

DCNE
\$5005

3 AGO. 1981

FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.

Vencido el plazo, el lector pagará \$5.00 peso por cada día que pase.

(11-013)

~~26 ABR. 1982~~

~~16 AGO. 1982~~

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

Clasificación
040.54
M385ef
1981
c.1

Título **ESTANDARIZACION DEL METODO
ELECTROINMUNOENSAYO PARA LA CUANTIFICACION
DE LA INMUNOGLOBULINA A SERICA**

**REPORTE DEL PROGRAMA DE EVALUACION FINAL
PRESENTADO POR:**

Autor **Yolanda Mercedes Martinez Cadena
Diana Teresa Ollervides Villaseñor**

**EN OPCION AL TITULO DE
LIC. EN QUIMICA CON ESPECIALIDAD EN
ANALISIS CLINICOS**

Folio
801320

VoBo
[Signature]

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1981

**BIBLIOTECA
UNIVERSIDAD DE MONTERREY**

Con mucho cariño y respeto a nuestros padres, quienes en todo momento han sido motivo de admiración y digno ejemplo.

A nuestros hermanos, por brindarnos su apoyo y confianza en los momentos que más necesitamos.

A nuestros abuelos, por transmitirnos sus experiencias.

A todos nuestros amigos, porque nos han demostrado su amistad y lealtad a través del tiempo.

A nuestros compañeros de carrera profesional, por la ayuda mutua que nos otorgamos en el transcurso de la misma.

Con especial agradecimiento a nuestra asesora la Srita. Q.F.B. Maricela Ramírez Benavides, por su valiosa ayuda para la realización de éste trabajo.

A nuestros maestros, por su labor tan noble y por todo lo que gracias a ellos aprendimos.

Gracias DIOS nuestro por estar siempre a nuestro lado.

I N D I C E

	<u>Página.</u>
Introducción.....	1
Materiales y Métodos.....	18
Resultados.....	26
Discusión y Conclusiones.....	30
Resumen.....	39
Bibliografía.....	40

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

El concepto de inmunidad es antiguo, empírico y se puede llamar propiamente el estudio de la resistencia a las infecciones. Varios siglos antes del descubrimiento de la teoría de los gérmenes para las enfermedades infecciosas, ya se sabía que la convalecencia de una enfermedad se acompañaba de una resistencia especial contra la reinfección. Así surgió la Inmunología, la cual se define como el estudio de los fenómenos que permiten al huésped mantener constante su medio interno frente a sustancias que se identifican como extrañas (producidas dentro del propio huésped, o introducidas del medio ambiente externo).(2).

Un antígeno se define como una sustancia que puede estimular a ciertas células de un animal para que elaboren proteínas que tienen la facultad de reaccionar con el antígeno de manera específica (anticuerpos). Los anticuerpos a su vez se definen como sustancias producidas en respuesta a un antígeno que muestra similitud antigénica, estructural y biológica, pero difieren respecto a su estructura primaria, lo que permite que su función sea estrictamente específica.(1,2).

Los anticuerpos son proteínas que desde el punto de vista inmunológico son llamadas inmunoglobulinas, las cuales en los últimos años han atraído una gran investigación, y se encuentran en las fracciones beta y gamma globulina del suero.(4).

El resto de las fracciones globulínicas consisten en proteínas no relacionadas, que sólo comparten una movilidad electroforética común.(3).

Según las investigaciones efectuadas por Tiselius en 1936, las gamma globulinas fueron identificadas y designadas como un grupo diferente de seroproteínas. Recibieron este nombre porque migraban más lentamente hacia el ánodo en un campo eléctrico a pH 8.6, que las globulinas de otros dos grupos llamados alfa y beta.(1).

En 1938, Tiselius en compañía de Kabat observaron que el suero inmune tenía un nivel más elevado de gamma globulina que el suero no inmune. Era evidente incluso para dichos investigadores que esta gamma globulina no era una proteína homogénea, sino varias.(3).

Estudios posteriores demostraron que la fracción gamma globulina del suero consistía, por lo menos, en cinco globulinas, cuya actividad de anticuerpo, propiedad vital en común, podía diferenciarse por análisis antigénico.(1).

Se engendraron gran cantidad de problemas referentes a la nomenclatura de las gamma globulinas, pero hasta 1959 Heremans, para esclarecer esta situación, recomendó el empleo del término Inmunoglobulina para hacer referencia al sistema de proteínas muy relacionadas aunque no idénticas, que son capaces de actuar como anticuerpos.

Posteriormente, la Organización Mundial de la Salud recomendó una terminología donde las inmunoglobulinas se designaron con las siguientes abreviaturas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, significando "Inmunoglobulina G", "Inmunoglobulina M", y así sucesivamente.(3). Esta clasificación se basó en propiedades físico-químicas, estructura antigénica y actividad biológica.(4). Algunas de las propiedades de éstas cinco inmunoglobulinas se indican en la tabla 1.

Los estudios realizados en los últimos años han ayudado a la integración de toda esta información acerca de las propiedades y clasificación de las inmunoglobulinas, la cual condujo a la formación de un modelo específico de la estructura de los anticuerpos.(Edelman, 1973).(3).

Tres observaciones favorecieron el estudio de la estructura de las inmunoglobulinas:

1) En 1959 Porter inmunizó conejos contra albúmina de huevo y trató su gamma globulina con papaína, una enzima proteolítica, y cisteína un agente reductor. Esto lo corrió en una columna de carboximetilcelulosa resultándole tres picos, que representan tres fragmentos polipeptídicos, dos de los cuales poseían sitios de combinación de anticuerpos, por lo que fueron llamados fragmentos Fab, fragmento ligador de anticuerpos, los cuales eran casi idénticos en tamaño, contenido de aminoácidos y comportamiento.(1,2,3,5).

Dicho fragmento también presentó una capacidad biológica dual y una unión de antígeno específico, la cual es la actividad del anticuerpo.(6).

A el otro fragmento se le llamó Fc, el cual se cristalizaba y no mostraba actividad de anticuerpo. Este no fijaba el antígeno y tenía funciones efectoras específicas tales como la fijación de complemento, transferencia placentaria y la unión a las células.(1,2,3,5,6).

2) La realizaron Nisonoff y colaboradores en 1960, quienes intentaron repetir el experimento de Porter utilizando o-

tra enzima proteolítica, la pepsina. Obtuvieron como resultado un fragmento que sí precipitaba con el antígeno y poseía actividad de anticuerpo bivalente, y le designaron a éste como $(Fab')_2$, el cual al sufrir descomposición daba dos moléculas de Fab idénticas a las que obtuvo Porter. (1,3).

3) En 1959, Edelman utilizando la técnica de la electroforesis, observó dos tipos de bandas (cadenas de polipéptidos). Las bandas de movimiento rápido fueron llamadas cadenas ligeras y las de movimiento lento cadenas pesadas. (3,5). Cuando se trataron en forma similar, se encontró que el Fab consistía en una mitad amino de la cadena pesada (H) y una cadena ligera (L); y el Fc consistía en una mitad carboxilo del dímero de cadena pesada.(2).

La unidad monomérica básica de todas las inmunoglobulinas esta formada por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas H y dos cadenas L, unidas entre sí por enlaces disulfuros.(3,6).

Cada inmunoglobulina tiene una región que posee una secuencia variable de aminoácidos. Estas regiones variables (V) están localizadas en la porción N terminal de las cadenas H y L, residiendo en estas áreas el sitio activo del anticuerpo.(6). Las regiones de las cadenas H y L son designadas VH yVL, respectivamente.(Fig. 1). A su vez, la inmunoglobulina posee regiones que tienen la misma secuencia de

aminoácidos llamándoles regiones constantes, designadas como CH y CL, dependiendo de la cadena en que se encuentre. Edelman enfatizó que en el dominio CH residía una importante actividad biológica, a la que designó como función efectora de la inmunoglobulina.

También existe una porción central de la cadena H llamada "región de la bisagra", la cual permite la flexibilidad de las porciones Fab de la molécula, facilitando el acomodo de antígenos de diferentes tamaños y conformaciones además de la fijación del complemento. (Feinstein y Rowe, 1965). (3,6).

Las cadenas pesadas de las cinco inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE son designadas como gamma, miu, alfa, delta y epsilon respectivamente. Las cadenas ligeras son las mismas en todas las inmunoglobulinas las cuales son designadas como kappa y lambda. (Tabla 1).

Ultimamente se ha recopilado información sobre la función y estructura cuaternaria de las inmunoglobulinas. La IgG incluye de un 70 a un 80 por ciento de nuestros anticuerpos humorales. Su amplio espectro de anticuerpos nos da una idea de su enorme heterogeneidad de sitios de unión de antígeno y está estructuralmente confinada a la región variable de las moléculas de IgG, aunque, en menor grado, dicha heterogeneidad se observa en la parte constante. (7).

En la actualidad se conocen cuatro subclases de IgG: IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Estas subclases difieren en su estructura primaria en la región carboxílica terminal de sus cadenas polipeptídicas pesadas, en el arreglo y número de los puentes disulfuro de esta misma cadena y en la localización de los puentes disulfuro que unen las cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras.(7).

Se demostró que la IgM se compone de pentámeros y cada elemento del mismo contiene dos cadenas H y dos cadenas L unidas por enlaces disulfuro débiles. Al sufrir reducción por reactivos sulfhidrúlicos, logra tener el mismo peso molecular que la IgG e IgA.(3).

Se pudieron establecer dos subclases de IgA, la IgA₁ y la IgA₂ ó IgA secretora, en base a sus diferencias de estructura antigénica y de variaciones en la disposición de los puentes disulfuro entre las cadenas. En las secreciones, la IgA₂, se encuentra en forma dimérica unida por enlaces covalentes a la cadena J, y a una cadena polipeptídica adicional que es el componente secretor.(6).

Con respecto a la IgD no se ha estudiado mucho debido a su degradación espontánea, pero las últimas investigaciones han demostrado que forma parte de la membrana de los linfocitos B y por lo tanto interviene en la modulación de la respuesta inmune.(8).

La clase IgE, se ha popularizado por su propiedad de mediar reacciones de hipersensibilidad inmediata y se le ha

considerando como anticuerpo reagínico responsable de la sensibilización cutánea en la alergia atópica. Es la inmunoglobulina que se presenta en menor concentración y es la más recientemente estudiada.(3,6).

Todo lo citado con anterioridad muestra un bosquejo de las cinco inmunoglobulinas conocidas hasta la fecha. Partiendo de lo anterior, enfocaremos nuestro trabajo a la inmunoglobulina A, debido a que es la de interés en nuestra investigación.

En la búsqueda de los valores normales de las inmunoglobulinas en el suero, se llegó a la conclusión de que cada técnica establece sus propios valores normales dependiendo de las concentraciones internacionalmente establecidas y de los resultados obtenidos en la aplicación de dichas técnicas. Hay una ligera variación en los resultados debido a que los estudios conocidos se realizaron en diferentes lugares geográficos, y el medio ambiente es uno de los principales factores que influyen en este tipo de determinaciones, así como también el factor alimentación, que varía aun de región en región.(19,28).

Las unidades más comunmente utilizadas para designar la concentración de inmunoglobulinas son en miligramos por 100 mililitros (mg/ml) y en unidades internacionales por mililitro (U.I./ml).

Son evidentes las variaciones en concentración de las inmu-

noglobulinas en las condiciones citadas con anterioridad, esto se observó al revisar la bibliografía que incluía información de diferentes países tales como: Estados Unidos de América (10,11,12,13,14,15,16,18,19,20,22,25), Holanda (4,9,10,17,21), Bélgica (10,16,27), Suiza (9,21,24), Chile (9,16), Inglaterra (9,15), México (9,10), Alemania (9), Argelia (9), Australia (9), Bulgaria (26), Dinamarca (23), España (16), Japón (9), Nigeria (9), Nueva Guinea (10), Suecia (9), y Venezuela (10).

Se han observado patologías debido a un aumento o disminución de manera considerable de la inmunoglobulina A sérica. Esta se ve aumentada en el caso de artritis, síndrome de Down, mieloma múltiple y disminuida en síndrome nefrótico idiopático, ataxia, agammaglobulinemia, hipogammaglobulinemia transitoria, disgammaglobulinemia y enteropatía con pérdida de proteínas.(3,7,11,12,27,29,30).

En el área de la Química Clínica, la electroforesis es de gran utilidad principalmente en la separación de los constituyentes del plasma, del suero y de otros líquidos corporales.(31).

En la actualidad, la electroforesis es de gran ayuda para la separación de las cinco fracciones mayores de las proteínas del suero, comenzando de la más cercana al ánodo y moviéndose hacia el cátodo: albúmina, α_1 , α_2 , beta y

gamma.(7). Estos tipos de proteínas muestran una migración relacionada con su forma, tamaño y carga.

Los principios de la electroforesis fueron definidos a principios del siglo XIX. En 1879, Helmholtz sugirió la existencia de una capa eléctrica doble en la interfase del solvente y sólido, pero no fue sino hasta 1930 que un grupo de suecos pusieron la teoría en práctica y diseñaron los primeros instrumentos electroforéticos.(32).

Theorell y Tiselius hicieron aparatos para electroforesis analítica en fase líquida, pero estos resultaron ser muy costosos, difíciles de operar y requerían de una gran cantidad de muestra.(32).

Se denomina electroforesis en general, al desplazamiento de las partículas coloidales de una fase sólida con respecto a una líquida bajo la influencia de un campo eléctrico.(3,32). Al colocar una mezcla de partículas que tienen cargas netas y medidas diferentes en un campo eléctrico, como son distintas se moverán a velocidades variables sucediendo la separación completa o parcial de dichas partículas.(32). En esta técnica intervienen otros factores tales como la carga eléctrica, la forma, el tamaño de las partículas y su movilidad electroforética.

La electroforesis puede ser de dos tipos: libre y en zona. La primera sucede cuando el campo eléctrico se aplica di-

rectamente a la solución. La otra, las partículas cargadas se colocan en un medio estabilizador (papel filtro, acetato de celulosa, agarosa, etc.), sobre el que se depositan en el curso de su migración, de manera que al final se puedan teñir en dicho medio.(1940).(3,32).

Debido a que la electroforesis no nos da una caracterización y cuantificación muy precisa de las inmunoglobulinas, se utiliza la inmunolectroforesis para lograr dicha precisión.

Grabar y Williams en 1953, fueron los primeros en utilizar la inmunolectroforesis en investigaciones inmunológicas.(5,29).

La inmunolectroforesis es la combinación de la electroforesis con la inmunodifusión. Siendo esta última la difusión del antígeno y anticuerpo, hasta alcanzar una concentración apropiada y como consecuencia la aparición de bandas de precipitados.(3,29). Esta técnica es muy útil en la identificación de una proteína específica, de la totalidad de las proteínas del suero. Las anomalías se muestran cuando existe ausencia, disminución y aumento de dicha proteína.(29).

Durante los últimos años se han efectuado métodos inmunolectroforéticos cuantitativos del suero humano con antisueros polivalentes, distinguiéndose un poco más de 40 líneas de precipitado, de las cuales algunas son conside-

radas inmunoprecipitados de dichos sueros, y el resto aún no han sido identificadas.(33,34).

Descubrimientos recientes sobre técnicas de inmunoelectroforesis han permitido las determinaciones cualitativas y cuantitativas de las inmunoglobulinas G, M y A del suero. (35).

La IgG migra de la región α_2 hacia la región gamma, presentándose en mayor proporción en la posición γ_2 . La IgA migra de la fracción beta hacia el área γ_1 . Y la última, la IgM, migra entre beta y gamma con una mayor concentración en la posición γ_1 .(29).

La cuantificación de las tres inmunoglobulinas principales se realiza en el suero de los pacientes que se sospecha que tengan anormalidades en el nivel de las mismas. Dada la importancia de lo anterior se han desarrollado muchos métodos.

Heidelberger y Kendall requirieron de un antisuero específico para la estimación de las proteínas individuales del suero, utilizando el método de precipitación cuantitativa. Este limitó el uso del mismo, pero la técnica fue simplificada.(36).

La técnica en tubo de Oudin, se basa en la difusión del antígeno sobre una superficie de agar que contiene anticuerpos. Al suceder este fenómeno se produce una zona de proporción óptima de antígeno-anticuerpo, observandose

una línea de precipitado.(1,36).

Una modificación del método anterior es la prueba de Ouchterlony de "difusión doble" en agar. Aquí el antígeno y anticuerpo difunden uno hacia el otro simultáneamente, permaneciendo sus puntos de proporción óptima bastante estáticos y las líneas de precipitado no tienden a desplazarse.(1).

La técnica de Mancini, la cual se basa en la difusión radial del antígeno en el agar conteniendo anticuerpos es la más ampliamente utilizada para la cuantificación de las inmunoglobulinas del suero.(32,36).

La inmunoelectroforesis cruzada es una técnica recientemente introducida que se lleva a cabo en dos dimensiones y permite una estimación cuantitativa de las proteínas. Fue descrita por Laurell en 1965, y sufrió una modificación por Clarke y Freeman.(5,37,38).

Se describió una importante modificación llamada Contrainmunoelectroforesis. El anticuerpo se coloca frente al antígeno, se aplica una corriente eléctrica de manera que el antígeno se moverá hacia el anticuerpo y viceversa, hasta que se forma una línea de precipitado entre ambos.(5).

En 1966, Laurell describió un método cuantitativo originalmente llamado Electroforesis "Rocket" (cohete) que recientemente fue llamado Electroinmunoensayo.(32).

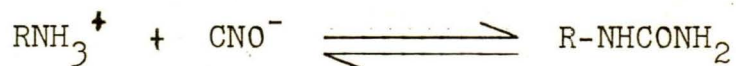
El principio en que se basa este método es la rápida mi-

gración electroforética del antígeno en una placa de agar que contiene anticuerpos, los cuales se mantendrán en concentración constante a través de toda la placa.(32,39).

Un campo eléctrico induce la migración de los antígenos y los anticuerpos, de manera que reaccionan los unos con los otros formando complejos, los que forman zonas de precipiitación parecidas a cohetes en ascenso. En este punto, el cohete no se moverá aunque continúe la electroforesis. La altura del cohete está en relación cuantitativa con la concentración del antígeno aplicado.(32,36).

La cuantificación de las inmunoglobulinas por el método de Electroinmunoensayo es muy difícil debido a que el antígeno es heterogéneo y tiene movilidad electroforética muy similar o idéntica a los anticuerpos que se encuentran en el gel. Por lo tanto se utiliza el método de Carbamilación con el cual se logra cambiar las cargas de las proteínas del suero, ó más específicamente aumentar la movilidad de los antígenos y anticuerpos.

Reacción de Carbamilación:



El cianato reacciona con los grupos alfa y epsilon amino y sulfhidrilo de la proteína, de manera que los grupos amino se convierten en grupos carbamilamino. Estos son virtualmente no básicos.(32,39,40,41).

El objetivo esencial de nuestra investigación consiste en la estandarización del método Electroinmunoensayo para la cuantificación de la inmunoglobulina A sérica.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

En este estudio se realizó la estandarización de la inmunoglobulina A sérica por medio de el método de Electroinmunoensayo. Esto se logró utilizando estándares de concentración conocida de dicha inmunoglobulina para realizar la curva de calibración y poder así determinar las concentraciones de la inmunoglobulina en suero humano. Las concentraciones de los estándares* antes mencionados corresponden a:

Estándar # 1 - 86 mg/100 ml.

Estándar # 2 - 172 mg/100 ml.

Estándar # 3 - 343 mg/100 ml.

* Behringwerke AG.

las cuales se encuentran dentro del rango de los valores normales de la inmunoglobulina A.

Nuestro estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Análisis Clínicos de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey, en el transcurso de Enero a Abril de 1981.

A. MATERIALES.

Cámara Electroforética.

Es una cámara cerrada que contiene, dos electrodos de platino enclavados en una plataforma central de 120 X 230 mm, sobre la cual deben colocarse las placas de vidrio con agarosa (R.2), dos recipientes para el buffer barbital pH 8.6 (R.1) con capacidad de 1 l, colocados de tal manera que cubran los dos electrodos y se pueda cerrar el circuito electroforético con un conductor eléctrico apropiado como el papel filtro (Whatman # 1).

La cámara electroforética contiene además un sistema de enfriamiento en forma de espiral localizado en la plataforma central a la cual se le conecta un reciclador de agua a una temperatura de $10^{\circ}\text{C} \pm 2$.

Fuente de Poder.

La corriente en el gel se logra por medio de una fuente de

poder con voltaje estabilizado, a un rendimiento de 250-300 volts, genera de 8-10 V/cm (electroforesis de alto voltaje). El voltaje en el gel se mide por medio de un voltímetro, colocando un sistema de electrodos de prueba (4 cm de longitud), correspondiente a una escala máxima de 0-25 V/cm.

De la misma forma, el amperaje que es directamente proporcional al voltaje, se mide con un amperímetro de escala, que va de 0-100 miliamperes.

Perforador del gel.

Este dispositivo se utiliza para hacer los orificios en el gel. Consiste en un tubo de acero inoxidable con diámetros específicos. El diámetro de los orificios estará de acuerdo con el volumen de la muestra que se va a aplicar. El diámetro utilizado en este método es de 2.5 mm para 5 microlitros de volumen.

Plantilla.

Esta plantilla estándar permite oradar las cavidades de forma simétrica de lado a lado en la placa de gel, permitiendo una distancia del centro de un orificio al otro. La distancia requerida para este método es de 5 mm. El uso de la plantilla ahorra tiempo a la técnica y permite que los resultados sean reproducibles.

Placas de vidrio.

Las placas que se pueden utilizar son de las siguientes medidas: 10 X 5 cm (8 ml), 10 X 10 cm (15 ml). Dichas placas deben estar limpias y secas antes de usarse. Se recomienda lavar con detergente, enjuagar repetidamente con agua destilada y por último lavar con extrán y enjuagar muy bien con agua destilada.

Las placas se colocan sobre una plataforma equilibrada, y se prosigue a colocar la cantidad por placa de agarosa conteniendo antisuero (anti-IgA)* (R.3) necesaria para formar una capa de 1.5 mm de espesor (puede variar entre 1 y 2 mm). Una vez que la agarosa ha solidificado se hacen los orificios adecuados.

B. METODOS.

Carbamilación. Modificación del método.

Se mezclan volúmenes iguales de muestra, con concentración no conocida, o estándar, de concentración conocida y solución de cianato de potasio 2M (R.4) recientemente preparada. Se deja reaccionando de 18-24 horas a temperatura ambiente.

Electroforesis.

a) Calentar el aparato de electroforesis durante un período de 1-2 horas una vez que se ha preparado la cámara electroforética, con dos placas de 10 X 10 cm que contienen

* Behringwerke AG.

una capa de agarosa sin antisuero.

b) Aplicar la muestra y los estándares en los orificios de cada placa de agarosa e inmediatamente colocarlas sobre la plataforma de la cámara electroforética.

Disponer el papel filtro (20 X 8 cm de longitud y 1 mm de espesor) en forma tal que se establezca la unión de la agarosa con la solución buffer.

c) Cubrir la cámara y proceder a aplicar el voltaje requerido (280-300 V, que genera de 8-10 V/cm en el gel) durante 30 minutos. Este voltaje deberá medirse antes y despues del corrimiento, usando un voltímetro de prueba como se describió con anterioridad.

Desproteínización.

Después de terminada la electroforesis se colocan las placas en solución de cloruro de sodio 0.1 M (R.5) durante 15 minutos con el motivo de remover por difusión las proteínas no precipitadas.

Tinción.

a) La coloración de los inmunoprecipitados se lleva a cabo con la solución colorante (R.6) por un tiempo de 10 minutos.

b) La decoloración de las placas se realiza con la solución decolorante (R.7) durante un período de 10 minutos.

Análisis Cuantitativo.

La cuantificación de las inmunoglobulinas de muestras problema se basa en la comparación de los precipitados con los estándares.

La concentración de las inmunoglobulinas de muestras no conocidas se determina por interpolación de la altura del cohete de cada muestra en una curva de calibración que relaciona, la concentración de los estándares (abscisas) con la altura de los cohetes obtenidos (ordenadas).

La medición de la altura de los cohetes puede efectuarse usando una regla para medir la distancia desde la parte superior del pico hasta el centro del orificio donde se coloca la muestra.

REACTIVOS.

(R.1) - Buffer Barbital:

Barbital de sodio* (5,5-dietilbarbiturato de sodio).....	41.2 g.
Barbital (ácido 5,5-dietilbarbitúrico)...	8.0 g.

Se mezclan los reactivos anteriores con agua destilada y se afora a 10 l. Se ajusta el pH a 8.6 si es necesario con HCl 0.1 N ó con NaOH 0.1 N.

Se conserva en frasco ámbar.

* Merk.

(R.2) - Agarosa al 1%:

Agarosa.....	1.0 g.
Buffer barbital c.b.p.....	100.0 ml.

Se disuelve la agarosa en el buffer barbital calentando.

(R.3) - Agarosa conteniendo antisuero IgA:

Antisuero IgA.....	0.6 ml.
Agarosa al 1% c.b.p.....	32.0 ml.

Se coloca el antisuero y se mezcla con la agarosa a una temperatura de 56°C.

(R.4) - Cianato de potasio 2 M:

Cianato de potasio.....	4.05g.
Agua destilada c.b.p.....	25.0 ml.

Se disuelve el cianato de potasio en agua destilada.

(R.5) - Solución salina 0.1 M:

Cloruro de sodio.....	5.85g.
Agua destilada.....	1000.0 ml.

Se disuelve el cloruro de sodio y se afora con agua destilada.

Se conserva en botella de plástico.

(R.6) - Solución colorante Kenacid Blue R:

Kenacid Blue R.....	1.0 g.
---------------------	--------

Acido acético.....	100.0 ml.
Etanol.....	450.0 ml.
Agua destilada.....	450.0 ml.

Se disuelve el Kenacid Blue R con las tres soluciones.

Se conserva en frasco ámbar con tapón esmerilado.

(R.7) - Solución decolorante:

Acido acético.....	100.0 ml.
Etanol.....	250.0 ml.
Agua destilada.....	650.0 ml.

Se mezclan los tres reactivos.

Se conserva en frasco ámbar con tapón esmerilado.

R E S U L T A D O S

El método se realizó repetidas veces variando condiciones tales como reactivos, tiempo de corrimiento, temperatura y grosor del papel filtro, hasta lograr que los precipitados en forma de cohete, de los estándares de concentración conocida y de una muestra problema, fueran uniformes. Las condiciones a las cuales resultaron dichos precipitados fueron las siguientes:

Voltaje	- 280 V.
Amperaje	- 30 mA.
Campo de fuerza-	7.5 V/cm.
Tiempo	- 45 min.

Temperatura - 9 °C.

Papel filtro - 5

Como se mencionó con anterioridad, la altura del cohete está en relación cuantitativa con la concentración del antígeno aplicado, por lo que procedimos a medir las alturas de los precipitados obtenidos.(32,36).

Los resultados se observan en la Tabla 2. En base a éstos se construyó la curva de calibración del método, para con ella poder obtener la concentración de la inmunoglobulina A sérica no conocida de cualquier muestra.(Fig. 2)

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El método de Electroinmunoensayo es útil para la cuantificación rápida de las inmunoglobulinas, requiere de 4 a 5 horas. Este método combina el análisis inmunolectroforético y la inmunodifusión radial para lograr la difusión del antígeno en un tiempo más corto (horas comparadas con días).(32).

Se aplica un volumen exacto de antígeno en la agarosa uniforme que contiene anticuerpo. Un campo eléctrico induce la migración de los complejos formados, apareciendo zonas de precipitación parecidas a cohetes en ascenso.(36).

La distancia final de migración del precipitado o la altura

del cohete esta relacionada cuantitativamente con la concentración del antígeno aplicado.(13).

Convencionalmente la inmunolectroforesis se realiza a pH 8.6, debido a que la migración anódica del anticuerpo a este pH está contrabalanceado por el flujo electroendosmótico.(39).

La técnica cuantitativa clásica no puede ser aplicada sin modificaciones a los antígenos que tengan migración electroforética idéntica o casi idéntica a aquella de los anticuerpos o a los antígenos que no son estables a pH 8.6.(39). Con el propósito de alterar las movilidades de las inmunoglobulinas de los pacientes o de los anticuerpos específicos usados en el gel se describió el método de carbamilación.(13,32).

La carbamilación se introdujo como una modificación al método de Electroinmunoensayo, lográndose con esto disminuir el tiempo de corrimiento de 2-10 horas a 30 minutos.(36,40). El grado de carbamilación depende de la concentración del cianato de potasio, el pH de la solución, el tiempo de reacción y la temperatura.(40).

Una carbamilación de inmunoglobulinas conveniente para el método de inmunolectroforesis de Laurell puede lograrse cuando se dejan reaccionar un volumen de suero y dos volúmenes de cianato de potasio 2 M a temperatura ambiente por

18 horas.(40).

Otros autores sugieren mezclar volúmenes iguales de la muestra de inmunoglobulina y cianato de potasio recientemente preparado, incubarlo a 45°C por 20 minutos, enfriar la mezcla entre $10-15^{\circ}\text{C}$ en baño de agua y diluirla con el buffer, para lograr la concentración deseada.(44).

Se pueden usar solventes tales como agua destilada, buffer barbital o cloruro de sodio 0.2-0.5 M para disolver el cianato de potasio, debido a que no se observa diferencia en los mismos.(40).

Básicamente existen dos tipos de electroforesis clasificados de acuerdo a su voltaje:(42)

1) La electroforesis de alto voltaje, la cual requiere de aproximadamente 280 volts y un campo de fuerza de 7-10 V/cm (dependiendo del antisuero que contenga el agar); una corriente por cámara de 40 miliamperes (para dos placas de 10 X 10 cm), un tiempo de corrimiento de aproximadamente 3 horas y el sistema de enfriamiento para mantener una temperatura de 15°C .

2) Electroforesis de bajo voltaje, el electroinmunoensayo puede ser llevado a cabo en campos de fuerza de 2-3 V/cm. En este caso el tiempo de electroforesis es aproximadamente de 8-16 horas (toda la noche). El voltaje será de 80 V y la corriente por cámara (dos placas de 10 X 10 cm) de 10 miliamperes.

Para realizar la conexión entre el buffer y el gel se pueden usar: algodón, papel o esponja. Para todos los contactos parece ser que la resistencia y por lo tanto la producción de calor durante la electroforesis aumenta, conforme la distancia del gel al buffer es mayor.(32).

En lo que concierne a la altura alcanzada por los cohetes es recomendable que se encuentre en un rango aproximado de 6 mm (concentración más baja) a 20 mm (concentración más alta).(32).

Cuando aparecen cohetes muy pequeños, lo cual interfiere en su lectura precisa, se trata de sueros de pacientes que deberán repetirse con una dilución más baja. En cambio, si no se observa la terminación del cohete, significa que la concentración de la inmunoglobulina es muy alta y la prueba deberá repetirse usando diluciones más altas del suero del paciente.(32).

Además se deben tener en cuenta las fuentes de error más comunes de este método:(32,42,43)

1) Condensación excesiva en la superficie inferior de la cubierta de la cámara. Esta condensación surge de la evaporación del agua de la placa de gel durante la electroforesis como resultado del sobrecalentamiento de la capa

de gel; esto ocurre debido a el uso de una corriente muy alta, al utilizar agua no destilada y al no mantener el enfriamiento adecuado.

2) Para la elaboración de la placa y la colocación de la muestra sobre la misma es conveniente evitar lo siguiente:

a) dejar la placa en una cámara no húmeda, ya que afectaría su superficie.

b) una consistencia y grosor inadecuados de la agarosa, ya que si el gel es muy grueso, se formarán gradientes de temperatura de tal manera que se impida la precipitación. Por el contrario, si el gel es muy delgado, las irregularidades de la superficie serán críticas, dificultando la cuantificación.

c) derramar la muestra o estándares fuera de los orificios.

d) hacer orificios muy pequeños, muy grandes e irregulares, ya que habría exceso de antígeno o anticuerpo.

e) llenar orificios incompletos o con burbujas, lo cual produce cohetes secundarios.

f) dañar los orificios al momento de llenarlos, ya que repercute en el tamaño y forma de los precipitados.

g) al momento de hacer la agarosa conteniendo el antisue-ro, es necesario mantener la temperatura por debajo de 60°C , ya que a esta temperatura el antisue-ro sufre inactivación. Si no se toma la precaución anterior, los resultados se verán alterados.

h) un tiempo prolongado entre la aplicación de las muestras y el inicio de la electroforesis, produce cohetes cortos y ensanchados en su base.

3) Condensación en la superficie del gel, causa precipitados confusos, cuando existe una gran diferencia de temperatura entre la placa de gel y la cámara (temperatura ambiente) bajo condiciones de humedad.

4) Precipitación nula debida al uso del antisuero incorrecto o ausencia de antisuero, uso de cantidades excesivas de antígeno o anticuerpo, transposición del ánodo y el cátodo y al efectuar un mal contacto entre el papel filtro y la superficie del gel.

5) La aparición de diversos precipitados por el uso de antígenos electroforéticamente heterogéneos y/o con identidad inmunológica parcial. Además cuando suceda una prolongada interrupción de la corriente durante la electroforesis.

6) Precipitados no paralelos a la dirección de la corriente debido a mal contacto entre el papel filtro y la superficie del gel, al grosor no uniforme de la capa de agar, a la colocación incorrecta de las placas y a la longitud inadecuada del papel filtro.

7) Picos doblemente contorneados (fenómeno de túnel), fenómeno debido a diferencias relativamente altas de temperatura entre la superficie del gel y la superficie del contacto entre el gel y la placa de vidrio.

En nuestro trabajo se utilizó la electroforesis de alto voltaje, con previa carbamilación de las muestras, lo cual redujo aun más el tiempo que requiere la técnica común.

Debemos hacer notar que los resultados fueron logrados en base a condiciones diferentes de las establecidas con anterioridad, condiciones que corresponden a una corriente por cámara de 30 miliamperes con un campo de fuerza de 7.5 V/cm. Debido a que no fue posible alcanzar las condiciones óptimas establecidas, se vió la necesidad de modificar el tiempo de corrimiento (45 minutos).

En lo que respecta a la carbamilación, se eligió el método de dilución de volúmenes iguales de la muestra de inmunoglobulina y cianato de potasio porque observamos que con éste obteníamos mejores resultados. El cianato de potasio se diluyó con agua destilada debido a su alta solubilidad en la misma. La solución es estable durante una semana a 4°C.(40).

En el trabajo realizado se utilizó papel filtro, gracias al cual, junto con la agarosa de las placas, se logró una

resistencia adecuada para el circuito electroforético. Se observó que al utilizar cinco papeles filtro (Whatman # 1) se obtenía el equilibrio entre la corriente por cámara y el campo de fuerza.

Durante los primeros ensayos electroforéticos los cohetes que obtuvimos fueron de un tamaño muy pequeño, por lo cual procedimos a diluir el suero. La dilución fue de 1:2, correspondiente a una mezcla de un volumen de suero con un volumen de agua destilada.

En el caso de los estándares no hubo necesidad de realizar dicha dilución.

Después de obtener la altura de los cohetes se procedió a graficar dicha altura contra la concentración, con motivo de obtener una curva lineal estándar, la cual nos indica que se logró la estandarización de la inmunoglobulina en cuestión.

Al llevar a cabo la medición de la altura de los cohetes, los valores obtenidos se encontraron en el rango de alturas antes mencionado, por lo cual consideramos que nuestro estudio fue satisfactorio.

En lo que se refiere a la muestra problema, se obtuvo el valor de su concentración de inmunoglobulina A, interpo-

lando el dato de la altura del cohete en la curva de calibración, para luego multiplicar la concentración correspondiente por su factor de dilución, 2.

El valor obtenido se localizó dentro del rango de los valores normales para dicha inmunoglobulina.

Así se pudo comprobar el éxito de nuestra estandarización.

Queremos hacer notar que la modificación al método (Carbamilación) es de suma importancia cuando se trata de realizar exámenes de rutina, ya que éstos requieren de un lapso corto de tiempo.

Tomando en cuenta la importancia clínica que representa la cuantificación de las inmunoglobulinas, consideramos que los logros obtenidos en nuestra estandarización del método de Electroinmunoensayo serán de gran ayuda para investigaciones futuras.

En la actualidad, la población mundial se ve constantemente afectada por enfermedades que involucran inmunoglobulinas, es por tanto deseo nuestro que el presente trabajo sea útil para diagnosticarlas y de esta manera contribuir en parte al bien de la humanidad.

R E S U M E N

En este estudio se logró la estandarización del método Electroinmunoensayo para la cuantificación de la inmunoglobulina A sérica.

Se utilizaron tres estándares de concentración conocida de dicha inmunoglobulina para llevar a cabo la curva de calibración.

Sólo se utilizó una muestra problema para comprobar el éxito de nuestro trabajo, lo que se logró al obtener una concentración dentro de los valores de los estándares utilizados.

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

1. Bellanti, J.A. Inmunología. Editorial Interamericana, México.
2. Weiser, R.S., Myrvik, Q.N. y Pearsall, N.N. 1970. Inmunología. Editorial Interamericana, México.
3. Davidsohn, I. y Henry, J.B. 1978. Todd-Sanford, Diagnóstico clínico por el laboratorio. 6a Ed. Salvat Ediciones, España.
4. Stoop, J.W., Zegers, B.J.M., Sander, P.C. and Ballieux, R.E. 1969. Serum immunoglobulin levels in healthy children and adults. Clin. exp. Immunol. 4:101-112.

5. Kabat, E.A. 1976. Structural concepts in immunology and immunochemistry. 2nd Ed. Editorial Holt, Rinehart and Winston, U.S.A.
6. Hopper, J.E. and Cera, L. 1978. The structure of human immunoglobulins. Ann. Clin. lab. Sci. 8:201-208.
7. Bach, F.H. and Good, R.A. 1976. Clinical immunobiology. vol. 3. Editorial Academic Press, U.S.A.
8. Franklin, E.C. 1976. Some impacts of clinical investigation on immunology. The New England Journal of Medicine. 294:531-537.
9. Rowe, D.S. 1972. Concentration of serum immunoglobulins in healthy young adult males estimated by assay against the international reference preparation. The Lancet. 1232-1233.
10. Alarcón-Segovia, D. and Fishbein, E. 1970. Demography of serum immunoglobulins differences in IgG and IgM levels in two normal mexican adult populations. Clin. Sci. 39:467-473.
11. Jacobson, K.W. and de Shazo, R.D. 1979. Selective immunoglobulin A deficiency associated with nodular lym-

- phoid hiperplasia. J. Allergy Clin. Immunol. 64:
516-521.
12. Stiehm, E.R. and Fudenberg, H.H. 1966. Serum levels of immunoglobulins in health and disease: A survey. Pe
diatrics. 37:715-727.
13. Gilliland, B.C. 1977. Immunologic quantitation of se-
rum immunoglobulins. Am. J. Clin. Pathol. 68:664-670.
14. 1967. Influence of sex on immunoglobulins levels. Na-
ture. 214:1224.
15. Allansmith, M., McClellan, B. and Butterworth, M. 1967.
Stability of human immunoglobulins levels. Proc. of
the Soc. for Exp. Biol. Medicine. 125:404-407.
16. Vera, E.J. and Roche, M. 1956. A note on the distribu-
tion of the serum protein fractions in apparently
normal persons in Caracas. J. Lab. and Clin. Med.
47:418-422.
17. Zegers, B.J.M., Stoop, J.W., Reerink-Brongers, E.E.,
Sander, P.C., Aalberse, R.C. and Ballieux, R.E.
1975. Serum immunoglobulins in healthy childrens
and adults. Levels of the five classes, expressed
in international units per mililitre. Clin. Chim.
Acta. 65:319-329.

18. Grunbacher, F.J. 1974. Heritability estimates and genetic and environmental correlations for the human immunoglobulins G, M and A. *Am. J. Hum. Genet.* 26: 1-12.
19. Allansmith, M., McClellan, B. and Butterworth, M. 1969. The influence of heredity and environment on human immunoglobulins levels. *J. Immunol.* 102:1504-1509.
20. Maddison, S.E., Stewart, C.C., Farshy, C.E. and Reimer, C.B. 1975. The relationship of race, sex and age to concentrations of serum immunoglobulins expressed in international units in healthy adults in the U.S.A. *Bull. World Health Organ.* 52:179-183.
21. Radl, J., Sepers, J.M., Skvaril, F., Morell, A. and Hijmans, W. 1975. Immunoglobulin patterns in humans over 95 years of age. *Clin. exp. Immunol.* 22:84-90.
22. Buckley, C.E. and Dorsey, F.C. 1970. The effect of aging on human serum immunoglobulin concentrations. *J. Immunol.* 105:964-971.
23. Lyngbye, J. and Kroll, J. 1971. Quantitative immunoelectrophoresis of proteins in serum from a normal population: season, age and sex-related variations. *Clin.*

Chem. 17:495-500.

24. Rowe, D.S., Grab, B. and Anderson, S.G. 1972. An international reference preparation for human serum immunoglobulins G, A and M: content of immunoglobulins by weight. Bull. Wld. Hlth. Org. 46:67-79.
25. Uffelman, J.A., Engelhart, W.E. and Jolliff, C.R. 1970. Quantitation of immunoglobulins in normal children. Clin. Chim. Acta. 28:185-192.
26. Sinkov, D., Tolev, V. and Stereva, T. 1973. Concentration of IgG, IgA and IgM in terms of international units in the sera of healthy individuals. Bull. Wld. Hlth. Org. 49:217-218.
27. Veys, E.M. and Claessens, H.E. 1968. Serum levels of IgG, IgM and IgA in rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 27:431-439.
28. Trapani, Ignatius, L. 1969. Environment, infection and immunoglobulin synthesis. Federation Proceedings. 28:1104-1106.
29. Cawley, Leo P. 1979. Electrohoresis workshop program. Am. Soc. Clin. Pathol. , U.S.A.

30. Giangiacomo, J., Cleary, T.G., Cole, B.R., Hoffesten, P. and Robson, A.M. 1975. Serum immunoglobulins in the nephrotic syndrome. The New England Journal of Medicine. 293:8-12.
31. Osserman, E.F. 1960. A modified technique of immunoelectrophoresis facilitating the identification of specific precipitin arcs. J. Immunol. 84:93-97.
32. Rose, N.R. and Friedman, H. 1976. Manual of clinical immunology. Editorial Board, U.S.A.
33. Kroll, J. 1969. Comparison of the antibody content in polyvalent antisera by an immunoelectrophoresis technique. Scand. J. clin. Lab. Invest. 23:227-230.
34. Kroll, J. 1969. Immunochemical identification of specific precipitin lines in quantitative immunoelectrophoresis patterns. Scand. J. clin. Lab. Invest. 24:55-60.
35. Christiansen, H. 1970. A new method for determination of insulin-binding immunoglobulins in insulin-treated diabetic patients. Horm. Metab. Res. 2:187-188.
36. Laurell, C.B. 1966. Quantitative estimation of proteins

by electrophoresis in agarose containing antibodies.
Analytical Biochemistry. 15:42-52.

37. Weeke, B. 1970. The serum protein identified by means of the Laurell cross electrophoresis. Scand. J. clin. Lab. Invest. 25:269-275.
38. Minchin-Clarke, H.G. and Freeman, T. 1968. Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. Clin. Sc. 35:403-413.
39. Bjerrum, O.J., Ingild, A., Lowenstein, H. and Weeke, B. 1973. Quantitation of human IgG, by rocket immunoelectrophoresis at pH 5 by use of carbamylated antibodies. A routine laboratory method. Clin. Chim. Acta. 40: 337-343.
40. Weeke, B. 1968. Carbamylated human immunoglobulins tested by electrophoresis in agarose and antibody containing agarose. Scand. J. clin. Lab. Invest. 21: 351-354.
41. Weeke, B. 1968. Quantitative estimation of human immunoglobulins following carbamylation by electrophoresis in antibody containing agarose. Scand. J. clin. Lab. Invest. 22:107-111.

42. Becker, W. and Sieber, A. Methods of qualitative immunoelectrophoresis. Behring Institute.
43. Nuño, M. 1978. Electro e Immunolectroforesis. Internacional Científica S.A., México.
44. Weir, D.M. 1978. Handbook of experimental immunology. 3th Ed. Blackwell Scientific Publications, Gran Bretaña. 19:32-34, 41.

801320