 1. AFP EN MUESTRAS DE SUERO MATERNO.

No. MUESTRA	UI/ml		SEM. GEST.	MOM	
	MANUAL	AUTOMAT.		MANUAL	AUTOMAT.
1	37.5	-	16	1.8	-
2	45.0	-	18	1.7	-
3	28.9	31.9	15	1.7	1.9
4	86.1	61.2	23	-	-
5	63.9	62.8	19	2.2	2.2
6	28.5	21.4	16	1.3	1.0
7	24.7	24.6	16	1.2	1.2
8	77.6	88.0	24	-	-
9	67.7	58.9	16	3.2	2.8
10	64.2	60.6	14	3.6	3.4
11	36.3	29.2	15	2.2	1.8
12	21.8	20.5	15	1.3	1.2
13	87.5	84.2	25	-	-
14	28.2	28.1	17	1.2	1.2
15	21.4	25.6	16	1.0	1.2
16	29.8	27.2	18	1.2	1.1
17	25.6	21.1	16	1.2	1.0
18	-	97.9	cb	-	-
19	28.9	30.3	16	1.4	1.4
20	-	27.2	15	-	1.6
21	61.2	57.6	18	2.4	2.2
22	-	148.1	31	-	-
23	27.8	23.3	16	1.3	1.1
24	#	>154.4	22	-	-
25	16.1	16.0	16	0.8	0.8
26	-	76.2	20	-	2.1
27	-	140.7	19	-	4.9
28	-	49.0	14	-	2.8
29	34.8	34.7	16	1.6	1.6
30	-	154.0	cb	-	-

Continuación TABLA 1. AFP EN MUESTRAS DE SUERO MATERNO.

No. MUESTRA	UI/ml		SEM. GEST.	MDM	
	MANUAL	AUTOMAT.		MANUAL	AUTOMAT
31	-	16.0	cb	-	-
32	130.9	140.4	24	-	-
33	75.5	64.9	19	2.6	2.3
34	-	19.7	16	-	0.9
35	-	68.7	19	-	2.4
36	-	41.3	17	-	1.8
37	-	41.5	17	-	1.8
38	-	56.9	18	-	2.2
39	54.9	60.2	16	2.6	2.8
40	-	6.3	14	-	0.4
41	-	54.9	22	-	-
42	-	46.3	19	-	1.6
43	-	64.5	17	-	2.7
44	-	12.2	15	-	0.7
45	-	25.2	12	-	-
46	37.8	33.3	18	1.5	1.3
47	36.7	33.8	18	1.4	1.3
48	34.9	-	17	-	1.5
49	23.8	-	14	-	1.4
50	>154.0	-	cb	-	-
51	30.9	-	17	-	1.3
52	37.2	-	22	-	-
53	131.3	-	cb	-	-
54	116.5	-	cb	-	-
55	112.6	-	cb	-	-
56	30.4	-	17	-	1.3

* Muestra de concentración elevada, no fue posible leerla en la curva.

cb Muestra de suero control externo.

En la tabla se indica el número de muestra, la concentración correspondiente de AFP en UI/ml determinada por los dos métodos (manual y automatizado) y la semana de gestación a la cual se obtuvo la muestra de suero, calculada con la fecha de última menstruación o por ultrasonido.

Por último se indica el múltiplo de la mediana (MDM) que se calcula dividiendo la concentración de AFP en la muestra, entre el valor de la mediana para la semana gestacional apropiada (9,10,26) reportada en el inserto del estuche de reactivos, la cual se determina a través del análisis de AFP en muestras de suero de mujeres embarazadas con una N>50 para cada semana. Por ejemplo:

Muestra No. 1

Concentración de AFP experimental: 37.5 UI/ml

Semana de gestación: 16

Mediana reportada para la semana de gestación correspondiente:

21.3 UI/ml

MDM = $37.5/21.3 = 1.8$

Para fines de interpretación, se consideran como normales aquellos valores de AFP en suero materno que no sobrepasan 2.5 veces la mediana para la población en estudio. Por ésta razón es necesario establecer los múltiplos de la mediana (MOM) para cada laboratorio que realice la prueba, ya que las características varían de una población a otra. Sin embargo, en este caso, se utilizaron las tablas reportadas debido a que no se dispone de datos establecidos para población mexicana.

b) Perfil de precisión. Suero materno.

Para construir el perfil de precisión, se calculó la media (\bar{X}), la desviación estándar considerando que n es menor que 10 (DS_m) y el porcentaje del coeficiente de variación (% CV), para las muestras cuyo análisis fue posible realizar por duplicado, el guión indica que la muestra correspondiente no se analizó por duplicado. (tablas 2 y 3).

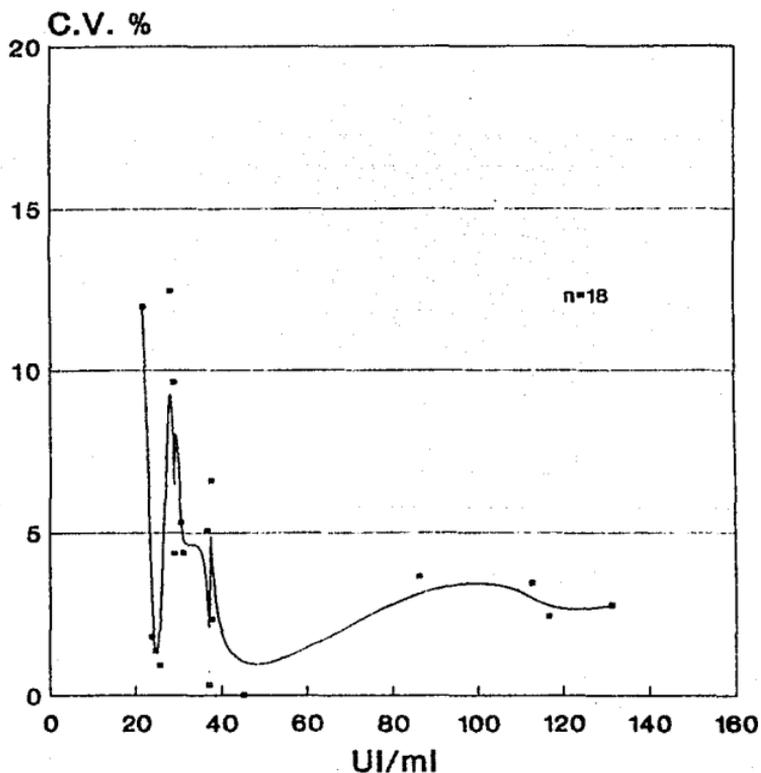
El perfil de precisión se construye graficando el %CV calculado para cada muestra, contra la concentración correspondiente, como se indica en las gráficas No.1 y 2.

TABLA 2. PERFIL DE PRECISION PARA MUESTRAS DE SUERO ANALIZADAS POR METODO MANUAL.

No MUESTRA	UI/ml		X	DS(n)	%CV
1	35.0	40.0	37.5	2.50	6.60
2	45.0	45.0	45.0	0.00	0.00
3	26.1	31.6	28.9	2.78	9.64
4	83.0	89.3	86.1	3.15	3.66
5	63.9	-	-	-	-
6	28.5	-	-	-	-
7	24.4	25.0	24.7	0.34	1.36
8	77.6	-	-	-	-
9	67.7	-	-	-	-
10	64.2	-	-	-	-
11	36.3	-	-	-	-
12	24.4	19.2	21.8	2.62	11.96
13	87.5	-	-	-	-
14	31.7	24.6	28.2	3.51	12.44
15	21.4	-	-	-	-
16	29.8	-	-	-	-
17	25.9	25.4	25.6	0.23	0.90
19	27.6	30.2	28.9	1.26	4.36
21	61.2	-	-	-	-
23	27.8	-	-	-	-
24	*	-	-	-	-
25	16.1	-	-	-	-
29	34.8	-	-	-	-
32	130.9	-	-	-	-
33	75.5	-	-	-	-
39	54.9	-	-	-	-
46	38.7	36.9	37.8	0.89	2.34
47	34.8	38.6	36.7	1.86	5.07
48	34.9	-	-	-	-
49	24.2	23.4	23.8	0.43	1.79
50	>154.0	-	-	-	-
51	29.6	32.3	30.9	1.36	4.38
52	37.4	37.1	37.2	0.12	0.31
53	127.7	134.9	131.3	3.64	2.77
54	119.3	113.6	116.5	2.83	2.43
55	108.7	116.4	112.6	3.88	3.45
56	32.1	28.8	30.4	1.62	5.31

* Muestra de concentración elevada, no fue posible interpolar en la curva

PERFIL DE PRECISION PARA SUEROS ANALIZADOS POR METODO MANUAL

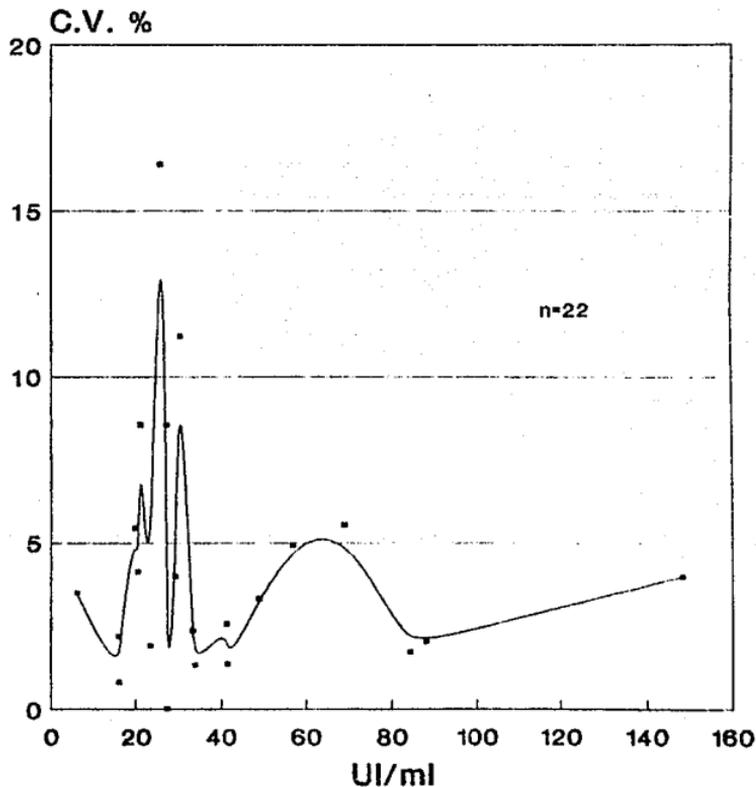


Gráfica No. 1

TABLA 3. PERFIL DE PRECISION PARA MUESTRAS DE SUERO ANALIZADAS POR METODO AUTOMATIZADO.

No MUESTRA	UI/ml		X	DS(n)	%CV
3	31.9	-	-	-	-
4	61.2	-	-	-	-
5	62.8	-	-	-	-
6	21.4	-	-	-	-
7	24.6	-	-	-	-
8	86.2	89.8	88.0	1.79	2.03
9	58.9	-	-	-	-
10	60.6	-	-	-	-
11	28.0	30.4	29.2	1.17	3.99
12	21.3	19.6	20.5	0.85	4.13
13	82.8	85.6	84.2	1.44	1.71
14	28.1	-	-	-	-
15	29.8	21.4	25.6	4.20	16.39
16	22.8	31.7	27.2	4.45	16.33
17	22.9	19.3	21.1	1.80	8.54
18	97.9	-	-	-	-
19	33.7	26.9	30.3	3.39	11.21
20	27.2	27.2	27.2	0.00	0.00
21	57.6	-	-	-	-
22	142.2	154.0	148.1	5.92	3.99
23	22.9	23.8	23.3	0.45	1.91
24	>154.0	>154.0	-	-	-
25	15.7	16.4	16.0	0.35	2.19
26	76.2	-	-	-	-
27	140.7	-	-	-	-
28	50.6	47.4	49.0	1.63	3.32
29	34.7	-	-	-	-
30	>154.0	-	-	-	-
31	16.1	15.9	16.0	0.13	0.81
32	140.4	-	-	-	-
33	64.9	-	-	-	-
34	20.8	18.6	19.7	1.07	5.43
35	65.0	72.5	68.7	3.73	5.43
36	40.2	42.4	41.3	1.06	2.56
37	40.9	42.1	41.5	0.56	1.35
38	54.1	59.7	56.9	2.79	4.91
39	60.2	-	-	-	-
40	6.5	6.1	6.3	0.22	3.51
41	54.9	-	-	-	-
42	46.3	-	-	-	-
43	64.5	-	-	-	-
44	12.2	-	-	-	-
45	25.2	-	-	-	-
46	32.6	34.1	33.3	0.79	2.35
47	34.2	33.3	33.8	0.45	1.33

PERFIL DE PRECISION PARA SUEROS ANALIZADOS POR METODO AUTOMATIZADO



Gráfica No. 2

Con el fin de comparar los resultados obtenidos de manera manual y automatizada, se decidió correlacionar estos dos métodos, y como puede observarse en la gráfica 3, la r obtenida es igual a 0.94. De la misma manera, en la tabla se indica el coeficiente de variación para cada muestra analizada por uno y otro métodos.

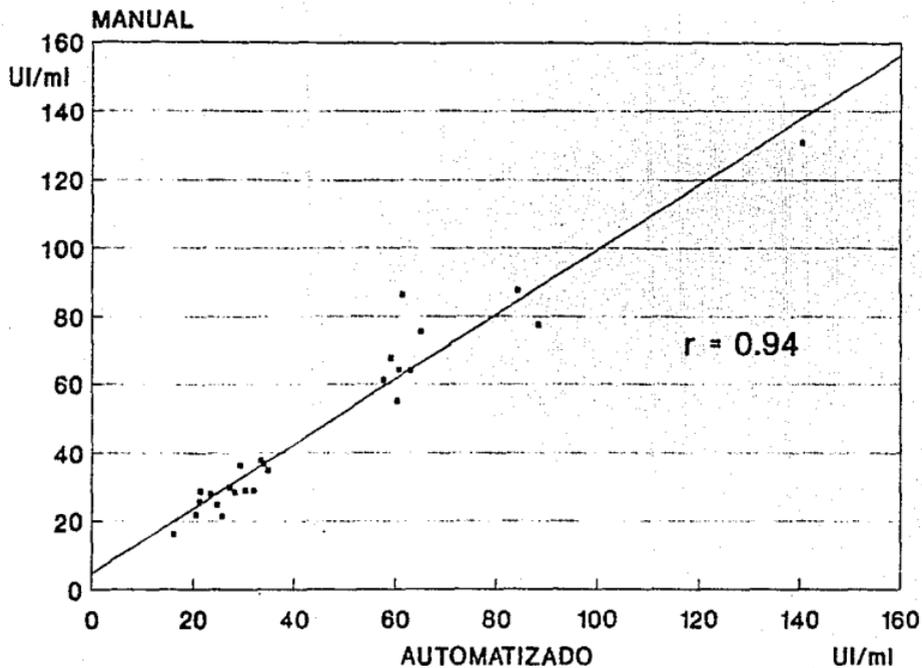
TABLA 4. COMPARACION ENTRE METODOS MANUAL Y AUTOMATIZADO PARA EL ANALISIS DE AFP EN SUERO.

METODO	MANUAL	AUTOMATIZADO	X	DS(n)	%CV
No MUESTRA	UI/ml	UI/ml			
1	37.5	-	-	-	-
2	45.0	-	-	-	-
3	28.9	31.9	30.4	1.52	5.01
4	86.1	61.2	73.7	12.44	16.88
5	63.9	62.8	63.4	0.56	0.88
6	28.5	21.4	25.9	3.53	14.14
7	24.7	24.6	24.6	0.08	0.33
8	77.6	88.0	82.8	5.18	6.26
9	67.7	58.9	63.3	4.36	6.89
10	64.2	60.6	62.4	1.79	2.86
11	36.3	29.2	32.7	3.54	10.82
12	21.8	20.5	21.3	0.85	3.96
13	87.5	84.2	85.9	1.67	1.95
14	28.2	28.1	28.2	0.03	0.11
15	21.4	25.6	23.5	2.10	8.93
16	29.8	27.2	28.5	1.28	4.49
17	25.6	21.1	23.4	2.28	9.76
18	-	97.9	-	-	-
19	28.9	30.3	29.6	0.69	2.32
20	-	27.2	-	-	-
21	61.2	57.6	59.4	1.77	2.98
22	-	148.1	-	-	-
23	27.8	23.3	25.5	2.22	8.7
24	*	>154.0	-	-	-
25	16.1	16.0	16.1	0.04	0.22
26	-	76.2	-	-	-
27	-	140.7	-	-	-
28	-	49.0	-	-	-
29	34.8	34.7	34.7	0.04	1.12
30	-	154.0	-	-	-

Continuación TABLA 4.

METODO	MANUAL	AUTOMATIZADO	X	DS(n)	%CV
Nº MUESTRA	UI/ml	UI/ml			
31	-	16.0	-	-	-
32	130.9	140.4	135.6	4.72	3.48
33	75.5	64.9	70.2	5.32	7.58
34	-	19.7	-	-	-
35	-	68.7	-	-	-
36	-	41.3	-	-	-
37	-	41.5	-	-	-
38	-	56.9	-	-	-
39	54.9	60.2	57.6	2.61	4.53
40	-	6.3	-	-	-
41	-	54.9	-	-	-
42	-	46.3	-	-	-
43	-	64.5	-	-	-
44	-	12.2	-	-	-
45	-	25.2	-	-	-
46	37.8	33.3	35.6	2.25	6.32
47	36.7	33.8	35.2	1.45	4.12
48	34.9	-	-	-	-
59	23.8	-	-	-	-
50	>154.0	-	-	-	-
51	30.9	-	-	-	-
52	37.2	-	-	-	-
53	131.3	-	-	-	-
54	116.5	-	-	-	-
55	112.6	-	-	-	-
56	30.4	-	-	-	-

CORRELACION MANUAL-AUTOMATIZADO



Gráfica No.3

b) Determinación de AFP en líquido amniótico.

Se analizaron todas las muestras de líquido amniótico proporcionadas, por duplicado y previamente diluidas en proporción de 1:100 con líquido diluyente. En la tabla 5, se indica en este orden, el número de muestra, el valor promedio de la concentración en los duplicados (X) expresada como UI/ml $\times 10^3$; la semana de gestación a la cual se obtuvo la muestra de líquido amniótico, calculada con la fecha de última menstruación o por ultrasonido; y el múltiplo de la mediana para la semana gestacional apropiada (3.11), calculada con respecto a la reportada en el inserto del estuche de reactivos de la misma que para suero materno.

TABLA 5. AFP EN MUESTRAS DE LIQUIDO AMNIOTICO.

No. MUESTRA	UI/ml $\times 10^3$	SEM. GEST	MOM	No. MUESTRA	UI/ml $\times 10^3$	SEM. GEST	MOM
1	118.5	17	0.56	27	56.2	19	0.73
2	127.0	17	0.60	28	111.0	21	
3	57.5	18	0.66	29	59.5	19	0.77
4	76.0	18	0.87	30	99.5	16	0.77
5	54.4	19	0.71	31	98.0	16	0.77
6	50.0	19	0.65	32	72.5	17	0.34
7	70.5	18	0.81	33	61.5	17	0.29
8	95.0	17	0.45	34	63.5	17	0.30
9	79.5	17	0.38	35	98.5	16	0.77
10	42.0	20	0.90	36	57.0	20	1.16
11	76.5	17	0.36	37	76.5	17	0.36
12	80.0	16	0.63	38	43.5	20	0.89
13	78.0	16	0.61	39	55.5	20	1.13
14	68.0	16	0.53	40	67.0	21	
15	140.0	16	1.10	41	153.0	16	1.19
16	104.0	17	0.49	42	79.0	17	0.37
17	105.0	16	0.82	43	106.2	16	0.83
18	112.0	16	0.86	44	114.6	16	0.89
19	119.0	16	0.93	45	112.5	21	
20	105.5	18	1.20	46	142.1	16	1.11
21	121.0	16	0.94	47	60.2	19	0.79
22	106.5	18	1.22	48	140.5	16	1.16
23	141.5	15	0.92	49	55.0	19	0.74
24	73.5	18	0.84	50	50.7	19	0.67
25	101.0	17	0.48	51	109.7	16	0.86
26	97.0	17	0.46	52	71.6	17	0.34

c) Perfil de precisión. Líquido amniótico.

Para construir el perfil de precisión, se calculó la media (\bar{X}) de las determinaciones por duplicado, la desviación estándar calculada para una "n" menor que 10 (DS_m) y el porcentaje del coeficiente de variación ($\%CV$). El perfil de precisión se contruyó graficando $\%CV$ contra la concentración promedio de las diluciones, como se observa en la grafica No.4.

En la tabla ó observamos, el número de muestra, la concentración de AFP $\times 10^3$ en UI/ml determinada en los duplicados y la media de dichos duplicados también en UI/ml $\times 10^3$.

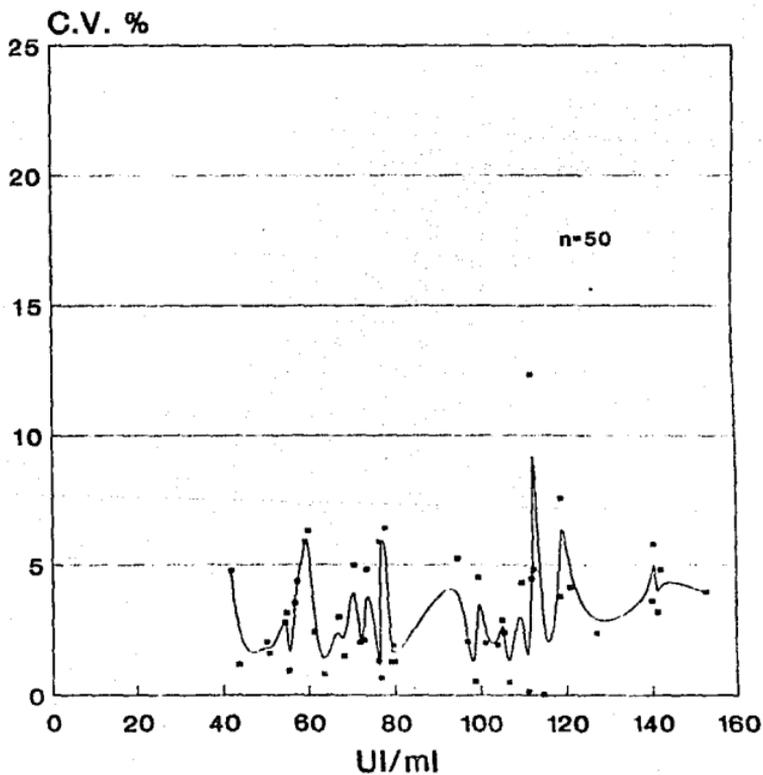
TABLA 6. PERFIL DE PRECISION PARA MUESTRAS DE LIQUIDO AMNIOTICO.

No. MUESTRA	UI/ml $\times 10^3$		\bar{X} ($\times 10^3$)	DS (n)	%CV
1	114.0	123.0	118.5	4.50	3.79
2	124.0	130.0	127.0	3.00	2.36
3	60.0	55.0	57.5	2.50	4.35
4	77.0	75.0	76.0	1.00	1.32
5	56.0	53.0	54.5	1.50	2.76
6	49.0	51.0	50.0	1.00	2.00
7	67.0	74.0	70.5	3.50	4.96
8	90.0	100.0	95.0	5.00	5.26
9	81.0	78.0	79.5	1.50	1.88
10	44.0	40.0	42.0	2.00	4.76
11	76.0	77.0	76.5	0.50	0.65
12	79.0	81.0	80.0	1.00	1.25
13	73.0	83.0	78.0	5.00	6.40
14	69.0	67.0	68.0	1.00	1.47
15	135.0	145.0	140.0	5.00	3.60
16	106.0	102.0	104.0	2.00	1.92
17	108.0	102.0	105.0	3.00	2.86
18	107.0	117.0	112.0	5.00	4.46
19	110.0	128.0	119.0	9.00	7.56
20	108.0	103.0	105.5	2.50	2.37
21	116.0	126.0	121.0	5.00	4.13
22	106.0	107.0	106.5	0.50	0.47
23	137.0	146.0	141.5	4.50	3.18
24	77.0	70.0	73.5	3.50	4.80
25	99.0	103.0	101.0	2.00	1.98
26	95.0	99.0	97.0	2.00	2.06
27	56.2	-	-	-	-
28	111.1	110.8	111.0	0.15	0.14
29	63.0	56.0	59.5	3.50	5.88
30	95.0	104.0	99.5	4.50	4.50

Continuación TABLA 6.

Nº. MUESTRA	UI/ml $\times 10^9$		X ($\times 10^3$)	DS (m)	%CV
31	98.0	-	-	-	-
32	74.0	71.0	72.5	1.50	2.07
33	60.0	63.0	61.5	1.50	2.40
34	63.0	64.0	63.5	0.50	0.79
35	98.0	99.0	98.5	0.50	0.51
36	59.0	55.0	57.0	2.00	3.50
37	72.0	81.0	76.5	4.50	5.88
38	43.0	44.0	43.5	0.50	1.15
39	56.0	55.0	55.5	0.50	0.90
40	65.0	69.0	67.0	2.00	2.98
41	147.0	159.0	153.0	6.00	3.92
42	80.0	78.0	79.0	1.00	1.26
43	98.8	126.5	112.6	13.87	12.33
44	114.6	114.6	114.6	0.00	0.00
45	110.0	107.0	112.5	5.50	4.80
46	135.3	148.9	142.1	6.80	4.79
47	64.1	56.4	60.2	3.80	6.30
48	132.3	148.8	140.5	8.27	5.80
49	53.3	56.7	55.0	4.71	3.12
50	49.9	51.5	50.7	0.80	1.58
51	105.0	114.5	109.7	4.75	4.33
52	73.0	70.2	71.6	1.43	2.00

PERFIL DE PRECISION PARA LIQUIDO AMNIOTICO



Gráfica No.4

d) Precisión intraensayo.

Se realizó la determinación en el suero control Precipath IM treinta veces durante el mismo ensayo. En la tabla 7 se indica el número en la serie (del 1 al 30), la extinción leída y la concentración de AFP (UI/ml) correspondiente. (Esta última, obtenida por interpolación de la extinción en la curva de calibración del ensayo).

TABLA 7. PRECISION INTRAENSAJO.

No. DET.	EXTINCCION	UI/ml	No. DET.	EXTINCCION	UI/ml
1	1.158	46.97	16	1.136	45.70
2	1.152	46.62	17	1.192	48.97
3	1.166	47.44	18	1.135	45.64
4	1.201	49.51	19	1.149	46.45
5	1.141	45.98	20	1.127	45.16
6	1.182	48.38	21	1.133	45.52
7	1.211	50.11	22	1.080	42.53
8	1.163	47.26	23	1.093	42.26
9	1.136	45.70	24	1.129	45.29
10	1.137	45.75	25	1.097	43.48
11	1.152	46.62	26	1.147	46.33
12	1.153	46.68	27	1.081	42.59
13	1.173	47.85	28	1.153	46.68
14	1.204	49.69	29	0.952	35.69
15	1.207	49.87	30	1.065	41.70

Concentración teórica de AFP en suero control: 50.8 UI/ml (40.1-61.6 UI/ml).

Posteriormente se calculó la media de la concentración de AFP en las 30 determinaciones del suero control Precipath IM (\bar{X}), la desviación estándar para una n mayor de 10 (DS (s.d.)), el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) y el porcentaje de recuperación de AFP considerando que 50.8 UI/ml corresponde al 100% y es el valor asignado de AFP para dicho suero control.

No fue posible realizar estudios de precisión intraensayo con muestras de suero materno y líquido amniótico, por requerir de volúmenes de muestra mayores a los proporcionados.

TABLA 8. COEFICIENTE DE VARIACION EN EL SUERO CONTROL PRECIPATH IM CON $n = 30$

\bar{X}	45.98 UI/ml
DS (s.d.)	2.9
%CV	6.34 %
%RECUPERACION	90.51 %

e) Precisión interensayo.

Con base en los resultados obtenidos en la determinación de AFP, se seleccionaron tres líquidos amnióticos de concentraciones de AFP baja, intermedia y alta (muestras "A", "B" y "C" respectivamente), de cada uno de los cuales se preparó una dilución 1:100 en volumen suficiente para realizar la determinación por duplicado durante cinco días consecutivos; en cada uno de los ensayos, el suero control Precipath IM (PPIM) se analizó paralelamente con las muestras. En la tabla No.9 se indica, además del día en el que se realizó la determinación, la concentración de AFP (UI/ml) en cada una de las muestras seleccionadas (A, B y C) y el porcentaje de recuperación del suero control correspondiente a cada ensayo por día. En la parte inferior de la tabla, se observa la media de la concentración de AFP para cada muestra (X), así como la desviación estándar calculada para n menor de 10 ($DS_{(n)}$) y el porcentaje del coeficiente de variación (%CV) de los datos obtenidos en el intervalo de cinco días durante los que se realizó la prueba.

TABLA 9. PRECISION INTERENSAYO.

DIA	UI/ml x 10 ³			% RECUP. PPIM
	MUESTRA "A"	MUESTRA "B"	MUESTRA "C"	
1	42.0	104.0	121.0	106.20
2	35.0	95.0	116.0	90.55
3	38.0	103.0	121.0	94.48
4	38.0	94.0	106.0	82.67
5	42.0	105.0	115.0	110.23
X	39.0	100.2	115.8	
DS (n)	3.00	5.26	6.14	
%CV	7.69	5.25	5.30	

Los valores de la concentración de AFP en las muestras, son los determinados en la dilución 1:100, y expresados x 10³ (factor de dilución).

f) Variación entre diluciones.

Se utilizaron tres diluciones 1:100 (preparadas en diferentes momentos), de cada uno de los tres líquidos amnióticos seleccionados para el estudio de precisión interensayo, de concentraciones baja (A), intermedia (B) y alta (C). El análisis de las diluciones se realizó por duplicado. En la tabla 10 se indica la concentración de AFP (UI/ml $\times 10^3$), obtenida como promedio de la concentración en los duplicados de cada dilución 1:100, la media de la concentración en las tres diluciones (X_D), la desviación estándar calculada para una n menor de 10 (DS_m) y el % del coeficiente de variación (%CV).

TABLA 10. VARIACION ENTRE DILUCIONES DE LIQUIDO AMNIOTICO

DILUCION 1:100	UI/ml $\times 10^3$	X_D	DS (n)	%CV
A ₁ A ₂ A ₃	41.57 43.57 42.16	42.43	0.84	1.98
B ₁ B ₂ B ₃	108.21 110.99 106.62	106.60	2.21	2.07
C ₁ C ₂ C ₃	118.35 119.19 122.06	116.86	1.94	1.62

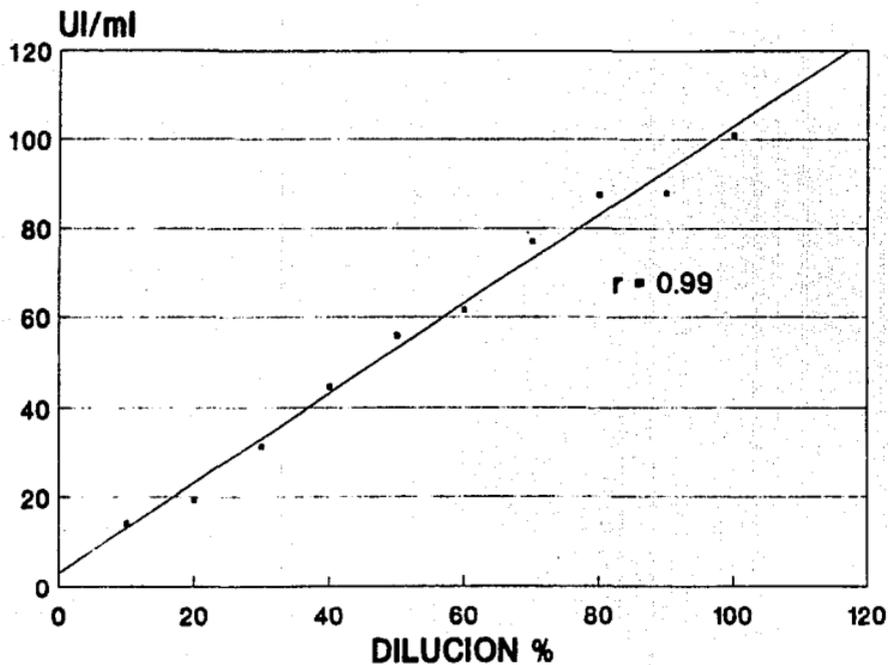
g) Linealidad.

Se utilizó un líquido amniótico de concentración elevada diluido 1:100, a partir del cual se efectuaron las siguientes diluciones. Cada una se analizó por duplicado. En la tabla 11, aparece la dilución efectuada expresada en porcentaje (v/v); la concentración de AFP determinada en cada duplicado (UI/ml); la concentración promedio de AFP en la dilución (X) expresada en UI/ml; la concentración final obtenida al multiplicar X por el factor de dilución en cada caso, considerando la dilución 1:100 inicial como el 100%. Como se observa en la gráfica 5, el coeficiente de correlación obtenido fue de 0.99.

TABLA 11. LINEARIDAD DE ELISA-AFP

DILUCION (%)	UI/ml		X (UI/ml)	UI/ml EN LA DIL. 1:100
10	14.44	13.70	14.10	141.00
20	13.18	19.91	19.36	96.8
30	29.86	32.66	31.26	104.2
40	43.30	45.36	44.33	110.8
50	53.99	57.61	55.80	111.6
60	60.80	62.66	61.52	102.5
70	75.27	78.69	76.98	109.9
80	86.55	88.33	87.44	109.3
90	83.33	92.32	87.83	97.6
100	97.53	104.27	100.90	100.9

LINEARIDAD DE ELISA AFP



Gráfica No.5

h) Curvas patrón promedio.

Se calculó el promedio de las absorbancias de cada uno de los estándares por duplicado en todos los ensayos realizados. Ya que no fue posible realizar el estudio con un mismo lote de reactivos, se realizaron las curvas de calibración promedio para cada lote ("A" y "B"). En las tablas 12 y 13 se indica el número de ensayo, la absorbancia correspondiente a cada uno de los estándares y la absorbancia del suero control Precipath IM, el cual se introdujo paralelamente con las muestras en cada ensayo. En la parte inferior de las tablas, se señala la media de las absorbancias para cada estándar (X), datos que se graficaron posteriormente (gráfica No.6) contra la concentración correspondiente, y la desviación estándar (DS_m).

En la gráfica número 6 se muestra la curva patrón promedio utilizando más, menos una desviación estándar.

En la última columna de ambas tablas, se indica la absorbancia del suero control Precipath IM (PPIM) leída en cada determinación.

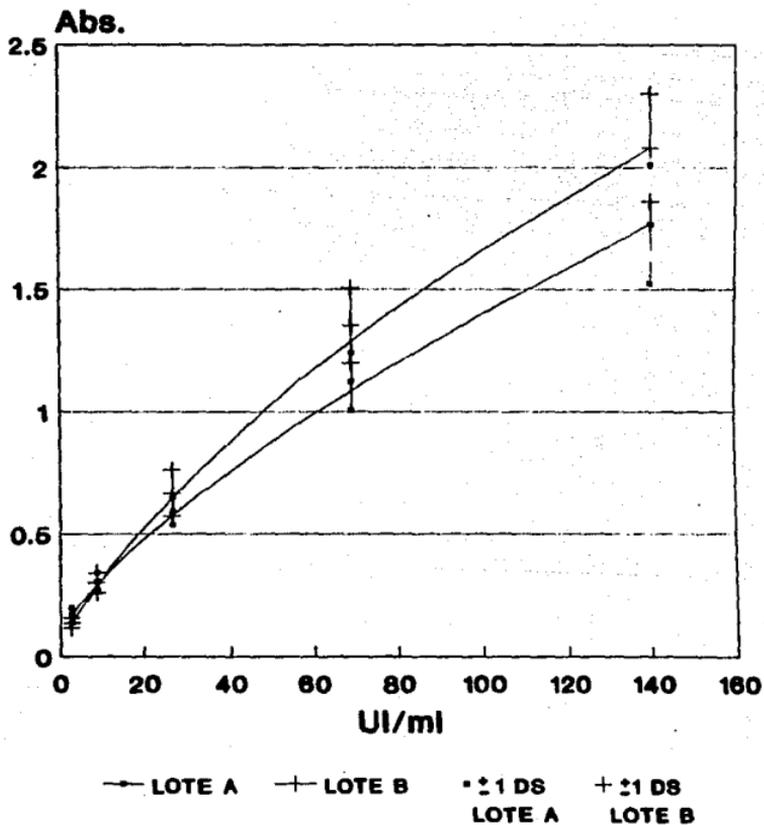
TABLA 12. CURVA PATRON PROMEDIO PARA EL LOTE DE REACTIVOS "A".

No. ENSAYO	ABSORBANCIA ESTANDARES					ABSORB. PPIM
	"a"	"b"	"c"	"d"	"e"	
1	0.140	0.346	0.557	1.074	1.740	0.950
	0.174	0.342	0.625	1.127	1.780	1.020
2	0.207	0.305	0.576	0.995	1.619	0.809
	0.216	0.333	0.580	1.052	1.587	0.811
3	0.187	0.338	0.675	1.369	2.210	1.138
	0.204	0.340	0.693	1.317	2.243	1.091
4	0.146	0.260	0.514	1.076	1.472	1.039
	0.146	0.268	0.564	1.016	1.728	0.979
5	0.154	0.256	0.530	1.147	1.611	0.812
	0.139	0.298	0.594	1.064	1.685	0.812
X	0.169	0.309	0.591	1.124	1.768	0.946
DS (m)	0.030	0.034	0.055	0.118	0.244	0.121

TABLA 13. CURVA PATRON PROMEDIO PARA EL LOTE DE REACTIVOS "B".

No. ENSAYO	ABSORBANCIA ESTANDARES					ABSORB. PPIM
	"a"	"b"	"c"	"d"	"e"	
6	0.173	0.344	0.722	1.383	2.181	1.104
	0.179	0.352	0.747	1.424	2.133	1.180
7	0.145	0.325	0.804	1.573	2.318	1.079
	0.158	0.385	0.860	1.604	2.292	1.079
8	0.128	0.303	0.737	1.480	2.481	1.150
	0.139	0.332	0.771	1.609	2.610	1.220
9	0.133	0.320	0.649	1.307	2.043	1.144
	0.157	0.328	0.702	1.393	2.131	1.124
10	0.149	0.312	0.662	1.358	2.097	1.109
	0.165	0.327	0.699	1.412	2.163	1.006
11	0.155	0.338	0.729	1.497	2.205	1.167
	0.161	0.350	0.787	1.508	2.249	1.195
12	0.125	0.259	0.581	1.306	1.972	0.922
	0.133	0.275	0.643	1.367	1.987	0.910
13	0.117	0.247	0.538	1.051	1.177	0.956
	0.135	0.261	0.545	1.120	1.795	0.975
14	0.134	0.292	0.669	1.365	20.82	1.250
	0.133	0.327	0.733	1.145	2.128	1.229
15	0.110	0.237	0.573	1.127	1.783	1.001
	0.122	0.254	0.512	1.214	1.736	0.944
16	0.101	0.237	0.556	1.200	1.929	1.174
	0.108	0.276	0.632	1.302	2.011	1.134
17	0.113	0.265	0.565	1.234	1.907	1.036
	0.122	0.274	0.602	1.216	1.904	1.075
X	0.138	0.301	0.667	1.354	2.080	1.090
DS(n-1)	0.021	0.041	0.095	0.153	0.219	0.101

CURVAS PROMEDIO DE LOTES A Y B



Gráfica No.6

iv. DISCUSION.

La interpretación de los resultados de la determinación de Alfa-fetoproteína (AFP) en muestras de suero materno (SM) mostrados en la tabla 1. se llevó a cabo considerando como normales aquellos valores que no sobrepasan 2.5 veces la mediana normal (como señala la literatura). De acuerdo a este criterio las muestras 9.10.27.28.33.39 y 43 cuya concentración de AFP es superior a 2.5 veces la mediana, se considerarían como anormales, es decir, probablemente de embarazos afectados por un defecto de cierre de tubo neural (DCTN) por lo que serían candidatos para efectuar una segunda determinación de AFP. En caso de que ésta resultase positiva, se procedería a la realización de ultrasonido y posteriormente amniocentesis para efectuar la determinación de AFP en líquido amniótico.(1,5,12,19,35,56,57)

Sin embargo, de las muestras analizadas, solamente la 27 corresponde a un embarazo afectado por DCTN, lo cual significa que las otras 6 muestras mencionadas equivalen al 10.71% de falsos positivos. No obstante, es importante considerar todos aquellos factores que en este trabajo, pudieron influir determinantemente para obtener dichos resultados:

- Períodos de congelación prolongados de las muestras en condiciones inadecuadas (como se mencionó en el capítulo de material y métodos, los especímenes se mantuvieron en congelación a -4°C durante lapsos variables desde 0 hasta 2 años antes del análisis).

- Edad gestacional errónea.

- Las tablas utilizadas, para calcular el múltiplo de la

mediana (MoM) para las muestras analizadas, no corresponden a la población en estudio. A este respecto, cabe recordar que lo que la literatura recomienda es establecer para cada laboratorio que realice la prueba, una tabla de múltiplos de la mediana apropiada para cada semana gestacional. (2.8.12.15.16.26.56.57)

Las variables ya mencionadas, no fueron controladas por tratarse de un estudio retrospectivo y ciego.

Con respecto al análisis de AFP en líquido amniótico, en la tabla 5 no se observa ningún valor de MoM superior a 3.0 veces la mediana normal, el valor de MoM para las muestras 28, 40 y 45 no aparece, ya que corresponden a la semana 21 de gestación (la tabla de múltiplos de la mediana utilizada no abarca este rango). Lamentablemente para los fines de este estudio, precisamente las muestras 28 y 45 corresponden a embarazos afectados por DCTN. Sin embargo, no se detectaron falsos positivos aún considerando la posibilidad de haber introducido errores debidos a la dilución de la muestra.

Por otra parte, es necesario enfatizar la importancia de obtener el espécimen de análisis (líquido amniótico o suero materno) dentro del período recomendado por la mayoría de los autores para la realización de la prueba, es decir entre las semanas 16-18 de gestación, ya que es en esta etapa en la que se puede distinguir mejor un embarazo normal de uno anormal, consecuentemente, es posible detectar un mayor porcentaje de embarazos afectados y se reduce al máximo la posibilidad de falsos positivos.

En lo relativo a las pruebas de validación del estudio, podemos ver que los perfiles de precisión (tablas 2.3.6 y

gráficas 1, 2 y 4), revelan que las mayores variaciones tienen lugar a bajas concentraciones (a concentraciones menores de 30 UI/ml algunos %CV son mayores al 15%), lo cual en un momento dado probablemente no tenga repercusión en el diagnóstico de DCTN, ya que este tipo de malformaciones se caracteriza por presentar elevación de AFP y los perfiles de precisión no muestran %CV superiores al 10% en rangos de concentración mayores de 40 UI/ml. Sin embargo, no debe descartarse esta evidencia, principalmente cuando la concentración de AFP en especímenes de líquido amniótico se encuentra dentro de los valores de corte (aquellos ubicados en el límite entre los considerados como normales y anormales), ya que puede estar en juego el curso del embarazo.

Por lo que respecta a la correlación entre los dos métodos utilizados (manual y automatizado, tabla 4 y gráfica 3), en general los coeficientes de variación entre ambos son menores del 10%. lo cual aunado al coeficiente de correlación (0.94), indica que no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos por uno y otro métodos. Sin embargo, para las muestras 4,6 y 11, el %CV es superior a 10%, lo cual puede deberse a varias causas, entre las que se pueden mencionar la homogenización, tiempo y condiciones de congelación inadecuados, como ya se indicó en párrafos anteriores, aunque no se descarta la posibilidad de una falla manual o en el manejo del equipo automatizado. Sin embargo, en la determinación de AFP en suero materno, un %CV por encima de 5% y aún de 10% (sin exceder de 15%), podría considerarse poco crítica (11), ya que existe la posibilidad de recurrir a un segundo análisis en suero o

realización de ultrasonido, antes de proceder a la amniocentesis para llevar a cabo la determinación de AFP en líquido amniótico.

En cuanto al perfil de precisión de líquido amniótico (todo el análisis se llevó a cabo por método manual), solamente se observa una muestra con %CV superior al 10%, lo cual indica que aún cuando se realizó un paso de dilución en todas las muestras, hubo poco arrastre de error por este motivo.

Respecto a las restantes pruebas de validación del estudio, podemos decir que, en general, técnicamente se controlaron todas las variables posibles considerando que es un estudio ciego, como lo indican los %CV, desviación estándar y linealidad.

Por lo anterior, se puede considerar que la determinación de AFP en suero materno y utilizando los múltiplos de la mediana para una población anglosajona, no hacen de esta una prueba confirmatoria de embarazos afectados por (DCTN), ya que también existen trabajos que reportan elevación de AFP en suero materno de embarazos normales (5) y a medida que avanza la gestación (1,5,6). Por lo tanto, se hace necesario en primer lugar, investigar los valores normales de AFP en suero materno para población mexicana, para posteriormente establecer tablas de múltiplos de la mediana adecuados, con base en las cuales sería posible indagar si la elevación de AFP en suero materno correlaciona con la presencia de DCTN.

Por lo que respecta a la determinación de AFP en líquido amniótico, es necesario obtener un mayor número de muestras de una población abierta con el fin de establecer tablas de múltiplos de la mediana adecuadas para población mexicana y comprobar posteriormente si dicha determinación es de utilidad en

el diagnóstico temprano de los Defectos de Cierre del Tubo Neural.

CONCLUSIONES

1.- La determinación de AFP en suero materno por el método ELISA es una prueba sencilla, no invasiva y fácil de realizar en el laboratorio como prueba de rutina.

2.- La evaluación de la semana gestacional es de suma importancia, ya que de lo contrario se pueden obtener resultados falsos positivos o falsos negativos.

3.- Es necesario establecer valores normales de AFP en suero materno y líquido amniótico para población mexicana y que sirvan como referencia para el diagnóstico temprano de Defectos de Cierre del Tubo Neural, ya que existen factores nutricionales y raciales que determinan la concentración de la proteína en dichos especímenes.

4.- Es de suma importancia conservar adecuadamente los especímenes que se utilizarán para el análisis de AFP cuando ésta no se va a realizar inmediatamente o cuando se requiere para estudios posteriores, con el fin de evitar el deterioro de la misma.

5.- La determinación de AFP en suero materno no es específica para diagnóstico de Defectos de Cierre del Tubo Neural, por lo cual es necesario apoyarse en los datos de otras pruebas como ultrasonido, amniocentesis, AFP y acetilcolinesterasa en líquido amniótico.

6.- Es recomendable realizar la determinación de AFP en suero materno a toda mujer embarazada en las semanas 16 y 18 de gestación, con el fin de detectar oportunamente la posible malformación en el producto.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Adams, M.J. Jr., Windham, M.S.: Clinical interpretation of maternal serum AFP concentrations. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 148(3):241, 1984.
- 2.- American Society of Human Genetics: Policy Statement for Maternal Serum Alpha-Fetoprotein Screening Programs and Quality Control for Laboratories Performing Maternal Serum and Amniotic Fluid Alpha-Fetoprotein Assays. *Am. J. Hum. Genet.* 40:75, 1987.
- 3.- Belanger, L., Hammel, D., Dufuor, D., Pouliot, M.: Double-antibody Enzyme Immunoassay Applied to Human AFP. *Clin. Chem.* 22(2):198, 1976.
- 4.- Bock, J.L.: Evaluation of a Sensitive Immunoenzymetric Assay for Maternal- Serum Alpha-fetoprotein Screening. *Am. J. Clin Pathol.* 93(3):352, 1990.
- 5.- Brock, D.J.H.: Feto-specific Proteins in Pre-Natal Diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine* 3(6):480-554, 1980.
- 6.- Brock, D.J.H.: Mechanisms by which amniotic-fluid alpha-fetoprotein may be increased in fetal abnormalities. *Lancet* 2(7981):345, 1976.
- 7.- Brock, D.J.H.: The prenatal diagnosis of neural tube defects.

Obstet. Gynecol. Sur. 31(1):32-40, 1976.

- 8.- Brock, D.J.H., Barron, L.: Significance of elevated mid-trimester maternal plasma-alpha-fetoprotein. Lancet 1(8129):1281, 1979.
- 9.- Brock, D.J.H., Bolton, A.E.: Prenatal diagnosis of anencephaly through maternal serum-alpha-fetoprotein measurement. Lancet 2:923-924, 1973.
- 10.- Brock, D.J.H., Scrimgeour, J.B.: Effect of gestational age on screening for neural-tube defects by maternal plasma-A.F.P. measurement.
- 11.- Brock, D.J.H., Sutcliffe, R.G.: AFP in the antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. Lancet 2:197-199, 1972.
- 12.- Brock, D.J.H., Wald, N.J.: Organisation of maternal serum-alpha-fetoprotein screening for fetal neural-tube defects. Lancet 1(8013):700, 1977.
- 13.- Brumfield, C.G., Cloud, G.A.: Amniotic fluid AFP levels and pregnancy outcome. Am. J. Obstet. Gynecol. 157:822, 1987.
- 14.- Chard, T.: An introduction to Radioimmunoassay and related techniques. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 6, part I, cap.4,5,8,9,10,11.

- 15.- Christensen, L.R., Rea, M.R., Kessler, G.: Implementation of a screening program for diagnosing Open Neural Tube Defects: Selection, Evaluation and Utilization of Alpha-fetoprotein Methodology. Clin. Chem. 32(10):1812, 1986.
- 16.- Committee on Genetics: Holtzman, N.A., Leonard, C.O.: Alpha-fetoprotein screening. Pediatrics 80(3):444, 1987.
- 17.- Crandall, B.F., Hanson, F.W., Tennant, F.: Alpha-fetoprotein levels in amniotic fluid between 11 and 15 weeks. Am. J. Obstet. Gynecol 160(5):1204, 1989.
- 18.- Enzymun-Test AFP: Clinical aspects and Methodology. Boehringer Mannheim GmbH, 1988. Folleto informativo.
- 19.- Evans, M.I., Belsky, R.L., Clementino, N.A.: Establishment of a collaborative university-commercial maternal serum alpha-fetoprotein screening program: A model for tertiary center outreach. Am. J. Obstet. Gynecol. 156:1441, 1987.
- 20.- Evans, M.I., Drugan, A.: Genetic diagnosis in the first trimester: The norm for the 1990s. Am. J. Obstet Gynecol 160(6):1332, 1989.
- 21.- Ferguson-Smith, M.A., Rawlinson, H.A.: Avoidance of anencephalic and spina bifida births by maternal serum-alpha-fetoprotein screening. Lancet 1(8078):1330, 1978.

- 22.- Forest, J.C., Verreault, F., Pouliot, M.: Measurement of AFP in maternal serum: three comercial Radioimmunoassays compared. Clin. Chem. 28(2):339, 1982.
- 23.- Ghosh, A., Tang, M.Y.H.:Justification of maternal serum alphafetoprotein screening in a population with low incidence of neural tube defects. Pren. Diag. 6:83, 1986.
- 24.- Henry, J.B.:Todd-Sanford-Davidshon: Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 8a. edición, Salvat Mexicana de Ediciones, S.A. de C.V. 1990. Caps. 15, 20 y 21 tomo I, cap. 38 tomo II.
- 25.- Hullin, D.A., Hobbs, D.R.: Use of patients' data to control alpha-fetoprotein assays when screening for neural tube defects. Clin. Chem. 34(9):1928, 1988.
- 26.- Kallestad Laboratories Incorporated: Information on Alpha Fetoprotein Testing. Cat. 956 issued feb. 1984.
- 27.- Kilbane, M.P.J., Carpenter, P.: Letter, Screening for neural-tube defects. Lancet 1:99, 1983.
- 28.- Kimball, M.E., Milunsky, A.: Prenatal diagnosis of Neural Tube Defects. Obstet & Gynecol. 49:532, 1977.
- 29.- Körner, H., Rodríguez, L., Fernández, J.L.: Maternal serum alpha-fetoprotein screening for neural tube defects and

other disorders using an ultramicro-ELISA. Hum. Genet. 73:60-63, 1986.

- 30.- Langman, J.: Embriología Médica. 3a. edición, Ed. Interamericana. México, D.F. 1976. pp.99-144.
- 31.- Leek, A.F., Leighton P.C.: Prospective diagnosis of spina bifida. Lancet 2(7895):1511,1974.
- 32.- Leighton, P.C., Gordon, Y.B., Kitau, M.J.: Levels of alpha-fetoprotein in maternal blood as a screening test for fetal neural-tube defect. Lancet 2(7943):1012, 1975.
- 33.- Lorber, J., Stewart, C.R.: Alpha-fetoprotein in antenatal diagnosis of anencephaly and spina bifida. Lancet 1:1187, 1973.
- 34.- Macri, J.N.: Critical issues in prenatal maternal serum alpha-fetoprotein screening for genetic anomalies. Am. J. Obstet. Gynecol. 155:240, 1986.
- 35.- Macri, J.N., Kasturi, R.V.: Maternal serum alpha-fetoprotein screening. Am. J. Obst. Gynecol. 157(4) parte I:820, 1987.
- 36.- Mennuti, M.T.: Diagnóstico prenatal de los defectos del tubo neural. Clin. Perinat. 2:227, 1980.
- 37.- Milunsky, A., Elliot, M.D.: Maternal serum AFP screening. N.

Engl. J. Med. 298:738, 1978.

- 38.- Milunsky. A., Elliot Alpert, M.D.: Prenatal diagnosis of neural tube defects. *Obst. & Gynecol.* 55(1):60, 1980.
- 39.- Moore, L.K.: *Embriología Clínica*. 2a. edición, Ed. Interamericana. México, D.F. 1979. pp.13-143 y 309-321.
- 40.- Nelson. L.H., Bensen, J.: Outcomes in patients with unusually high maternal serum Alpha-fetoprotein levels. *Am. J. Obstet Gynecol.* 157(3):572, 1987.
- 41.- NØrgaard-Pedersen, B., Bagger, P.: Maternal-serum-alphafeto-protein screening for fetal malformations in 28,062 pregnancies. *Acta Obstet. Gynecol Scand* 64:511, 1985.
- 42.- Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud. Ejecución de las Actividades de Salud de Genética en América Latina y El Caribe. Informe de la Reunión de un Grupo de Expertos en Genética Médica. La Habana, Cuba 9-11 de octubre de 1987.
- 43.- Rea, C.R., Gutiérrez, G.J.N.: Estructuración de los capítulos del protocolo de investigación según el tipo de estudio. *Rev. San. Mil. Mex.* 41(5):245, 1987.
- 44.- Rea, C.R., Gutiérrez, G.J.N.: Evaluación de los métodos diagnósticos. *Rev. San. Mil. Mex.* 42(1):43, 1988.

- 45.- Rodbard, D.: Statistical Quality Control and Routine Data Processing for Radioimmunoassays and Immunoradiometric Assays. Clin. Chem. 20(10): 1225-1270, 1970.
- 46.- Screening for neural-tube defects. Editorial. Lancet 1(8026):1345, 1977.
- 47.- Seppala, M., Ruoslahti, E.: Alpha-fetoprotein in normal and pregnancy sera. Lancet 1(7746):375, 1972.
- 48.- Simpson, J.L., Baum, L.D.: Maternal serum AFP screening: low and high values for detection of genetic abnormalities. Am. J. Obstet. Gynecol. 155:593, 1986.
- 49.- Simpson, J.L., Nadler, H.L.: Maternal serum alpha-feto-protein screening in 1987. Obst. & Gynecol 69(1):134, 1987.
- 50.- Silva, M.J., Carreras, P.J.: Elaboración de una tabla de valores normales de Alfa-fetoproteína (AFP) en suero materno en embarazos de 16 a 18 semanas. Estudio preliminar. Tesis de posgrado, División de Estudios de Posgrado, Hospital Regional 20 de Noviembre, México, D.F. 1990.
- 51.- Special report: Maternal serum alpha-fetoprotein screening for neural tube defects. Pren. Diag. 5:77, 1985.

- 52.- Stites, P.D., Stobo, D.J., Wells, J.V.: *Inmunología Básica y Clínica*. 6a. edición. Ed. El Manual Moderno. S.A. de C.V., México, D.F. 1988. Cap. 17.
- 53.- Wald, N.J., Brock D.J.: Prenatal diagnosis of spina bifida and anencephaly by maternal serum-alpha-fetoprotein measurement. A controlled study. *Lancet* 1:766, 1974.
- 54.- Wong, P.Y., Doran, T.A.: Evaluation of four "kit" Immunoassay Methods for determination of Alpha-Fetoprotein in serum during pregnancy. *Clin. Chem.* 25(11):1905, 1979.
- 55.- Workshop Report: Enzymun-Test AFP. Boehringer Mannheim GmbH, 1988.
- 56.- U.K. Collaborative Study on Alpha-fetoprotein in Relation to Neural-tube Defects. *Lancet* 1 (8026):1323, 1977.
- 57.- U.K. Collaborative Study on Alpha-fetoprotein in Relation to Neural-tube Defects. Second Report. *Lancet* 2(8144):651, 1979.