

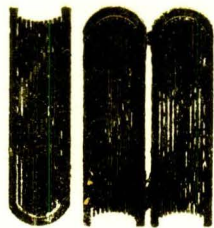
DCWE
#500 =

2102
134
134
134

UNIVERSIDAD DE MONTERREY

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES
Y EXACTAS

Clasif.
040.54
5677e
1982
C.1



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

Folio 801415

Título

ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE
ELECTROINMUNOENSAYO PARA LA
DETERMINACION
DE INMUNOGLOBULINA G. SERICA

REPORTE DEL PROGRAMA DE EVALUACION FINAL
QUE PRESENTA

Autor

PATRICIA SOBERON ESPINOSA

EN OPCION AL TITULO DE LICENCIADO
EN QUIMICA CON ESPECIALIDAD
EN ANALISIS CLINICOS

Vo. Bo.
[Signature]

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1982

Al tener la dicha de haber terminado mis estudios quiero, en primer lugar, darle gracias a Dios que me dió todos los medios para hacerlo: salud, cor- dura, entedimiento y voluntad.

Y al elaborar esta tesis, testigo de mis luchas y esfuerzos, quiero dedicarla muy especialmente a mis padres: Dr. Manuel Soberón Pérez y Sra. Blanca Oralia Espinosa de Soberón.

A ellos, que con su santo ejemplo supieron alen- tarme siempre, con su gran amor y comprensión. Y yo, al tratar de imitar su gran sentido de respon- sabilidad que los caracteriza y su gran calidad hu- mana, quiero hacer resaltar todas sus virtudes, pues sin ese apoyo, mi obra no estaría terminada.

A ellos pues, todas mis más fervientes alabanzas y el eterno agradecimiento de su hija

Patricia.

Agradezco infinitamente a la Srita. Q.F.B. Maricela Ramírez Benavides, quien además de haberme asesorado profesionalmente durante toda mi carrera y en la elaboración de esta tesis, fue mi amiga, me orientó en todos mis trabajos y fue mi maestra ejemplar; para ella toda mi admiración, mi cariño y eterno agradecimiento.

I N D I C E

	<u>Página</u>
Introducción.	1
Materiales y Método	15
Resultados.	25
Discusión y Conclusiones	29
Resumen	37
Bibliografía	38

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

La inmunidad se define como el conjunto de manifestaciones que un organismo vivo es capaz de desarrollar en su esfuerzo para adquirir un estado refractario frente a las infecciones. La ciencia conocida como Inmunología comprende el estudio de la inmunidad de los organismos vivientes a agentes perjudiciales, sea cual fuere el carácter de estos últimos. (1).

A fines del siglo XIX, se observó que el suero de animales que se habían inoculado experimentalmente con el bacilo de

la difteria, y posteriormente habían sanado de la enfermedad, poseía una substancia específica que tenía la facultad de neutralizar la toxina producida por Corynebacterium diphtheriae, agente causal del padecimiento. Ello probó que la inmunidad contra la difteria, adquirida a causa de la infección natural, depende de una substancia formada por el huésped que se opone específicamente al a agente nocivo. La substancia protectora se llamó anticuerpo (Ac) porque actuaba contra el cuerpo extraño perjudicial; a su vez el cuerpo extraño se llamó antígeno (Ag) porque estimulaba al huésped a la producción o síntesis de anticuerpos. (1).

Los anticuerpos fueron reconocidos por Tiselius y Kabat en 1937 como las globulinas gamma, de allí el nombre de inmunoglobulinas, con el cual se les conoce también actualmente, debido a que emigran más lentamente hacia el ánodo en un campo eléctrico a pH 8.6 que las denominadas alfa (α) y beta (β) globulinas. Estos investigadores demostraron que la fracción electroforética de las globulinas gamma contenían la mayoría de los anticuerpos séricos. Las inmunoglobulinas son una notable colección de moléculas protéicas, éstas proteínas comparten muchas similitudes antigénicas, estructurales y biológicas, y al mismo

tiempo poseen diferencias significativas en la secuencia primaria de aminoácidos, lo que hace posible una actividad biológica altamente específica para su función en la defensa del organismo. (1,2,3).

Al recopilarse conocimientos adicionales, se descubrió que la fracción "globulina gamma" del suero consistía por lo menos en cinco globulinas, cuya actividad de anticuerpo podía diferenciarse por análisis antigénico, y también en otros componentes sin actividad de anticuerpo. Estas globulinas se designan como clases de inmunoglobulinas con las siguientes abreviaturas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Estas abreviaturas significan "inmunoglobulina G", "inmunoglobulina A" y así sucesivamente. Otros autores anteceden a las letras G, A, M, D y E el símbolo γ , que indica su movilidad electroforética como gammaglobulina. (1,3).

Por medio del análisis antigénico ha sido posible detectar diferencias relativamente menores entre las moléculas de una clase dada de inmunoglobulina. De esta manera han sido encontradas cuatro subclases para la IgG, denominadas: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; así como también dos subclases de IgA y otras dos para la IgD, designadas como: IgA1 e IgA2, IgD1 e IgD2, respectivamente. (3).

La Tabla 1 muestra algunas propiedades fisicoquímicas de las diferentes clases de inmunoglobulinas, además de otras características que a continuación se mencionan.(3,4).

La IgG es la más abundante de las inmunoglobulinas, comprende aproximadamente el 75% de las inmunoglobulinas séricas; la composición relativa en suero de las cuatro subclases es: IgG1: 66%, IgG2: 23%, IgG3: 7% e IgG4: 4%. Alcanza concentraciones significativas tanto en el espacio vascular como en el extravascular. Esta molécula contribuye a la inmunidad en contra de muchos agentes infecciosos que tienen diseminación sanguínea, incluyendo bacterias, virus, parásitos y algunos hongos. Los receptores de tipo IgG se encuentran en monocitos humanos y algunos linfocitos. (3,5).

La IgA es la segunda inmunoglobulina en orden de abundancia, comprende aproximadamente el 20% de las inmunoglobulinas séricas; su función más importante la lleva a cabo en el sistema secretor externo. Este tipo de molécula es producida en altas concentraciones por el tejido linfoide que cubre el tracto gastrointestinal y las vías respiratoria y genitourinaria. En las secreciones producidas por éstas vías (por ejemplo: saliva, lágrimas) la IgA se

TABLA 1. Propiedades fisicoquímicas de las inmunoglobulinas

PROPIEDADES	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Cadena ligera	k, λ	k, λ	k, λ	k, λ	k, λ
Cadena pesada	γ	α	μ	δ	ε
Peso molecular	160,000	170,000 ^a	900,000 ^b	180,000	200,000
Coefficiente de sedimentación	7S	7S	19S	7S	8S
Movilidad electroforética	γ ₂ -lenta	γ ₁ -rápida	γ ₁ -rápida β ₂ -lenta	γ ₁ -rápida β ₂ -lenta	γ ₂ -lenta
Contenido hidratos de carbono (%)	2.9	7.5	11.8	-	10.7
Fijación del complemento	+ ^c	-	+	-	-
Transferencia placentaria	+	-	-	-	-
Fijación cutánea	-	-	-	-	+
Secresiones seromucosas	-	+	-	-	-
Anafilaxis cutánea pasiva	+	-	-	-	-
Semidesintegración (días)	23	6	5	2.8	2.4
Concentración (mg/100ml)	800-1600	50-250	40-120	0.5-3	0.01-0.04
Porcentaje de inmunoglobulinas séricas	75	15	7	0.2	

a. No agregado.

b. Se compone de 5 unidades IgM monoméricas o de un agregado de 5 tetrámeros.

c. Especificidad de tipo: G₁ y G₃ fijan bien el complemento, G₂ lo fija mal y G₄ no lo fija en absoluto.

combina con una proteína llamada componente secretor que aparece para dotar a la molécula con alguna protección en contra de los efectos de enzimas proteolíticas que se encuentran en estas regiones. No obstante que la IgA no atraviesa la placenta, contribuye a la inmunidad del recién nacido gracias a su alta concentración en el calostro.(3).

La IgM, por ser la molécula más grande de las inmunoglobulinas, esta estrictamente restringida al espacio intravascular. Además de que es altamente aglutinadora de partículas antigénicas como bacterias y eritrocitos, esta molécula tiene gran importancia por ser la primera en aparecer cuando un antígeno se introduce por vez primera en un huésped. (3).

La función biológica de la IgD no ha sido definida hasta ahora, pero está bajo intensa investigación. Se sabe que la IgD se encuentra en la superficie de los linfocitos, particularmente en neonatos. (3).

La IgE es un anticuerpo reagínico y su concentración en suero es extremadamente baja. Esta molécula se ha popularizado por su propiedad de mediar las reacciones de hipersensibilidad inmediata. Así como la IgA, la IgE se produ

ce principalmente en el tejido que cubre las vías respiratoria e intestinal. (3).

Los modelos diseñados para comprender la estructura molecular de las inmunoglobulinas se deben fundamentalmente a los trabajos de Edelman y Porter. Porter trató anticuerpos con papaína, una enzima proteolítica que dividía las moléculas de anticuerpo en tres fragmentos: dos de los cuales retenían la actividad de anticuerpo y uno que poseía la mayor semejanza antigénica de gammaglobulina. Posteriormente Edelman demostró que las inmunoglobulinas eran estructuras de varias cadenas y Porter propuso un modelo de inmunoglobulina de cuatro cadenas. (2,3).

La estructura general de las inmunoglobulinas se dará a continuación, enfatizando la correspondiente a la IgG, que es la inmunoglobulina de especial interés en éste trabajo.

La IgG es un polipéptido de cuatro cadenas, dos de éstas son pequeñas, tienen un peso molecular aproximado de 22,000 y son llamadas cadenas ligeras (L). Las otras dos cadenas tienen un peso molecular de 55,000 y son llamadas cadenas pesadas (H). Las cadenas "H" están unidas en-

tre sí por enlaces disulfuro, así mismo las cadenas "L" están ligadas a las cadenas "H" con el mismo tipo de enlace.

Cada molécula de inmunoglobulina tiene dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras también idénticas.

Un tipo químicamente diferente de cadena pesada existe para cada una de las cinco clases de inmunoglobulinas y se denominan como gamma (γ) para la IgG, alfa (α) para la IgA, miu (μ) para la IgM, delta (δ) para la IgD y epsilon (ϵ) para la IgE.

Se han encontrado dos tipos diferentes de cadenas ligeras que son llamadas kappa (κ) y lambda (λ), y éstas son las mismas para todas las clases de inmunoglobulinas.(5).

Como se mencionó anteriormente, las moléculas de inmunoglobulinas pueden romperse al ser atacadas por enzimas proteolíticas como la papaína o la pepsina, resultando así dos fracciones: una de ellas que puede cristalizarse, llamada "Fc", que está constituida por restos de cadenas "H"; la otra, que por unirse con el antígeno se denomina "Fab" está formado por restos de cadenas "H" y "L". Cada

molécula de inmunoglobulina contiene regiones que poseen una secuencia variable de aminoácidos. Estas regiones variables están localizadas en las porciones N-terminal de las cadenas "H" y "L", y el sitio activo de anticuerpo reside en esta área. Las regiones variables de las cadenas "H" y "L" son designadas V_H y V_L respectivamente. Por otra parte existen regiones constantes de las cadenas "H" y "L", llamadas así por su secuencia constante de aminoácidos, y éstas se conocen como C_H y C_L . La secuencia de la región C_H esta dividida en dominios, que se designan: C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} y C_{H4} . La porción C_H es la región específica para cada clase de inmunoglobulina y posee una importante actividad biológica designada por Edelman como funciones "efectoras" de inmunoglobulinas. (2,3,5).

Además las moléculas de las inmunoglobulinas poseen una región "bisagra" , localizada en la parte media de las cadenas "H", la cuál como su nombre lo indica, provee la propiedad de flexibilidad de posición a la porción "Fab" de la molécula. En la IgG e IgA esta flexibilidad parece ser el resultado de una secuencia rica en prolina en la región "bisagra". (5).

En la actualidad los métodos para la cuantificación de las inmunoglobulinas ha tomado parte importante en los estu-

dios inmunológicos. Estos métodos inmunoquímicos están basados en la precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo sobre agarosa o agar gel. (6).

En 1957 Feinberg implantó una técnica de difusión en gel con anticuerpo incorporado al agar. En 1965, este método fué modificado por Mancini y cols., y consiste en que el antígeno es colocado en unos orificios previamente hechos sobre una placa de gel, en la cual el antisuero ha sido distribuído uniformemente durante su preparación. El antígeno difunde de estos orificios, produciéndose así áreas circulares de precipitado. El diámetro del anillo de pre cipitado es proporcional a la concentración del antígeno. (6,7).

Además del método anterior existen muchos otros, siendo el de interés en esta investigación el método descrito por Laurell en 1966, conocido como inmunolectroforesis de "coquete", también llamado electroinmunoensayo.

Esta técnica es simple, rápida y precisa y se utiliza pa ra estimar la concentración de una sola proteína en una mezcla. El método está basado en la migración eléctrica de antígenos dentro de un gel que contiene anticuerpos.

Esto origina una inmunoprecipitación específica de los antígenos por medio del correspondiente precipitante, en la que cada sistema antígeno-anticuerpo formará un precipitado individual.

Seleccionando las condiciones de la electroforesis, las moléculas de anticuerpo no se moveran en el gel, pero sí las moléculas de antígeno.

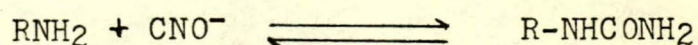
Al inicio de la electroforesis, las moléculas de antígeno migrarán dentro del gel que contiene los anticuerpos; como el número de moléculas de antígeno excede inicialmente al número de moléculas de anticuerpo, se formarán pequeños inmunocomplejos. Estos complejos continúan la migración con una velocidad baja en el gel. Al continuar la electroforesis, se formarán más complejos, hasta que suficientes anticuerpos se han unido para que la precipitación ocurra.

Se obtiene un precipitado en forma de "coquete" porque como se mencionó anteriormente, el número de moléculas de anticuerpo es menor que el de los antígenos cuando éstos inician la migración desde los orificios al interior de la agarosa. Los inmunocomplejos migran hacia el ánodo y aumenta su concentración continuamente durante la electroforesis,

hasta alcanzar el punto de equivalencia para la precipitación; al principio se forma el precipitado en la parte inferior y posteriormente hacia arriba, formándose un "cohete". Al final, los inmunocomplejos del centro formarán también un precipitado, haciendo que el "cohete" sea homogéneo. La altura alcanzada por el "cohete" está relacionada directamente a la concentración del antígeno en la muestra.

En general, sólo aquellas proteínas que tienen una gran velocidad electroforética anódica pueden valorarse por esta técnica. Estas velocidades de migración anódica pueden aumentarse para muchas proteínas por medio de una carbamilación. Empleando este procedimiento ha sido posible determinar las inmunoglobulinas. (8).

El método de carbamilación hace posible que la migración anódica de muchas proteínas se vea incrementada. La reacción es la siguiente:



En este proceso los grupos amino son convertidos en grupos carbamilaminos por reacción con el cianato. Los grupos carbamilaminos en contraste con los grupos amino son

virtualmente no básicos.

Los valores normales de las inmunoglobulinas fueron proporcionados anteriormente en la Tabla 1. Estos valores se ven afectados cuando la persona se encuentra en algún estado patológico. (8).

Existen reportes donde se menciona que los valores de las inmunoglobulinas se ven afectados por la edad, sexo y raza. En el caso específico de la IgG, se ha observado que su concentración en suero es marcadamente más elevada en la raza negra que en la blanca. Con respecto al sexo no hubo diferencias significativas en hombres y mujeres, sin embargo, los niveles de IgM en el sexo femenino fueron más altos que en el masculino. (9,10).

La deficiencia de las tres inmunoglobulinas principales (G, A y M) es evidente en casos de agammaglobulinemia congénita ligada al sexo. Por el contrario, el exceso de inmunoglobulinas ocurre durante la proliferación de células plasmáticas neoplásicas. (11).

Por otra parte se han hecho estudios con respecto a las inmunoglobulinas citadas anteriormente en síndromes nefró

ticos, dando como resultado niveles muy reducidos de IgG, concentración normal de IgA y el nivel de IgM incrementado. Esto es fácilmente comprensible si tomamos en cuenta que la IgG se ha encontrado en orina de pacientes con dichos síndromes y que la pérdida en orina de esta proteína contribuye en parte a que su nivel se encuentre reducido en el suero, estimulando así la síntesis de anticuerpos, con acumulación en suero de IgM, la cual, debido a su alto peso molecular es incapaz de atravesar la barrera glomerular para ser excretada. (12).

Además se ha observado que la concentración de IgG aumenta en enfermedades como cirrosis hepática y dicho nivel disminuye en disgammaglobulinemia y enteropatías con pérdida de proteínas. (4).

La finalidad específica de este trabajo es la estandarización del método de Laurell o electroinmunoensayo para determinar la concentración de IgG en suero.

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

En este estudio se realizó la estandarización de la IgG sérica por medio del método de electroinmunoensayo, llevándose 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 1982.

Para determinar la concentración de IgG en una muestra

problema por medio del método de electroinmunoensayo, fué necesario utilizar estándares con una concentración conocida de IgG, para construir una gráfica que relacionara la concentración de dichos estándares y la altura del "coquete" alcanzada por los mismos.

Los estándares utilizados en este trabajo fueron los siguientes:

Estándar No. 1: 44 mg/100ml.

Estándar No. 2: 98 mg/100ml.

Estándar No. 3: 194 mg/100ml.

La concentración de los estándares citados anteriormente no corresponde a los valores normales de la IgG en suero, por tal motivo fué necesario diluir la muestra problema (1:10) y después de obtener su concentración, multiplicarlo por el factor de dilución correspondiente.

MATERIALES.

a) Cámara electroforética.

Esta consiste en una cámara protectora de plástico trans

parente que como su nombre lo indica, sirve para proteger los posibles contactos con el aparato cuando éste está en funcionamiento. Dentro de esta cámara protectora se encuentran dos compartimientos para el buffer de pH 8.6 y tienen una capacidad suficiente de un litro, volumen que es adecuado para prevenir cambios de pH durante la electroforesis. Los electrodos de platino se encuentran sumergidos dentro del buffer y con unas tiras de papel filtro que van desde la superficie de la agarosa hasta hacer contacto con el buffer, se cierra el circuito electroforético. Las placas con agarosa se colocan sobre una placa enfriadora, a la cual se le conecta un reciclador de agua a una temperatura de 10°C.

b) Fuente de poder.

La corriente deberá aplicarse por medio de una fuente de poder con voltaje estabilizado. Un rendimiento de 250-300 Volts generalmente da lugar a 8-10 V/cm de gel. El voltaje en el gel se mide por medio de un pequeño voltímetro, colocando el par de electrodos de prueba en los extremos del gel. Estos electrodos de prueba tienen una longitud de 4 cm, por lo tanto, el voltaje en el gel podrá tener un rango de variación de 0-25 V/cm.

El amperaje se mide por medio de un amperímetro, teniendo una escala de 0-100 miliamperes.

c) Accesorios.

Perforador de gel. Estos consisten en tubos de acero inoxidable y con ellos se hacen los orificios en el gel, ya que deberán ser de igual tamaño. Los perforadores tienen diferentes diámetros y el escogido dependerá del volumen de la muestra que deba ser aplicada. El diámetro del perforador utilizado en esta investigación fué de 2.5 mm correspondiente a un volumen de 5 μ l de muestra.

Plantilla. La plantilla consiste en un plato base donde se coloca la placa con agarosa y sobre ella queda una pieza en forma de puente con orificios. Estos orificios sirven como guía para perforar el gel. Esto permite cortar las cavidades de lado a lado y significa una ventaja muy importante, principalmente en esta investigación, donde la misma línea base de las cavidades sirve para la medición.

Placas de vidrio. Las placas de vidrio pueden variar en tamaño, pueden usarse de 10 X 5 cm para 8 ml de agarosa,

y de 10 X 10 cm para 15 ml de agarosa, quedando así aproximadamente 1.5 mm de grosor en la agarosa.

Las placas se lavan con detergente, enjuagando después con agua destilada, posteriormente con etanol y se enjuagan nuevamente con agua destilada. Deben estar secas antes de usarse.

Las placas utilizadas en este trabajo fueron de 10 X 10 cm. Las placas ya limpias y secas se colocan sobre una superficie plana y nivelada y sobre ellas se colocan 14 ml de agarosa conteniendo el antisuero específico (anti-IgG) necesario para tener una concentración de 1.5%. La agarosa fundida, antes de agregar el antisuero deberá tener una temperatura de 56°C para evitar que éste se inactive.

Después de 15 min, tiempo necesario para que la agarosa solidifique, se procede a hacer los orificios sobre la agarosa.

METODO.

a) Carbamilación.

La carbamilación se lleva a cabo colocando en un tubo de ensaye un volumen de muestra o estándar de concentración conocida con dos volúmenes de cianato de potasio 2M recientemente preparado y se deja reaccionar por un período de 18-24 horas.

b) Electroforesis.

Una vez preparadas las placas conteniendo el antisuero específico y habiendo solidificado la agarosa, se procede, como se mencionó anteriormente, a hacer los orificios donde deberá colocarse la muestra. En estos orificios se colocan los estándares de concentración conocida y las muestras problema, e inmediatamente después se colocan las placas sobre la cámara enfriadora, colocando sobre la agarosa el papel filtro, de tal manera que este quede colocado aproximadamente a un centímetro del extremo de la placa y haciendo contacto con la solución buffer. Se conecta el sistema enfriador y se aplica el voltaje requerido (280-300V) durante una hora. Después de transcurri-

do este tiempo, se retiran las placas de agarosa para efectuar los siguientes pasos.

c) Desproteínización.

Colocar las placas de agarosa en una solución buffer de fosfatos (PBS) durante 12-18 horas con el propósito de remover las proteínas no precipitadas.

d) Tinción.

Las placas se colocan en una solución colorante por un período de 20 minutos después de los cuales se lavan con agua destilada.

e) Decoloración.

Las placas coloreadas se colocan en una solución decolorante durante 20 minutos y transcurrido este tiempo se sacan y se enjuagan con agua destilada.

Los precipitados obtenidos se miden desde el centro del orificio donde se colocó la muestra y los estándares hasta la altura máxima alcanzada por el "coquete".

De esta forma se construye una gráfica que relacione la concentración de los estándares con la altura alcanzada por los "cohetes".

Por medio de esta curva de calibración es posible determinar la concentración de IgG en muestras problema, interpolando la altura del "cohetes" alcanzada por la muestra y observando a la concentración que corresponde, multiplicando ésta por su factor de dilución.

REACTIVOS.

(R.1) Buffer barbital.

Barbital de sodio (5,5-dietilbarbiturato de sodio)-41.2gr

Barbital (ácido 5,5-dietilbarbitúrico) - - - - - 8.0gr

Se mezclan los reactivos anteriores con agua destilada y se afora a 10 litros. Se ajusta el pH a 8.6 si es necesario con HCl 0.1N o con NaOH 0.1N. La solución se conserva en un frasco ámbar.

(R.2) Agarosa al 1%.

Agarosa - - - - - 1.0 gr

Buffer barbital - - - - - 100 ml

Se disuelve la agarosa por calentamiento en el buffer barbital.

(R.3) Agarosa conteniendo antisuero IgG.

Antisuero IgG - - - - - 0.5 ml

Agarosa al 1% c.b.p.- - - - - 32 ml

El antisuero se mezcla con la agarosa a una temperatura de 56°C.

(R.4) Cianato de potasio 2M.

KOCN - - - - - 4.05 gr

Agua destilada c.b.p. - - - - - 25 ml

Se disuelve el KOCN en agua destilada.

(R.5) Buffer de fosfatos (PBS).

Cloruro de sodio - - - - - 8.0 gr

Cloruro de potasio - - - - - 0.2 gr

Fosfato de sodio dibásico - - - - 1.15 gr

Fosfato de potasio dibásico - - - 0.2 gr

Aforar a 1000 ml con agua destilada.

(R.6) Solución colorante Kenacid Blue R.

Kenacid Blue R - - - - - 1.0 gr

Acido acético - - - - - 100ml

Etanol - - - - - 450 ml

Agua destilada - - - - - 450ml

Se disuelve el Kenacid Blue R en la mezcla de solventes.

(R.7) Solución decolorante.

Acido acético - - - - - 100 ml

Etanol- - - - - 250 ml

Agua destilada - - - - - 650 ml

Se conserva en frasco ámbar con tapón esmerilado.

R E S U L T A D O S

En la estandarización del método de electroinmunoensayo para cuantificar la IgG sérica, fue necesario establecer las condiciones de dicha técnica y así lograr que los precipitados en forma de "cohete" fueran reproducibles.

Se hicieron variaciones tales como el grosor del papel filtro, el número de papeles filtro, la temperatura y el tiempo de corrimiento, los cuales hicieron posible determinar las mejores condiciones para obtener los precipitados en forma de "cohete":

Voltaje: 280 Volts.

Amperaje: 40 miliamperes.

Campo de fuerza: 9 V/cm.

Tiempo de corrimiento: 45 minutos.

Temperatura: 10°C.

Papel filtro: Whatman No. 1 (4 pliegos).

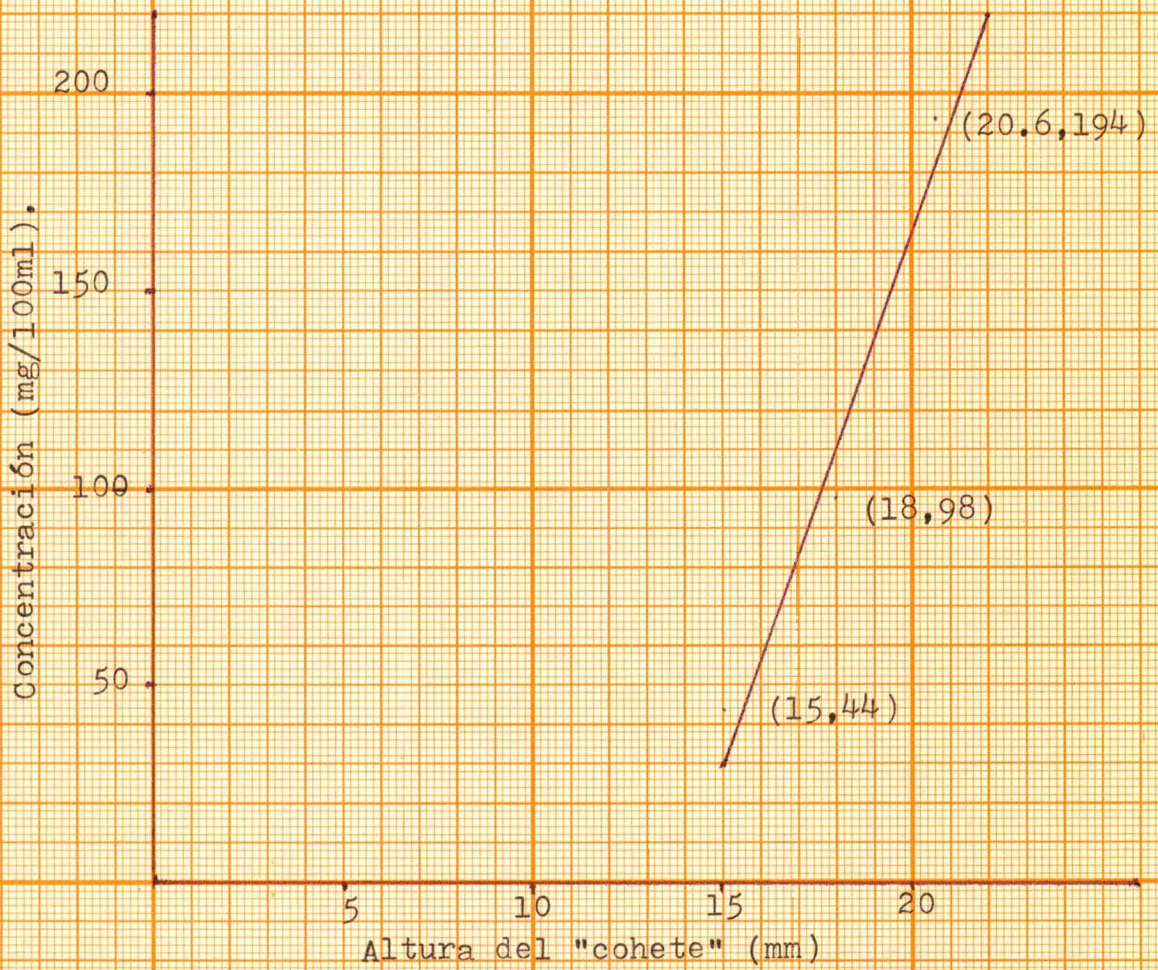
En estas condiciones se obtuvieron los resultados que se observan en la Tabla 2, lo que permitió construir una curva de calibración, relacionando la altura alcanzada por los "cohetes" de los estándares con la concentración de éstos, para posteriormente determinar la concentración de IgG sérica en cada muestra problema.

TABLA 2.

CURVA DE CALIBRACION DE LA IgG SERICA.

TIPO DE MUESTRA	FACTOR DE DILUCION	ALTURA DEL "COHETE" (mm)				CONCENTRACION (C) (mg/100ml)	C X F (mg/100ml)
		1°	2°	3°	Promedio		
Estándar No. 1	1	14	17	14	15	44	44
Estándar No. 2	1	16	22	16	18	98	98
Estándar No. 3	1	18	25	19	20.6	194	194
Muestra problema No. 1	10	17	-	-	17	82	820
Muestra problema No. 2	10	-	22	-	22	220	2200
Muestra problema No. 3	10	-	-	16	16	56	560

CURVA DE CALIBRACION PARA LA IgG SERICA.



DISCUSION Y CONCLUSIONES

La concentración de los estándares utilizados en este tr
bajo no correspondían a los valores normales de IgG en suer
ro, por lo cual fué necesario diluir la muestra problema
con el fin de incorporarla a la curva de calibración, para
después multiplicar el resultado por el factor de dilución.

Se hicieron varias diluciones de muestras problema, y se
observó que el "coquete" obtenido de la dilución 1:10 era
el mejor.

La carbamilación se realizó como una modificación al método de electroinmunoensayo. Esta tiene como objetivo aumentar la migración electroforética anódica de las proteínas y disminuir el tiempo de electroforesis.

Específicamente la IgG tiene una migración lenta a pH 8.6 y el precipitado que forma se extiende tanto anódica como catódicamente, por lo tanto es esencial la carbamilación para evitar al máximo este fenómeno.

La carbamilación puede llevarse a cabo en diferentes formas, entre ellas está la mezcla de volúmenes iguales de estándares o muestras problema con una solución 2M de cianato de potasio (KOCN), dejando reaccionar durante 24 horas; otros autores sugieren que ésta sea de un volumen de muestra y dos volúmenes de KOCN 2M, con un tiempo de reacción igual al anterior. Este tiempo de reacción puede disminuir si la carbamilación se lleva a cabo colocando volúmenes iguales de estándares o muestras problema con KOCN 2M, a una temperatura de 45°C durante 30 minutos. Para todos estos métodos de carbamilación es importante que el reactivo sea recientemente preparado.(8,14).

En este trabajo se carbamilaron los estándares y las mues

tras problema con el KOCN 2M en una relación de 1:2 volúmenes respectivamente, debido a que de esta forma los "cohetes" formados resultaron más homogéneos. La carbamilación es uno de los factores importantes que influyen para que ocurra una buena precipitación, debido a que aumenta la velocidad de migración electroforética de la inmunoglobulina.

La temperatura en el gel debe mantenerse constante, por lo tanto el calor desarrollado durante la electroforesis se eliminó mediante la cámara enfriadora, en la cual el agua recirculante se mantuvo a 10°C. Un aumento en esta temperatura trae como consecuencia que el amperaje aumente y por lo tanto el voltaje en el gel tendrá un valor mayor del requerido.

Los contactos usados para hacer conexión entre el buffer y el gel, generalmente están hechos de agarosa, algodón o papel. En este estudio se utilizaron los contactos de papel filtro (4 pliegos del Whatman No. 1). Para todos los contactos parece ser que la resistencia y por lo tanto la producción de calor durante la electroforesis aumenta conforme es mayor la distancia del gel al buffer, por lo que fué necesario establecer un tamaño adecuado del papel filtro (20 X 11 cm).

Las placas de vidrio utilizadas fueron de 10 X 10 cm, colocando sobre ellas 14 ml de agarosa conteniendo el antisuero a una concentración de 1.5%. El grosor de la capa de agarosa resulta ser de aproximadamente 1.5 mm, esto es importante, ya que si el gel es muy grueso se formarán gradientes de temperatura, de tal manera que se entorpece la adecuada precipitación. Por el contrario, si el gel es muy delgado, las irregularidades de la superficie serán críticas, perjudicando la precipitación.

La concentración del antisuero debe estandarizarse hasta alcanzar la concentración óptima de éste para que la precipitación ocurra de una forma satisfactoria.

La agarosa fundida antes de agregar el antisuero deberá tener una temperatura de 56°C, ya que si esta aumenta dará como resultado la inactivación del antisuero y consecuentemente se obtendrán falsos resultados.

Los orificios hechos sobre la agarosa fueron de un diámetro de 2.5 mm para 5 μ de muestra, teniendo una separación entre ellos de 5 mm.

La colocación de la muestra debe hacerse con precaución,

cuidando de que ésta no salga de los orificios; es importante también el tiempo que transcurre entre la colocación de la muestra y el inicio de la electroforesis, debido a que ésto trae como consecuencia la formación de anillos de difusión alrededor de los orificios.

Para proteínas con una alta velocidad de migración electroforética, se aplica un voltaje bajo, 70-100 V correspondiente a 2 V/cm de gel, durante toda la noche; y para proteínas con baja velocidad de migración, como es el caso de las inmunoglobulinas, se aplica un voltaje de 280-300 V, que genera 8-10 V/cm de gel durante 2-4 horas.(8).

El tiempo de electroforesis para la IgG se redujo considerablemente (45 min) ya que las proteínas estaban previamente carbamiladas.

Existen muchas técnicas para la desproteínización de las placas. Uno de ellos consiste en colocar las placas en solución salina fisiológica durante 24 horas, posteriormente secarlas con aire caliente y teñirlas. (16).

Por otra parte se recomienda poner sobre las placas un papel secante, ejerciendo una ligera presión sobre él du-

rante un período de 10-15 minutos después de lo cual se colocan las placas en una solución de NaCl 0.1M por 15 minutos para posteriormente teñirlas.(8).

Algunos autores sugieren que las placas se coloquen en una solución buffer de fosfatos (PBS) durante 24 horas y después cubrir las con papel filtro durante el mismo período de tiempo y teñirlas.(17).

En este trabajo se realizó una modificación de este último método; después de la electroforesis se colocaron las placas en PBS durante 12-18 horas y posteriormente se procedió a la tinción.

En la técnica de electroinmunoensayo las fuentes de error más comunes y que siempre se deben tener presentes para evitarlos, son los siguientes:

- 1.- La aplicación incorrecta de la muestra, como consecuencia de un volumen inadecuado de ésta o derramamiento sobre la placa con agarosa, dá como resultado la producción de "cohetes" secundarios.

- 2.- Largo período de tiempo entre la aplicación de la mues

tra y el inicio de la electroforesis, produciendo "cohetes" cortos y anchos en su base.

3.- El exceso de corriente o el enfriamiento no suficiente durante la electroforesis causaría la sequedad y distorsión de la capa de agarosa.

4.- Cambios de pH en la solución buffer.

5.- Un débil contacto entre el papel filtro y la agarosa causaría precipitados ondulados.

6.- Si las placas con agarosa no están colocadas paralelamente a la cámara electroforética, dará como resultado "cohetes" oblicuos.

7.- El grosor de la agarosa debe ser el mismo en toda la placa.

8.- Un corto período de tiempo de electroforesis dará como resultado precipitados irregulares.

9.- Diluciones inadecuadas de las muestras.

En los últimos años la Inmunología ha tenido avances importantes, entre ellos, las pruebas de laboratorio que permiten determinar la concentración de las diversas inmunoglobulinas séricas, por medio de las cuales es posible diagnosticar múltiples enfermedades.

Por lo tanto, por el esfuerzo realizado en esta investigación, mi gran satisfacción sería que este trabajo sirviera de guía y orientación para futuros diagnósticos de estados patológicos en el hombre.

R E S U M E N

Se realizó la estandarización del método de electroinmunoensayo de Laurell para la cuantificación de IgG sérica, utilizando tres soluciones de concentración conocida de la inmunoglobulina para la obtención de una curva de calibración.

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

- 1.- Weiser, R.S., Myrvik, Q.N. y Pearsall, N.N. 1970.
Immunología. Editorial Interamericana, México.
- 2.- Del Rey Calero, J. 1976. Microbiología e inmunología de las enfermedades infecciosas. Editorial Marbal, Madrid.
- 3.- Bellanti, J.A. 1978. Immunology II. 2nd ed. W.B. Saunders Co., USA.

- 4.- Davidsohn, I. and Henry, J.B. 1974. Todd-Sanford, Clinical diagnosis by laboratory methods. 15th ed. W.B. Saunders Co., USA.
- 5.- Hopper, J.E. and Cera, L. 1978. The structure of human immunoglobulins. Ann. Clin. Lab. Sci. 8: 201-208.
- 6.- Rowe, D.S., Anderson, S.G., and Grab, B. 1970. A research for human serum immunoglobulins IgG, IgA and IgM. Bull. W.H.O. 42: 535-552.
- 7.- Fahey, J.L. and McKelvey, E.M. 1965. Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody agar plates. J. Immunol. 4: 84-90.
- 8.- Nuño, M. 1978. Electro e inmunolectroforesis. Internacional Científica S.A., México.
- 9.- 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. W.H.O. 52: 179-183.

- 10.- 1967. Influence of sex on immunoglobulins levels.
Nature. 214: 1224.
- 11.- Uffelman, J.A., Engelhart, W.E. and Jolliff, C.R.
1970. Quantitation of immunoglobulins in normal
children. Clin. Chim. Acta. 28: 185-192.
- 12.- Giangiacomio, J., Clearly, T.G., Cole, B.R., Hoffesten,
P., and Robson, A.M. 1975. Serum immunoglobulins
in the nephrotic syndrome. N. Engl. J. Med. 293: 8-12.
- 13.- Weir, D.M. 1978. Handbook of experimental immunology.
3th ed. Blackwell Scientific Publications, Gran
Bretaña.
- 14.- Weeke, B. 1968. Quantitative estimation of human
immunoglobulins following carbamylation by elec-
trophoresis in antibody containing agarose. Scand.
J. Clin. Lab. Invest. 22: 107-111.
- 15.- Rose, N.R. and Friedman, H. 1976. Manual of clinical
immunology. Editorial Board, U.S.A.

16.- Minchin-Clarke, H.G. and Feeman, T. 1968. Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. Clin. Sc. 35: 403-413.