



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores
"CUAUTITLAN"

**"DESARROLLO DE UNA TECNICA CUALITATIVA Y UNA
CUANTITATIVA PARA LA DETERMINACION DE HCG
UTILIZANDO A LA BACTERIA Staphylo coccus
aureus".**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
SAUL TORRES ALCANTARA**



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

	PAGINA
Abreviaturas	1
Introducción	2
Planteamiento del problema	22
Objetivos	23
Material y métodos	24
Resultados	37
Discusión	55
Conclusión	59
Apéndice	60
Bibliografía	62

ABREVIATURAS

A	Absorbancia
BSA	Albúmina sérica bovina
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PBS-Tween	Amortiguador salino de fosfatos-Tween 20
AIE	Análisis inmunoenzimático
Ac	Anticuerpo
KD	Constante de disociación
D.O.	Densidad óptica
E-anti-HCG	Estafilococc-anti-HCG
FF	Fosfatasa alcalina
°C	Grados centígrados
g	Gramo
hrs	Horas
HCG	Hormona gonadotropina coriónica humana
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
l	Litro
ug	Microgramo
ul	Microlitros
mUI	Miliunidades internacionales
min	Minutos
M	Molar
RIA	Radioinmunoensayo
U.I.	Unidades Internacionales

INTRODUCCION

La hormona Gonadotropina Coriónica Humana (HCG), es una glicoproteína sintetizada inicialmente por las células trofoblásticas del blastocisto en desarrollo y después por las células sincitiotrofoblásticas de la placenta. Después de la concepción, se produce un rápido aumento en la cantidad de HCG en la orina aproximadamente a las 5 semanas de gestación, que alcanza los niveles máximos en un tiempo aproximado de 10 semanas de gestación. Es por esto que la HCG en la orina ha sido utilizada como uno de los parámetros para la confirmación y evaluación de embarazo por el laboratorio clínico. (1)

A medida que la producción de estrógeno y progesterona por la placenta aumenta durante el segundo trimestre, los niveles de HCG disminuyen, como se muestra en la fig. 1 (2).

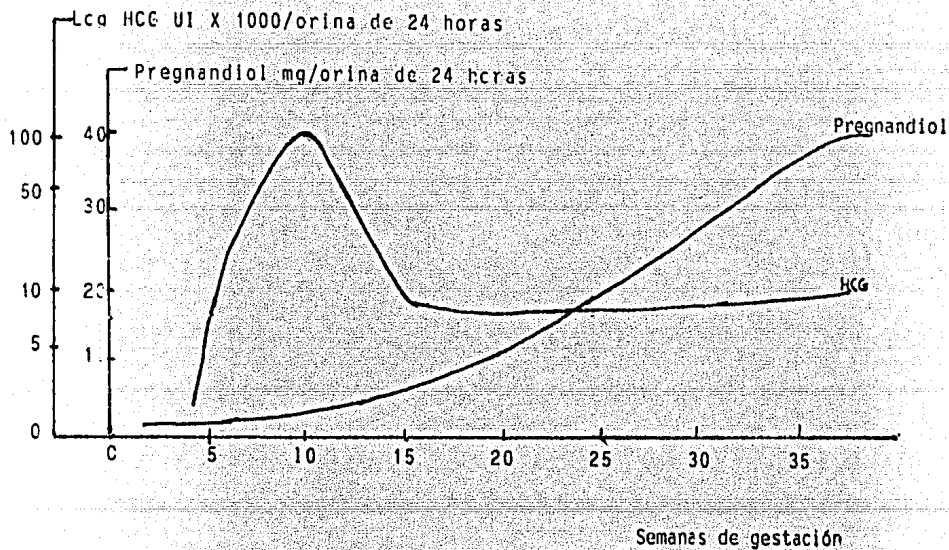


Fig. 1.- Niveles urinarios de gonadotropina coriónica humana (HCG) y pregnandiol durante el embarazo.

Durante las primeras etapas del embarazo, las pruebas cualitativas más sensibles para la determinación de HCG (1 UI/ml), resultan positivas a las 5 semanas después de la concepción y casi invariablemente son positivas a las 6 semanas de gestación. Las pruebas menos sensibles (5 UI/ml) resultan positivas cerca de 3 a 5 días más tarde después de las 6 semanas de gestación -- (1,12).

Ahora bien, los niveles de HCG fluctúan durante el embarazo y también en procesos patológicos. En el embarazo ectópico los niveles de HCG urinarios con frecuencia se encuentran por abajo de 0.3 UI/ml (3). Ya que niveles de -- HCG inferiores de 1 UI/ml, no se detectan por las pruebas usuales, es necesario utilizar pruebas más sensibles en estos casos.

Durante el primer trimestre la prueba cuantitativa de HCG puede ser útil como guía para el pronóstico de un posible aborto, como se indicó antes los niveles máximos de HCG se alcanzan normalmente hacia las 10 semanas de gestación y durante el embarazo normal puede esperarse niveles elevados de HCG, empezando en la 7a. semana y continuando hasta la semana 13. Durante este tiempo una cantidad inferior a 3000 UI/24 hrs. en la orina se asocia con un aborto inevitable. Inicialmente el aborto inevitable puede presentar niveles -- normales de HCG, con un descenso rápido a lo largo de varios días, por lo que se hacen necesarias las pruebas repetidas (4).

Clásicamente la prueba cuantitativa de HCG se considera muy importante en el diagnóstico de la mola hidatidiforme* que es un proceso neoplásico. A pesar de que algunas pacientes con dicha patología presentan niveles de HCG en la orina, extremadamente elevados hasta de 6 000 000 UI/l. (5), la mayoría muestra los valores correspondientes al embarazo normal y algunas presentan niveles relativamente bajos de HCG (5 UI/ml) (1).

* Ver apéndice.

Una vez que se ha realizado el diagnóstico de enfermedad trofoblástica, los niveles urinarios de HCG proporcionan un indicador excelente de la respuesta al tratamiento (6). Después de la expulsión de una mola hidatidiforme, el nivel en la orina de HCG debe descender a niveles no detectables en 7 días. Si dicho nivel no desciende, la mola no se ha eliminado por completo o se trata de un coriocarcinoma*. Se han descrito teratomas* testiculares y ováricos, seminomas* y carcinomas* embrionarios con niveles elevados de HCG en la orina, por esta razón las pruebas de HCG son útiles en la evaluación clínica de los tumores testiculares (1).

FUNCION DE HCG.- La menstruación en humanos suele ocurrir 14 días después de la ovulación, en el momento en que la mayor parte del endometrio secretor del útero se desprende de la pared uterina y es expulsado al exterior, si esto ocurriese después de haberse implantado un huevo, el embarazo se interrumpiría. La secreción de gonadotropina coriónica evita indirectamente que así acontezca. En el momento de la penetración trofoblástica del endometrio por parte del blastocisto en desarrollo, las células trofoblásticas secretan HCG hacia la circulación materna. La función de la HCG es semejante a la de la hormona luteinizante de la hipófisis anterior, su mayor importancia estriba en que impide la involución del cuerpo amarillo al fin del ciclo menstrual y permite que este cuerpo amarillo produzca grandes cantidades de hormonas como progesterona y estrógenos, a su vez éstas hormonas hacen que el endometrio uterino siga creciendo y almacenando grandes cantidades de elementos nutritivos (2).

ESTRUCTURA DE HCG.- La HCG está constituida de dos subunidades denominadas alfa y beta, que no son idénticas ni están covalentemente unidas. La subunidad beta de PM 30000 es característica de la hormona, mientras la subuni-

* Ver apéndice

dad alfa de PM de 18 000 es común a otras hormonas glucoproteicas como hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH), y hormona estimulante de la tiroides (TSH) (7).

La secuencia de la cadena polipeptídica beta-HCG tiene un alto grado de homología con la cadena beta-LH. 94 de los 115 residuos de la subunidad beta-LH (82%), son idénticos a la correspondiente subunidad beta-HCG, sin embargo, la subunidad beta HCG posee 30 residuos adicionales cercanos a el COOH terminal de la molécula que no se encuentra ni en la subunidad beta-LH ni en otras hormonas glucoproteicas (8).

Ninguna de las subunidades por separado posee actividad biológica en sistemas de ensayo convencional, ni se unen in vitro a las células o a las membranas, una parte importante de la actividad biológica es restaurada cuando se lleva a cabo la renaturalización de las cadenas alfa y beta de la HCG (9).

INMUNOENSAYOS PARA LA DETERMINACION CUALITATIVA DE HCG

Hay dos formas para detectar a la HCG, las que miden su actividad biológica, denominados bioensayos y las que miden su reactividad inmunológica conocidos como inmunoensayos.

Diversos bioensayos se habían utilizado para la identificación de HCG, empleando una variedad de parámetros como el aumento de peso de las gónadas y midiendo los cambios bioquímicos en el órgano blanco para estimar la potencia de gonadotropinas. La precisión, sensibilidad, reproducibilidad y especificidad de los bioensayos varía de acuerdo a la cepa de animales usados, y a la vía de administración de la hormona. Los procedimientos para medir la

respuesta del órgano, son demasiados largos para su uso clínico generalizado. Los inmunoensayos para la determinación de HCG han sustituido ampliamente a los bioensayos para el uso clínico habitual (10).

En 1960, Wide y Gemzell introdujeron la primera prueba inmunológica para la HCG basada en una inhibición de la hemaglutinación y desde entonces a la fecha se han desarrollado una gran variedad de inmunoensayos para HCG.

La mayoría de los ensayos "habituales" para la determinación de HCG en el embarazo, tienen una sensibilidad aproximada de 0.5 1.0 UI/ml. A estos ensayos se les denomina cualitativos y se considera cuantitativos a aquellos que poseen una mayor sensibilidad y que son utilizados para determinar HCG en procesos patológicos (10). En la tabla I se enlistan algunos ejemplos de ensayos cualitativos existentes en el mercado para la determinación de HCG; se indica el principio en que se basan y su sensibilidad.

Los inmunoensayos contenidos en la Tabla I, utilizan como soporte sólido eritrocitos de carnero o partículas de látex. En ensayos de aglutinación directa, las partículas de látex tienen sobre su superficie anticuerpos contra HCG unidos en forma covalente. Esta suspensión de partículas de látex al reaccionar con HCG de una muestra de orina, produce una aglutinación de látex visible, que no se forma en el caso de una muestra de orina negativa a HCG (fig. 2).

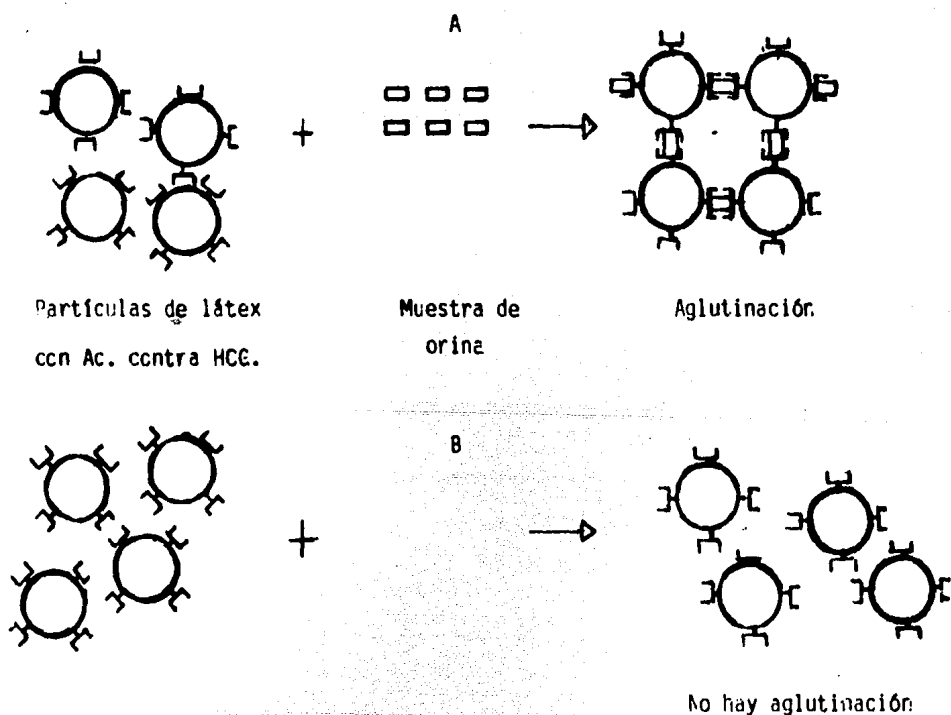


Fig. 2. Ensayo cualitativo para HCG por aglutinación de partículas de látex
A; prueba positiva. B; prueba negativa. Dnde: \square ; HCG.

TABLA I

Inmunoensayos cualitativos para la determinación de HCG

Fabricante y Nombre del producto	Método	Sensibilidad UI/ml
Carter Wallace Diagnoston UCG Test	Inhibición de hemaglutina- ción	0.5
Merck Merckotest	Inhibición de Aglutinación de látex	0.6
Organon Pregnosticon	Inhibición de Hemaglutina- ción	1.0
Laffon Pron-TEX	Inhibición de la aglutina- ción de partículas de látex	1.0
Laffon Prenatest	Inhibición de la Hemagluti- nación	1.0
Carter Wallace UCG Slide Test	Inhibición de Aglutinación de partículas de Látex	2.0
Merck Prueba Directa de embarazo	Aglutinación de Látex	1.0

Los métodos de inhibición, de aglutinación y hemaglutinación constituyen procedimientos en dos pasos. En el primero, anticuerpos anti HCG, se incuban con la muestra de orina, que si contiene HCG se combinará con los anticuerpos; en caso de no contener HCG los anticuerpos quedan libres. En un segundo paso se adiciona a la mezcla anterior, una suspensión de partículas de látex o eritrocitos de carnero, los cuales están recubiertos con HCG. Si la muestra de orina es positiva no habrá anti-HCG libres que reaccionen con los eritrocitos o látex, habiendo ausencia de hemaglutinación o aglutinación. En un caso negativo, la muestra de orina no contiene HCG, permite entonces que haya anti-HCG libres que puedan combinarse con eritrocitos o partículas de látex recubiertas con HCG, produciéndose hemaglutinación o aglutinación visible.

Los ensayos de partículas de látex son rápidos y requieren solamente dos minutos para su realización, la incidencia reportada de resultados falsos positivos oscila entre 1-3 %, con un 2-6 % aproximado de resultados falsos negativos.

Las pruebas de inhibición de la hemaglutinación requieren de una incubación de 1-2 hrs, las incidencias descritas de resultados falsos positivos oscilan entre 0.5-2.0% con valores negativos falsos entre 1. y 4.0% .

INMUNOENSAYOS PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE HCG

En la determinación cuantitativa de HCG se utilizan anticuerpos más específicos dirigidos contra la subunidad beta-HCG por la reacción cruzada que se tiene con LH. Según algunos autores, si se utilizaran anticuerpos contra la molécula completa de HCG, la reacción cruzada con LH llega a ser hasta del -- 37% (11).

Los métodos más confiables para la determinación cuantitativa de HCG son los radioinmunoensayos (RIA) y el inmuno enzimo ensayo o análisis inmunoenzimático (AIE). Estos procedimientos son los que se describirán a continuación.

RADIOINMUNOENSAYOS PARA LA DETERMINACION DE HCG.- Los RIA están basados en la propiedad que tienen los anticuerpos y algunos antígenos o haptenos de poder ser "marcados" o unidos con isótopos radioactivos en forma covalente, sin que se afecten sus propiedades biológicas o inmunológicas. Las mediciones de las radiaciones emitidas por los isótopos radioactivos en los inmunoensayos permiten detectar cantidades del compuesto que se desee hasta el orden de picogramos.

Existen dos tipos de RIA para determinar HCG; el método competitivo y el método de "emparedado" (sandwich).

El RIA competitivo está basado en la capacidad de una cantidad limitada de sitios activos de anticuerpo anti beta-HCG para unirse a una cantidad fija de HCG radiomarcada ($\text{HCG-}^{125}\text{I}$) y la inhibición de esta reacción por un antígeno no marcado, es decir HCG de la muestra (fig. 3A). El porcentaje de $\text{HCG-}^{125}\text{I}$ disminuye como una función de el incremento de la concentración de HCG no marcado en la muestra de prueba. La separación de $\text{HCG-}^{125}\text{I}$ libre y unido es necesaria para determinar la cantidad de HCG en la muestra. Esto puede estar acompañado por insolubilización de los complejos antígeno-anticuerpo ya sea por medios químicos, por ejemplo: precipitación con polietilenglicol o por la adición de un segundo anticuerpo dirigido hacia la inmunoglobulina presente en el suero original, o por una combinación de estos dos métodos. La cantidad de HCG no marcada en una muestra desconocida es entonces determinada al comparar la radioactividad de el precipitado, después de centrifugación, con valores establecidos usando estándares conocidos en el mismo sistema de ensayo (12).

En el método de emparejado, los anticuerpos específicos contra beta-HCG están inmovilizados sobre esferas o tubos de poliestireno a los cuales se les adiciona la muestra a probar y después de un tiempo de incubación se lavan las esferas o tubos para eliminar el material no unido en forma específica, después se adiciona otro anticuerpo específico contra la subunidad beta-HCG, pero éste está marcado radioactivamente (fig. 3B). Si la muestra contiene HCG, ésta es capturada por el Ac. inmovilizado a la fase sólida, después el otro Ac. marcado radioactivamente reconoce a la HCG y se une a ella, se hacen lavados y se mide la radioactividad asociada a las esferas, tubos de poliestireno o el material que haya servido como soporte sólido. A mayor cantidad de radioactividad mayor concentración de hormona. El resultado se extrapola en una curva estándar obtenida con concentraciones conocidas de HCG (12).

Los métodos anteriores utilizan anticuerpos específicos contra la subunidad beta-HCG de origen policlonal, sin embargo hay disponibles métodos que utilizan anticuerpos monoclonales. El TANDEM es un método tipo emparejado, en donde un anticuerpo monoclonal, dirigido contra un epítopo de la subunidad beta-HCG, es fijado al soporte sólido, (esferas de poliestireno) y el anticuerpo marcado que forma el sandwich es otro monoclonal dirigido contra una región diferente de la subunidad beta, que no es reconocida por el primer anticuerpo monoclonal (12).

La ventaja de utilizar monoclonales, es el aumento de especificidad en la determinación de HCG (13,14,15), sin embargo hay algunos autores que haciendo estudios con Ac. policlonales, observan que hay mayor especificidad con monoclonales, pero una menor afinidad con respecto a los Ac. policlonales (16, 17).

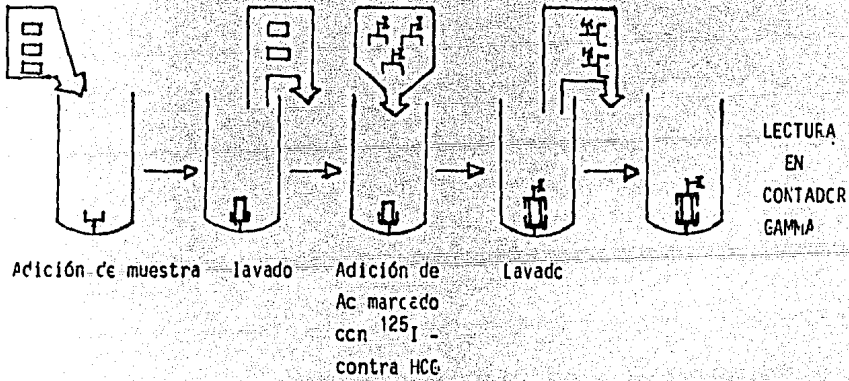
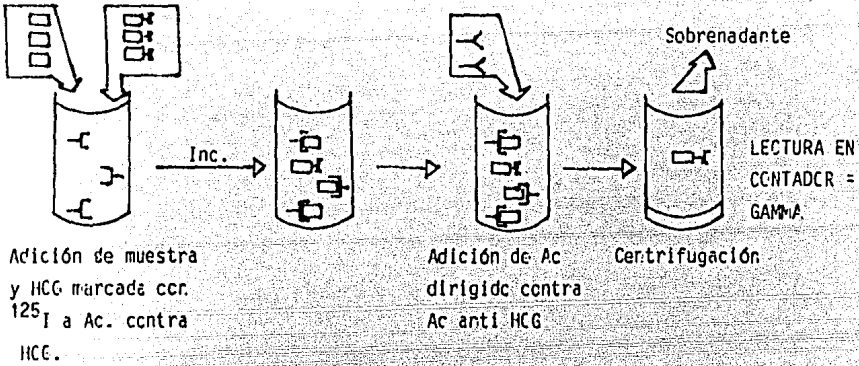


Fig. 3.- Esquemas de dos procedimientos empleados para la cuantificación de HCG. ---

A; radioinmunoensayo competitivo, en donde: \square ; HCG. \square -; HCG marcada con ^{125}I ; --- ; anticuerpo de conejo contra HCG. --- ; anticuerpo de cabra -- contra anticuerpo de conejo. B; radioinmunoensayo tipo emparezado donde: -

--- ; anticuerpo de conejo contra HCG, marcado con ^{125}I .

UTILIZACION DEL ANALISIS INMUNOENZIMATICO PARA DETERMINACION DE HCG.-

El análisis inmunoenzimático se fundamenta en la propiedad de las enzimas de ser conjugadas o unidas a los anticuerpos, antígenos o haptenos en forma covalente, sin que el conjugado resultante (antígeno-enzima o anticuerpo-enzima) pierda sus características de reactividad inmunológica o enzimática. La característica de las enzimas para catalizar la conversión de un gran número de moléculas de sustrato, proporciona la base para amplificar y detectar indirectamente una reacción Ag-Ac. Así mismo en casi todos estos sistemas la acción de la enzima sobre los sustratos genera productos coloridos lo que -- permite la realización de pruebas cualitativas interpretadas por la intensidad en el color desarrollado y de pruebas cuantitativas utilizando un espectrofotómetro.

Los métodos inmunoenzimáticos (AIE) han substituido en muchos casos al RIA, por las desventajas que presenta este último como son su alto costo, vida media corta de los reactivos, peligro por las radiaciones, y equipos de medición caros. Los métodos inmunoenzimáticos no presentan estas desventajas, los reactivos utilizados son menos costosos y estables por mucho mayor tiempo. Existen en el mercado ensayos inmunoenzimáticos para determinación de HCG, que son básicamente los mismos que los descritos para RIAs, con la diferencia en el marcador utilizado, que son enzimas en lugar de los radioisotopos. Es por esto que se prefiere utilizar métodos inmunoenzimáticos en los laboratorios clínicos. Sin embargo, tanto los equipos de RIA como de AIE son de tecnología extranjera, situación que los hace menos accesibles a los laboratorios clínicos de pocos recursos. Es por ello que se hace necesario encontrar técnicas más accesibles al laboratorio clínico. Una de ellas puede ser la coaglutinación.

COAGLUTINACION, UNA ALTERNATIVA PARA DETERMINACION DE ANTIGENO

La determinación de hormonas como HCG, LH, TSH, algunos medicamentos y material derivado de agentes infecciosos, hacen necesaria la utilización de inmunoensayos para la búsqueda o determinación de un antígeno. Hay diversas técnicas existentes para la determinación de éstos, entre ellas hay una técnica denominada coaglutinación. Esta ha sido utilizada en los laboratorios de Bacteriología en la identificación de antígenos bacterianos como Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis (18), Salmonella typhi (19), Haemophilus influenza (20).

El método de coaglutinación consiste en el uso de la bacteria Staphylococcus aureus cepa Cowan I, cuya pared celular contiene Proteína A, ésta tiene la capacidad de fijar anticuerpos IgG de algunas especies, por su porción --- cristalizable (Fc), en forma espontánea. Si a una suspensión de estafilococos inactivados la recubrimos con anticuerpos específicos contra un antígeno determinado y luego la suspensión la enfrentamos con dicho antígeno, la reacción subsecuente se visualiza por aglutinación del estafilococo, este procedimiento se esquematiza en la figura 4 (20).

En el comercio existe la prueba para la identificación de Streptococcus pneumoniae, y para la identificación diferencial de estreptococos beta hemolíticos pertenecientes a los grupos A, B y C (18).

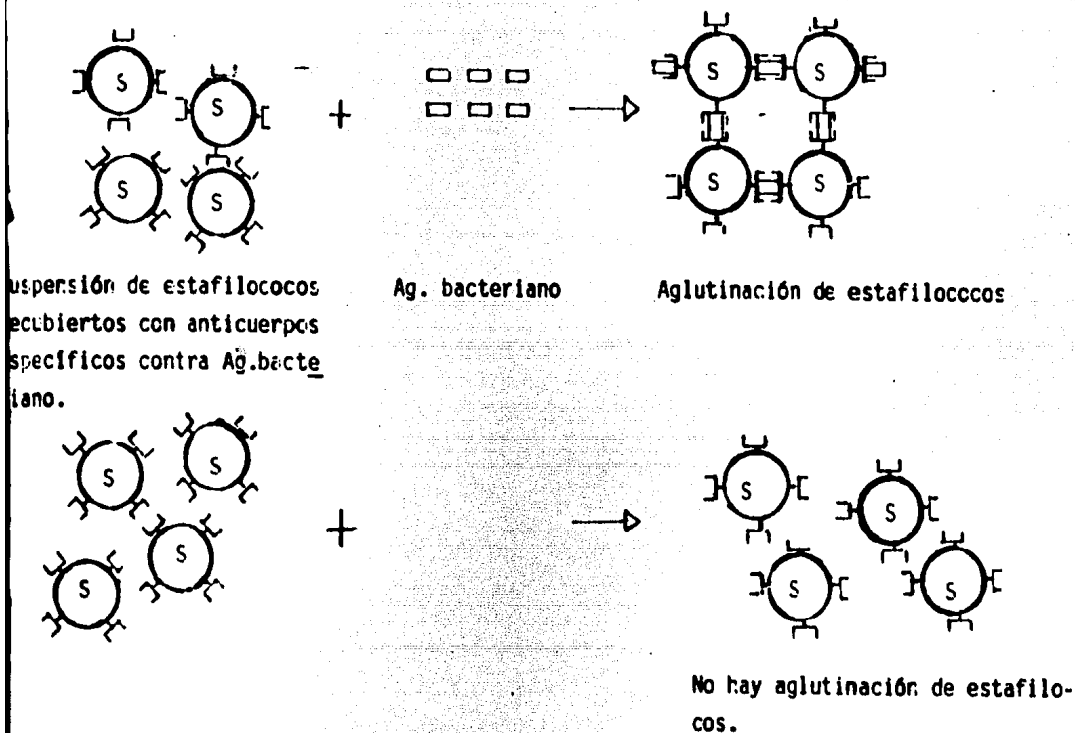


Fig. 4.- Esquema representando la aglutinación para un antígeno bacteriano en la parte superior el caso de poner en contacto la suspensión de estafilococos con una muestra positiva de contener dicho Ag bacteria no y en la parte inferior el caso de una muestra negativa.

Thirumoorthi y Col. (21), compararon la coaglutinación, la aglutinación en látex y la contrainmunolectroforesis para la detección de antígenos solubles de Haemophilus influenzae tipo B, Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, en fluidos corporales y encontró que la coaglutinación y la aglutinación en látex resultaron más sensibles que la contrainmunolectroforesis, en la determinación de estos antígenos.

La ventaja de utilizar al estafilococo como soporte sólido para el inuoensoyo además de aprovechar su tamaño que permite visualizar la reacción, es que su obtención en grandes cantidades a bajo costo es factible.

La coaglutinación es una técnica muy simple y rápida para la determinación de antígenos bacterianos y puede proporcionar una alternativa para la determinación de otros tipos de antígenos diferentes, como la HCG.

En la parte siguiente se describen algunas características generales de los estafilococos, productores de proteína A.

CARACTERISTICAS GENERALES DE ESTAFILOCOCOS PRODUCTORES DE PROT. A

Los estafilococos son cocos grampositivos que crecen agrupados en racimos. Son organismos inmóviles que no forman esporas. Sus diámetros varían entre 0.7 y 1.2 μ c. (22).

La producción de proteína A, está restringida a cepas de Staphylococcus aureus, un 95% de las cepas de S.aureus aisladas de humanos producen proteína A, muchas cepas la contienen unida a la célula en forma covalente, pero liberan cantidades significativas dentro del medio en que crecen. La cantidad de proteína A, en la pared celular de la bacteria depende de la cepa de que se trate, la cepa Cowan I es la que es más rica en proteína A (23). Por otro -

lado la cepa Wood 46, no produce proteína A y se ha observado además que -- aproximadamente el 50% de las cepas resistentes a meticilina de S. aureus -- son productoras o con solo prot. A, extracelularmente esto es, la producen - pero no la unen en forma covalente a la pared celular y queda libre en el me- dio de cultivo, un ejemplo es la cepa A676 que es resistente a meticilina y produce solo proteína A extracelular (24).

Se han hecho intentos para determinar el efecto de proteína A sobre la respuesta in vivo a S. aureus, sin embargo no se ha logrado demostrar un pa- pel dominante o altamente significativo en la virulencia de la bacteria que lo contiene, aunque estudios in vitro sugieren que las interacciones Prot. A IgG-Complemento pudieran ser importantes ya que inhiben la opsonización y fa- gocitosis junto con depresión de la respuesta quimiotáctica (24).

La proteína A ha sido aislada mediante cromatografía de intercambio ió- nico y gel filtración, isoelectroenfoque y la electroforesis en gel de poli- acrilamida (25), también se ha empleado a la lisozima para liberar proteína A de la superficie de S. aureus, pero los rendimientos son variables y los - productos generalmente son heterogéneos, en contraste cuando se emplea la di- gestión con lisostafina que produce proteína A más homogénea (26,27), el ais- lamiento en un paso se lleva a cabo en medio de cultivo de la cepa Cowan I, de cepas resistentes a meticilina 5515 y A676, que producen altos niveles de -- prot. A extracelular, únicamente la cepa A676 da 33 mg/l de medio de cultivo (28).

PROTEINA A Y SU UNIÓN A FRAGMENTOS Fc DE INMUNOGLOBULINAS

La proteína A de la pared celular de los estafilococos fué primero estu- diada y caracterizada por Jensen en 1959 (29). Reacciones de precipitación

directa fueron detectadas entre la proteína A y todos los sueros humanos normales, se pensaba que dichas reacciones representaban anticuerpos antiestafilococo en los sueros humanos normales. Sin embargo, estudios subsecuentes -- han indicado que la proteína A reacciona con estructuras Fc de cadena pesada de las gammaglobulinas. Basándose en la actividad de unión de fragmentos y subfragmentos moleculares y datos de cristalografía de rayos X, se observó que el sitio de unión está localizado en la interfase CH₂ - CH₃ en la IgG -- humana, en la de cerdo y probablemente también en la de otras especies (30).

En humanos, la proteína A reacciona con varias subclases de IgG: IgG₁, IgG₂, IgG₄. Todas las IgG de conejo se unen a la proteína A (25). Estudios recientes han mostrado que la proteína A reacciona con las subclases de IgA e IgM humanos. Solo algunas clases de anticuerpos de cabra, rata y ratón son reactivos a proteína A (30).

La proteína A es una cadena polipeptídica única, relativamente elongada, con PM de 42 000, el análisis químico de aminoácidos sugiere que la proteína A está hecha de unidades repetitivas y que contiene poco o nada de azúcares (24). La conformación se mantiene intacta sobre un rango de pH de 0.95 a -- 11.8, la proteína tiene un punto isoelectrico de 5.1. Es funcionalmente bivalente (27,31), aunque la proteína A tiene 4 sitios de unión, solo dos son normalmente expresados en reacciones con IgG (24), se han demostrado complejos conteniendo diferentes relaciones de IgG y proteína A, incluyendo un dímero con la fórmula molecular (IgG)₂ Prot. A₂

La proteína A reacciona en forma análoga a ciertos receptores para IgG de superficie en ciertas cepas y tipos de estreptococos (A,C y G), aunque la evidencia sugiere sitios diferentes de unión sobre la molécula de IgG (32).

APLICACIONES DE LA PROTEÍNA A EN INMUNOCENSAYOS

Todas las aplicaciones de la proteína A dependen de su alta afinidad y rápida unión de IgG. Los valores de KD para IgG de humano y conejo son de aproximadamente 10^{-8} M, similar a una reacción típica de Ag-Ac (33).

La unión óptima de la proteína A, con anticuerpos en fase soluble o sólida frecuentemente es llevada a cabo en menos de 30 minutos sin ningún efecto importante de temperatura entre 4 y 37 °C (23,34). Además la unión no es afectada por EDTA o bajas concentraciones de agentes solubilizantes no iónicos como Tween 20 y Tritón X-100 (35).

Gracias a la especificidad de unión entre la proteína A y la IgG, ésta se ha utilizado para la purificación de IgG (36). La proteína A, ha sido marcada con varios trazadores incluyendo isotopos radioactivos, enzimas, compuestos fluorescentes y metales. La marcación con peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina e invertasa por una variedad de métodos químicos de derivados de proteína A para inmunoensayos enzimáticos directos o competitivos (35,37).

Se han utilizado también suspensiones de estafilococos inactivados para separar complejos inmunes, como una especie de segundo Ac., en inmunoensayos para determinar alfa fetoproteína en suero (33), para cuantificar concentraciones de IgG humana (34), Kessler en 1976, la utilizó para separar complejos en el aislamiento de antígenos de membrana, como inmunoglobulinas de ratón y humano en linfocitos y antígenos de beta₂ microglobulina (38).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La determinación de la hormona Gonadotropina Coriónica Humana ha servido tanto para la confirmación de embarazo por el laboratorio, como para detectar o seguir el curso de algunos procesos patológicos en donde los niveles de HCG están alterados como en la mola hidatiforme o embarazos ectópicos.

Existen en el mercado métodos confiables para su determinación cualitativa como cuantitativa, sin embargo todos ellos operan con equipos de importación de alto costo. El propósito de este trabajo es la de desarrollar técnicas para la determinación de HCG, que sean más accesibles al laboratorio clínico de pocos recursos y con sensibilidad análoga basándose en la propiedad de la proteína A, contenida en la pared celular del Staphylococcus aureus cepa Cowan I, de poder fijar anticuerpos específicamente por su porción Fc, además utilizando a la célula bacteriana completa como soporte sólido en dichas técnicas.

OBJETIVOS

- 1.- Obtención y purificación de anticuerpos de conejo dirigidos contra HCG.
- 2.- Cultivo de Staphylococcus aureus cepa Cowan I y obtención de la bacteria inactivada.
- 3.- Recubrimiento de la bacteria inactivada con anticuerpos de conejo contra HCG.
- 4.- Ensayo cualitativo para la determinación de HCG, usando la suspensión de estafilococo recubierto.
- 5.- Elaboración de un conjugado HCG-FA para utilizarlo como marcador en un inmunoensayo cuantitativo para HCG.
- 6.- Estandarización de condiciones para el ensayo cuantitativo para la determinación de HCG.

MATERIALES Y METODOS

OBTENCIÓN DE ANTISUERO DE CONEJO CONTRA HCG

Obtención de antisuero de conejo contra HCG. Se utilizó HCG comercial (Roussel, Mex.), para llevar a cabo una hiperinmunización vía subcutánea en conejos Nueva Zelanda, con el siguiente esquema: primera dosis fué de 1 ml de HCG (14 mcg HCG/ml) en solución salina más 1 ml. de adyuvante completo de Freund y cinco dosis semanales de 1 ml de HCG (8 mcg/ml), con 1 ml. de adyuvante incompleto de Freund, después se dio una última punción de 1 ml. de HCG (8 mcg/ml) en solución salina, para una dosis total de 62 mg de HCG por conejo. El antisuero obtenido se comprobó su reactividad hacia HCG mediante doble inmunodifusión, dando una línea de identidad cuando se comparó con un antisuero contra HCG, obtenido de laboratorios Cappel (E.E.U.U.).

Elaboración de columna de afinidad sepharosa 4B-HCG. Para la purificación de anticuerpos (Ac.), anti HCG, se elaboró una columna de cromatografía de afinidad, para ello se utilizó aminohexil-sepharosa 4B (Sigma E.E.U.U.) a la cual se le fijó HCG, mediante la técnica reportada por Cambiaso (48).

Purificación de anticuerpos específicos contra HCG. Se lavó la columna de afinidad de aminohexil-sepharosa 4B, con una solución salina reguladora de fosfatos (PBS), 0.15 M, pH 7.2, hasta que la lectura de absorbancia a 280 nm, del líquido de lavado fué menor a 0.02. Se le adicionaron 5 ml del suero de conejo inmunizado sin titular contra HCG, se incubó 30 min. a temperatura ambiente y se lavó con PBS, hasta que el líquido de lavado dio una lectura de absorbancia menor a 0.02. Se eluyeron los Ac., con 5 ml de NH_4SCN 1.5 M, y se recolectaron fracciones de 1.5 ml, se les determinó D.O. a

280 nm, y las fracciones con D.O. mayor a 0.04, se recolectaron en un solo tubo de ensayo, inmediatamente las fracciones recolectadas se dializaron contra PES y posteriormente contra agua destilada. Terminada la diálisis, se comprobó la reactividad de los Acs. obtenidos con un antisuero contra HCG de laboratorios Cappel, mediante inmuno electroforesis. Finalmente los Acs. se liofilizaron.

CULTIVO Y PREPARACION DE ESTAFILCOCCOS

Para el desarrollo de la coagulación y del ensayo inmunocenzimático para la determinación de HCG, se utilizó la cepa de Staphylococcus aureus -- Cowan I obtenida de American Type Collection. El cultivo y preparación de los estafilococos se llevaron a cabo con ligeras modificaciones de la técnica reportada por Jonsson (33). La cepa se desarrolló en medio tripticoseína Soya Agar (TSA) (Bioxon, Mex.) y se incubó a 37°C durante 18 hrs., posteriormente se cosechó adicionando un amortiguador salino de fosfatos (PBS) 0.03 M, pH 7.2, para desprender las capas de crecimiento bacteriano. El líquido de cosecha se lavó con PES hasta aclaramiento del sobrenadante, el paquete celular se resuspendió en formaldehído al 0.5% y se incubó por 2 hrs. a temperatura ambiente con agitación, posteriormente se lavó con PES y se calentó a 80°C en baño maría con agitación durante una hora. La suspensión así obtenida se lavó con PBS y se ajustó la concentración 1:10 (v/v) con PBS.

RECUBRIMIENTO DE ESTAFILCOCCOS CON Acs. ANTI HCG

Para el recubrimiento del estafilococo con anticuerpos de conejo específicos contra HCG, se consideraron los resultados de Jonsson y Krcivall (33), que establecieron que un ml. de la suspensión de estafilococo inactivada y diluida 1:10 (v/v), es capaz de fijar de 1.2-1.5 mg de IgG. El recubrimiento de estafilococos en este trabajo, se hizo de la siguiente manera: de la sus-

pensión de estafilococcos inactivados, dilución 1:10, se tomó 0.5 ml. y se le adicionó 0.2 ml del anticuerpo de conejo (4 mg/ml), contra HCG. La mezcla se dejó inclutando 2 hrs. a temperatura ambiente con agitación, después se lavó 3 veces con PBS y este paquete se resuspendió con 4.5 ml. de PBS, de esta -- suspensión una mitad se utilizó para el ensayo cualitativo de HCG y la otra parte se diluyó con PBS hasta ajustarla a una absorbancia de 1.5 a 540 nm., para usarla en el ensayo cuantitativo de HCG, siendo este valor arbitrario, ya que no existen antecedentes del empleo de la bacteria en este tipo de ensayos.

ENSAYO CUALITATIVO PARA LA DETERMINACION DE HCG

Muestras.- El estudio se realizó en 40 muestras de orina de mujeres jóvenes en edades que variaron entre 18 y 26 años, con sospecha de embarazo y con una amenorrea de 10 a 32 días, que acudieron a consulta al Hospital de Ginecc Obstetricia No. 2 del Centro Médico Nacional I.M.S.S. y como testigo 10 muestras de orina de mujeres post-menopáusicas del mismo hospital y 10 -- más de estudiantes varones de la Escuela de Medicina del I.P.N. Todas las -- muestras fueron centrifugadas a 500 X G durante 10 min y conservadas a 4 °C.

Procedimiento.- En un portaobjetos se colocó una gota de orina problema con una gota de la suspensión de estafilococcos recubiertos con los Abs. espe cíficos contra HCG (E-anti-HCG), se mezclan con un agitador y los resultados de coaglutinación se observaron de 1 a 5 min, después con una lámpara de luz indirecta. Para corroborar los resultados se analizaron las muestras de ori na por el método de inhibición de la hemaglutinación de laboratorios Laffón (Mex).

ELABORACION DE CONJUGADO HCG-FOSFATASA ALCALINA PARA LA
DETERMINACION CUANTITATIVA DE HCG

La fosfatasa alcalina tipo VII (Sigma E.E.U.U.) se unió en forma covalente a la HCG (Roussel Mex.), siguiendo la técnica descrita por Engvall -- (39). La fosfatasa alcalina (FA) 5 ml se resuspendió con 0.85 ml. de una solución de HCG en PBS (2 mg/ml) y se dializó contra PBS durante 24 hrs. a 4⁰ C, con 4 cambios de 0.5 l. El contenido de la bolsa de diálisis se transfirió a un tubo de ensayo y se ajustó a 1.0 ml con PES y se adicionaron 10 ul de glutaraldehído (Sigma E.E.U.U.) al 20%. SE reposó por 2 hrs. a temperatura ambiente. Después se dializó contra dos cambios de PBS. El conjugado formado se guardó en alícuotas después de haberse ajustado a 4.85 ml con PES y añadido 0.15 ml de azida de sodio al 0.1% y 50 mg de albúmina sérica bovina (Sigma E.E.U.U.). Este conjugado se guardó a 4⁰C.

TITULACION DE CONJUGADO HCG-FA

Se llevó a cabo un procedimiento denominado titulación de tablero de ajedrez (40) de diluciones del antígeno (HCG-FA), titulado contra una serie de diluciones del anticuerpo (Ac anti HCG) (fig. 5).

a).- Dilución del Ac. de conejo anti HCG.

i).- El Ac. de conejo de concentración de 4 mg/ml, se diluyó en un amortiguador de recubrimiento*. Se prepararon 8 diluciones - dobles; en el mismo amortiguador de recubrimiento, estas fueron: 1:250, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, 1:8000, 1:16000 y - 1:32000.

ii).- Se colocó 0.2 ml de cada dilución en los pozos de una micro - placa de polivinilo (Dynatech E.E.U.U.), de manera que con la

* Ver apéndice

dilución menor (1:250) se llenó la serie de pozos de A1 a A6, la siguiente solución (1:500) en los pozos B1 a B6 y así se continúa hasta llegar a los pozos H1-H6.

iii).- Se cubrió la microplaca y se dejó toda la noche a 4°C . Después se lavó 6 veces con PBS-Tween 20. Se incubó de nuevo con 0.2 ml de -- PES-Tween albúmina durante 2 hrs. a temperatura ambiente. Luego se le hicieron tres lavados con PBS Tween.

b).- Dilución del conjugado HCC-FA de prueba.

i).- El conjugado HCC-FA se diluyó en PBS-Tween. Se hicieron cinco diluciones: 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400.

ii).- Se adicionaron 0.2 ml de cada dilución de la manera siguiente: La dilución más baja se agregó a la columna A1 a H1, la siguiente en la columna A2 a H2, así hasta A5 a H5. Después se incubó la placa 3 hrs. a temperatura ambiente.

iii).- Se lavó 3 veces con PBS-Tween. Se adicionó 0.2 ml. de una solución de sustrato para la enzima FA; p-nitro fenil fosfato (p-NFF), en una concentración de 2 mg/ml en amortiguador de sustrato*. Se dejó incubando 30 min a temperatura ambiente.

iv).- Se detuvo la reacción añadiendo a cada pozo 0.2 ml de NaOH 0.25 N. La lectura se hizo en un lector Titertek Multiskan a 405 nm. El título se consideró como la más alta dilución de conjugado que detecta la más alta dilución de anticuerpo.

* Ver apéndice.

diluciones de
Ac. anti HCG.

	Diluciones del conjugado HCG-FA					
	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	Blanco 0.0
1:250						
1:500						
1:1000						
1:2000						
1:4000						
1:8000						
1:16000						
1:32000						

Fig. 5.- Esquema de diluciones empleadas de Ac. contra HCG y HCG-FA para la titulación del conjugado HCG-FA.

ENSAYO DE UNIÓN DIRECTA PARA LA DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE HCG

Para la obtención de la curva de unión directa, se hizo reaccionar la suspensión de E-anti-HCG, que previamente se ajustó a una absorbancia de 1.5 a 540 nm, con diferentes diluciones del conjugado HCG-FA (fig. 6), cada dilución se hizo por triplicado, el procedimiento fue el siguiente.

1.- Se mezcló en tubos de ensayo 50 ul de la suspensión E-anti-HCG y -- 100 ul de la dilución de conjugado HCG-FA. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. con agitación.

2.- Se hicieron tres lavados con PBS, centrifugando a 50CXG durante 15 min, por cada lavado, descartando el sobrenadante.

3.- Se adicionaron 100 ul de sustrato p-NFF, con una concentración de - 1 mg/ml. Y se incubó 30 min. a temperatura ambiente con agitación.

4.- Se detuvo la reacción enzimática con un ml. de NaOH 0.25 N. La lectura se tomó en un espectrofotómetro a 405 nm.

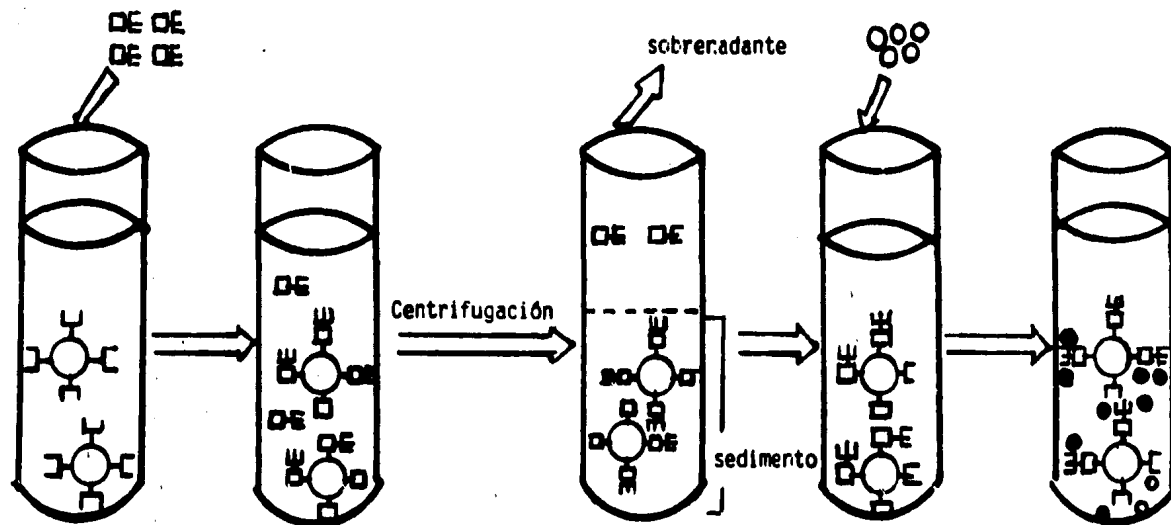


Fig. 6.- Ensayo de unión directa entre la suspensión de E-anti-HCG y HCG-FA. Se adiciono a la suspensión de E-anti-HCG, diferentes diluciones de HCG-FA, después de incubarla se lavó la suspensión y se reveló la actividad enzimática. La representación de los símbolos es la siguiente:

- DE; HCG-FA
- Y; E-anti-HCG
- ; Sustrato (p-NFF)
- ; Producto (p-nitrofenol)

ENSAYOS DE DESPLAZAMIENTO DE HCG-FA, POR HCG, PARA LA
DETERMINACION CUANTITATIVA DE HCG

Para los ensayos de desplazamiento, cuando se utiliza un antígeno conjugado a una enzima o isotopo radioactivo, el incremento en sensibilidad se lleva a cabo frecuentemente por la adición del antígeno no conjugado y antígeno conjugado secuencial a el anticuerpo, en lugar de mezclarlos simultáneamente. El desplazamiento del antígeno unido por el antígeno conjugado recién adicionado, toma mucho más tiempo que el requerido para la unión de los sitios libres del anticuerpo con el antígeno conjugado. Por lo tanto un mayor grado de inhibición se puede obtener con la misma cantidad de antígeno no conjugado por la adición secuencial que por adición simultánea.

En nuestro caso se utilizaron dos procedimientos, uno de tipo competitivo en un solo paso donde la adición de los antígenos (HCG y HCG-FA) al E-anti HCG, es simultánea con el fin de disminuir el tiempo total del ensayo (fig 7) y otro competitivo en dos pasos (fig. 8) donde hay una adición secuencial de antígenos al E.anti-HCG.

Para estos procedimientos se diluyó HCG estándar (U.S.P.C. INC Bethesda U.S.A.), a 5 UI/ml de orina de sujeto masculino y a partir de esta se hicieron diluciones en PBS para la obtención de las siguientes concentraciones: - 1000, 200, 62, 15, 3.5 y 0.8 mUI de HCG/ml. Cada dilución se probó por triplicado. La descripción de ambos métodos se enumera a continuación.

a).- Ensayo competitivo, en un paso.

- 1.- Se mezcló 50 ul de la suspensión E-anti-HCG, más 50 ul de muestra. Se incubó la mezcla durante 1 hr. a temperatura ambiente con agitación.
- 2.- Se hicieron tres lavados con PBS, centrifugando a 500XG, por 15 min.

3.- Se adicionó el sustrato p-NFF, 0.2 ml a concentración de un -- mg/ml, en amortiguador de sustrato. Se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente con agitación.

4.- Se detuvo la reacción con un ml. de NaOH 0.25 N y se leyó a -- 405 nm.

b).- Ensayo competitivo en dos pasos.

1.- Se mezclaron 50 μ l de la suspensión E-anti-HCG más 50 μ l de la dilución de HCG. Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente

2.- Después se adicionaron 50 μ l de conjugado HCG-FA y toda la mezcla se incubó durante 1 hr. a temperatura ambiente con agitación.

3.- Se hicieron tres lavados con PBS, centrifugando a 500XG por 15 minutos.

4.- Se adicionó el sustrato p-NFF, 0.2 ml a concentración de un -- mg/ml, amortiguador de sustrato. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación.

5.- Se detuvo la reacción con un ml de NaOH 0.25 N y se tomaron -- las lecturas de absorbancia a 405 nm.

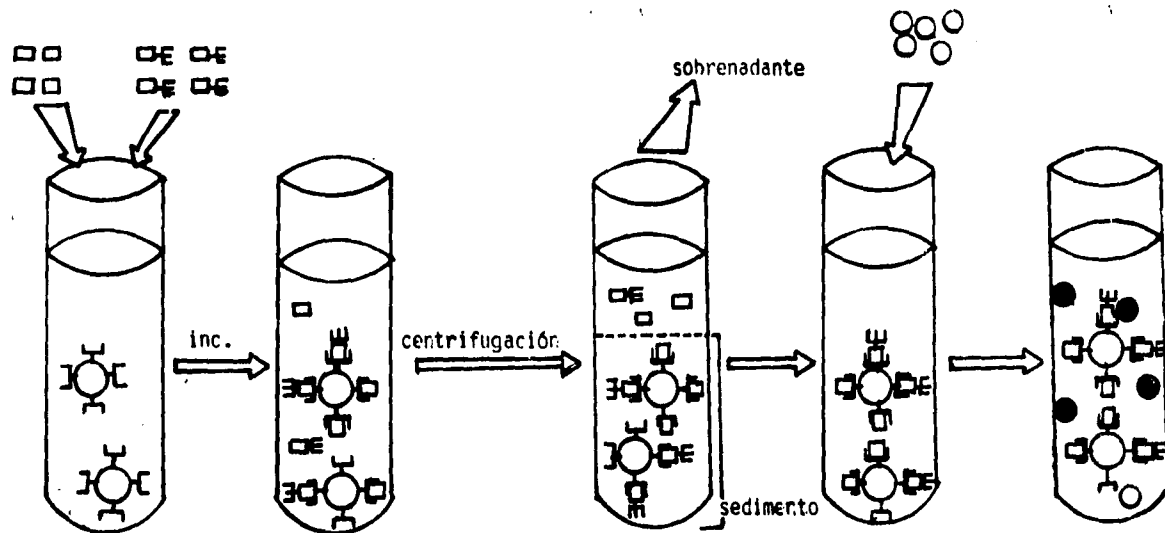


Fig. 7.- Ensayo inmunoenzimático competitivo de un paso para la determinación cuantitativa de HCG.
 En este procedimiento se adicionan al mismo tiempo la muestra a probar y el conjugado HCG-FA a la suspensión de E-anti-HCG y posteriormente se incubaron. La simbología es la siguiente:

- | | | | |
|---|---------------------|---|---------------------------|
| □ | ; HCG de la muestra | ○ | ; Sustrato (p-NFF) |
| ◻ | ; HCG-FA | ● | ; Producto (p-nitrofenol) |
| ⌘ | ; E-anti-HCG | | |

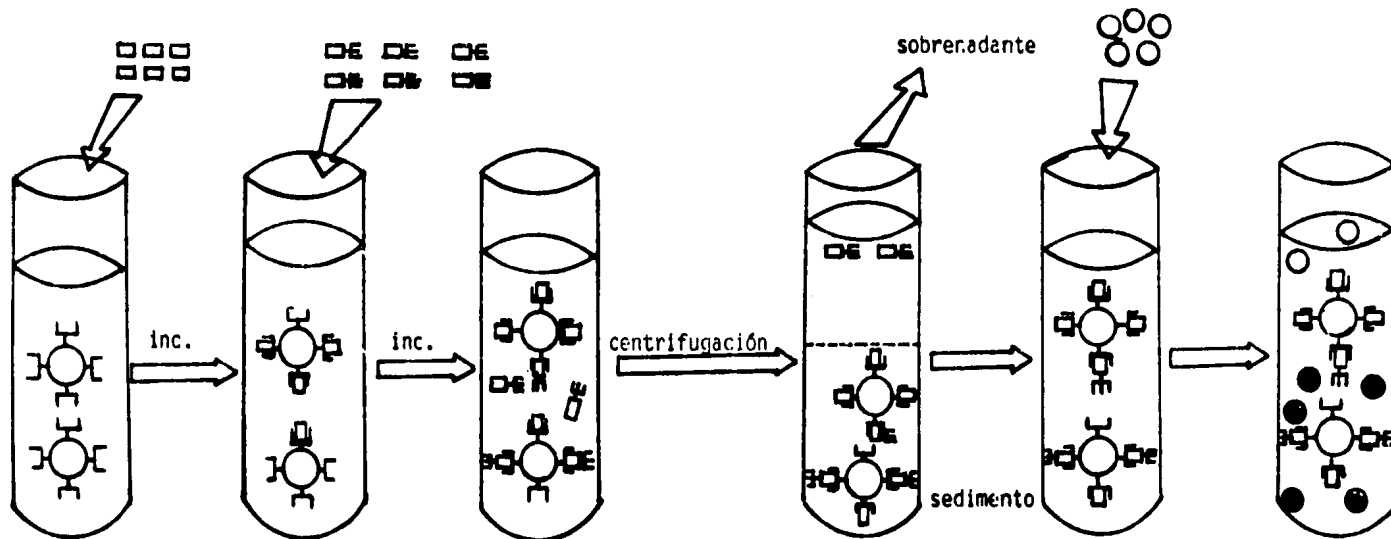


Fig. 8.- Ensayo inmunoenzimático competitivo de dos pasos para la determinación cuantitativa de HCG. Aquí existe una preincubación de la muestra a probar con el E-anti-HCG antes de la adición de HCG-FA, después el procedimiento es de la misma forma que el ensayo inmunoenzimático en un paso. El significado de los símbolos es el siguiente.

□ ; HCG de la muestra

DE ; HCG-FA

Y ; E-anti-HCG

○ ; Sustrato de la enzima (p-nFF)

● ; Producto de la enzima (p-nitrofenol)

OPTIMIZACION DEL ENSAYO INMUNOMETRICO PARA LA DETERMINACION DE HCG

Como el ensayo competitivo en dos pasos mostró un mejor comportamiento de desplazamiento en el rango de concentraciones de HCG utilizadas, se estudiaron dos condiciones para mejorarlo. Una de ellas fue la adición de Tween al amortiguador utilizado en el ensayo para disminuir la reacción inespecífica y la otra fue el aumento de tiempo de preincubación a 30 min., en lugar de 15.

OBTENCION DE CURVA ESTANDAR PARA LA DETERMINACION DE HCG

En la obtención de la curva estándar para la determinación cuantitativa de HCG, por medio del ensayo enzimático, se llevó a cabo el siguiente procedimiento.

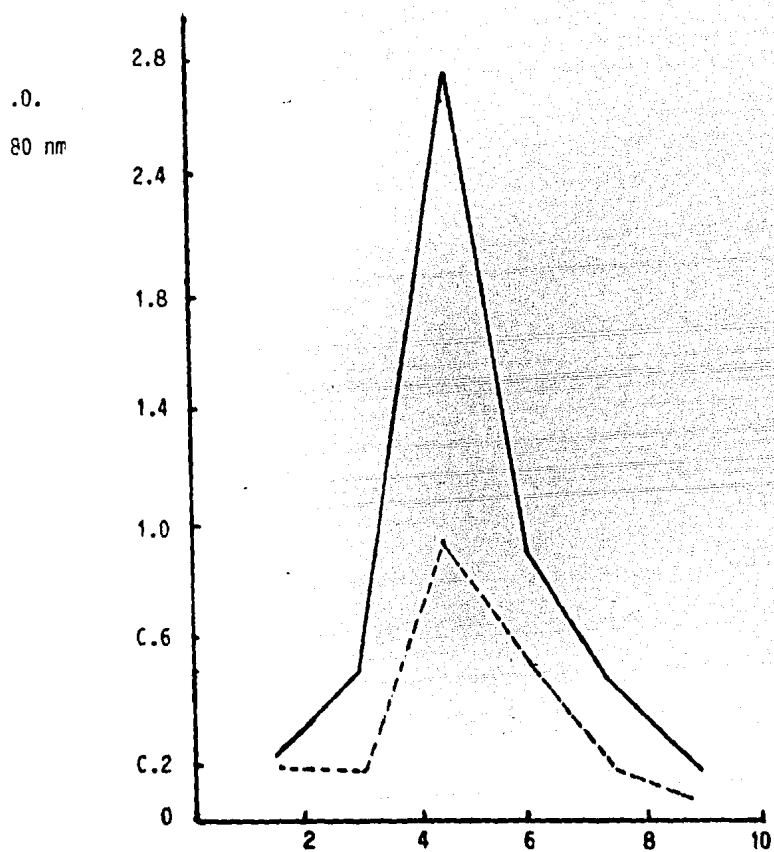
- 1.- Se mezclaron 100 μ l de la suspensión E-anti-HCG más 100 μ l de diferentes concentraciones de HCG. Las concentraciones utilizadas fueron: 125, 250, 500, 750 y 1000 mUI de HCG/ml en PBS-Tween. Esto se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. con agitación. Cada concentración del estándar se hizo por triplicado
- 2.- Después se adicionaron 100 μ l del conjugado HCG-FA y toda la mezcla se incubó 60 min. a temperatura ambiente y con agitación
- 3.- Se hicieron tres lavados con PBS-Tween al 0.5% centrifugando a 500Xg durante 15 min.
- 4.- Se adicionó 0.2 ml del sustrato p-NFF (1 mg/ml), se incubó 30 min. a temperatura ambiente con agitación.
- 5.- Se detuvo la reacción enzimática con 1 ml. de NaOH 0.25 N y se tomaron las lecturas de absorbancia a 405 nm.

RESULTADOS

OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI HCG

Cinco ml de antisuero de conejo anti HCG, se pasaron por la columna de cromatografía de afinidad HCG-amino hexil sepharosa 4B. Se eluyó con tiocianato de amonio. Se colectaron fracciones de 1.5 ml y se tomaron las lecturas de absorbancia a 280 m μ . El perfil de levigación, aparece en la figura 9. Los datos del segundo levigado corresponden al resultado de haber pasado de nuevo el mismo antisuero con el propósito de extraer la mayor cantidad posible de anticuerpos contra HCG en el antisuero de conejo.

Se recolectaron todas las fracciones con absorbancias mayores a 0.4, éstas se dializaron con dos cambios de PES y luego 3 cambios con agua destilada, después se liofilizaron. Se obtuvieron 8 mg. de anticuerpos de conejo -- contra HCG, a estos se le comprobó su reactividad contra HCG y empleando también un antisuero anti-HCG de laboratorios Cappel mediante inmuno-electroforesis. El resultado muestra una banda de precipitación única para los anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad, en cambio para el anti HCG de Cappel aparecen otras bandas de precipitación (fig. 10).



Vol. de Levigado
en ml.

Fig. 9: Perfil de levigado del Ac. de conejo anti HCG de la columna de afinidad de HCG-aminhexil sepharosa. En línea continúa la 1a. levigación y en línea punteada la 2a. levigación de los anticuerpos que no se unieron a la columna en el primer paso del antisuero.

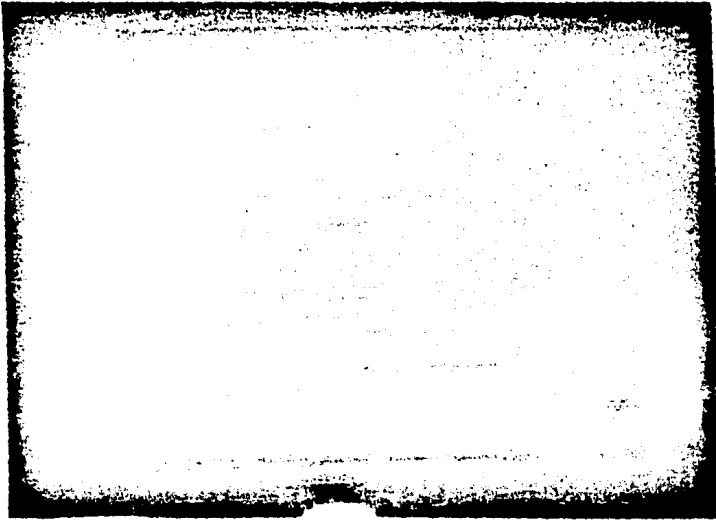


Fig. 10: Inmunolectroforesis para demostrar la reactividad de los anticuerpos anti HCG.

Donde: A; Anti HCG purificados por cromatografía de afinidad

B; Antisuero contra HCG de laboratorios Cappel U.S.A.

1: HCG de laboratorios Rcussel.

ENSAYO CUALITATIVO PARA LA DETERMINACION DE HCG

Todas las muestras de orina de mujeres postmenopáusicas y de varones -- fueron negativas por coaglutinación. Por otra parte, los resultados se trataron con las pruebas de valor predictivo y pruebas de combinación (41), encontrándose un 97% de paralelismo entre coaglutinación e inhibición de la hemaglutinación.

Los resultados de la coaglutinación e inhibición de la hemaglutinación aparecen en la tabla II.

Tabla II.- Resultados de 40 muestras de orina de mujeres jóvenes con -- amenorrea de 10-30 días, estudiadas por dos métodos.

Método	Prueba Positiva	Prueba Negativa	Total
Coaglutinación	30	10	40
Inhibición de la Hemaglutinación	22	18	40

En la figura 11 se muestra un resultado positivo y uno negativo de la - prueba de coaglutinación para determinar HCG.

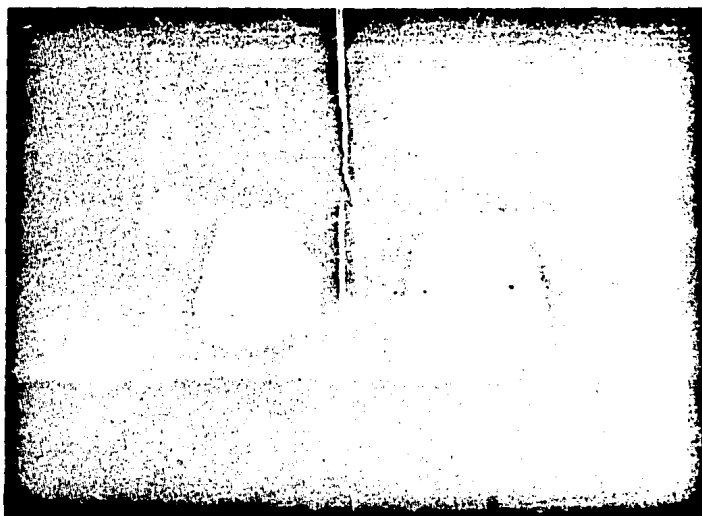


Fig. 11: Resultados de prueba de coagulación para determinar HCG.

Laminilla A.- Prueba negativa; laminilla B, Prueba positiva.

TITULACION DE CONJUGADO HCG-FA PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE HCG

Los datos que aparecen en la tabla III, son las absorbancias a 405 nm - obtenidos de la titulación en "tablero de ajedrez" del conjugado HCG-FA. Estos nos indican que la dilución del conjugado 1:100 fue capaz de detectar -- hasta una dilución de anticuerpo anti HCG 1:1000. Esta dilución de conjugado se utilizó posteriormente para todos los ensayos. La dilución 1:50, es más sensible, pero su uso disminuiría, el número de ensayos para la estandarización, por esto se optó por la dilución 1:100.

Tabla III.- Resultados de absorbancias para la titulación del conjugado HCG-FA con anticuerpos anti HCG.

Diluciones del conjugado HCG-FA

	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	Blanco
Diluciones de Ac. anti HCG 1:250	0.748	0.509	0.524	0.463	0.527	0.006
1:500	0.705	1.330	0.130	0.185	0.212	0.007
1:1000	0.271	0.320	0.130	0.031	0.061	0.079
1:2000	0.055	0.327	0.055	0.045	0.031	0.109
1:4000	0.005	0.133	0.017	0.001	0.057	0.024
1:8000	0.006	0.036	0.012	0.053	0.001	0.002
1:16 000	0.054	0.022	0.009	0.026	0.063	0.013
1:32 000	0.052	0.029	0.010	0.002	0.076	0.044

ENSAYO DE UNIÓN DIRECTA DE E-ANTI-HCG Y HCG-FA

Las lecturas de absorbancias a 405 nm de la unión directa entre HCG-FA y la suspensión de E-anti-HCG (suspensión ajustada previamente a una absorbancia de 1.5 a 540 nm.), se muestran en la tabla IV. Se consideró como el 100% de unión la adición del conjugado sin diluir. En la figura 12 se grafican los resultados de este ensayo.

Tabla IV.- Lecturas de absorbancias de diferentes cantidades de HCG-FA, en ensayo de unión directa por triplicado con el E-anti-HCG, y expresadas en porcentaje.

Vol. de E-anti-HCG (ul)	Vol. de PBS (ul)	Vol. de HCG-FA (ul)	Absorbancias				% Unión
			A1	A2	A3	A	
50.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
50.0	90.0	10.0	0.34	0.32	0.37	0.34	19.6
50.0	80.0	20.0	0.52	0.47	0.73	0.56	28.4
50.0	70.0	30.0	0.81	0.91	0.90	0.87	49.4
50.0	60.0	40.0	1.24	1.21	1.09	1.18	67.0
50.0	50.0	50.0	1.57	1.39	1.63	1.53	87.0
50.0	40.0	60.0	1.72	1.86	1.78	1.79	101.7
50.0	31.0	70.0	1.90	1.80	1.86	1.85	105.1
50.0	20.0	80.0	1.85	1.58	1.91	1.78	101.1
50.0	10.0	90.0	1.90	1.72	1.93	1.85	105.1
50.0	0.0	100.0	1.82	1.68	1.79	1.76	100.0

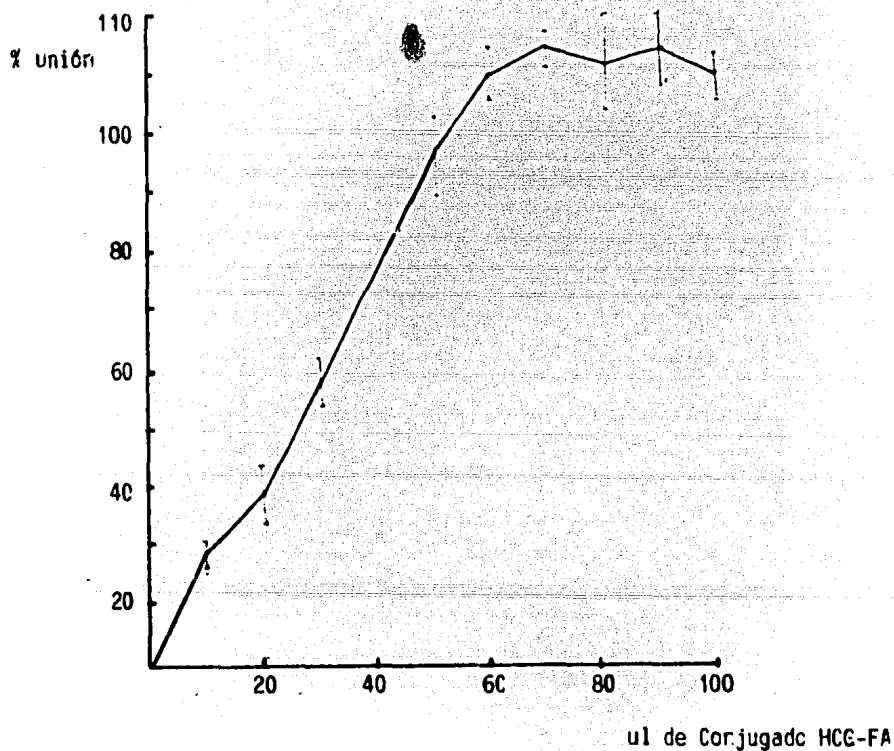


Fig. 12: Gráfica de ensayo de unión directa, se indican los volúmenes -- adicionados de HCG-FA a 50 ul de la suspensión de estafilococo anti HCG, la mezcla se incubó 30 minutos, se lavó y se adicionó el sustrato, la reacción se detuvo con 1 ml. de Na OH 0.25 N. Cada punto representa el promedio de muestras analizadas por -- triplicado.

ENSAYOS DE DESPLAZAMIENTO DE HCG-FA POR HCG PARA LA CUANTIFICACION DE HCG

Los resultados obtenidos en los dos procedimientos competitivos tanto en un paso, como en dos pasos se expresan en la tabla V. Cada muestra se analizó por triplicado. Se consideró como el 100% de unión, los tubos en donde no se adicionaron concentraciones de HCG estándar.

Tabla V.- Absorbancias obtenidas en los ensayos para la determinación cuantitativa de HCG, analizadas por triplicado y expresadas en porcentaje de unión.

ENSAYO COMPETITIVO EN UN PASO

mUI de HCG adicionadas por ml.	Log ₁₀ C _e mUI de HCG	Absorbancias				% Unión
		A1	A2	A3	A D.E.	
1000.0	3.0	0.36	0.40	0.47	0.41±0.05	50.6
250.0	2.3	0.31	0.44	0.30	0.35±0.07	43.2
62.0	1.7	0.53	0.65	0.74	0.64±0.10	79.0
15.0	1.17	0.38	0.35	0.36	0.36±0.01	44.0
3.5	0.54	0.43	0.43	0.44	0.43±0.005	53.0
0.8	0.09	0.59	0.66	0.38	0.54±0.1	66.6
0.0	0.0	0.66	0.83	0.95	0.81±0.1	100.0

ENSAYO COMPETITIVO EN DOS PASOS

1000.0	3.0	0.15	0.11	0.07	0.11±0.03	23.9
250.0	2.3	0.21	0.35	0.17	0.24±0.09	52.1
62.0	1.7	0.21	0.23	0.32	0.25±0.05	54.3
15.0	1.1	0.31	0.28	0.28	0.29±0.005	63.04
3.5	0.54	0.27	0.27	0.41	0.31±0.08	67.34
0.8	0.09	0.47	0.40	0.39	0.42±0.04	91.3
0.0	0.0	0.52	0.39	0.46	0.46±0.05	100.0

D_e de \bar{A} ; absorbancia promedio

D.E. ; desviación estándar

El comportamiento global de desplazamiento del conjugado HCG-FA por la adición de concentraciones de HCG estándar, se observó mejor en el ensayo -- competitivo en dos pasos (fig. 13). En el ensayo en un solo paso este desplazamiento es más irregular. Por lo tanto se prefirió usar el ensayo competi-- tivo en dos pasos para la determinación cuantitativa de HCG.

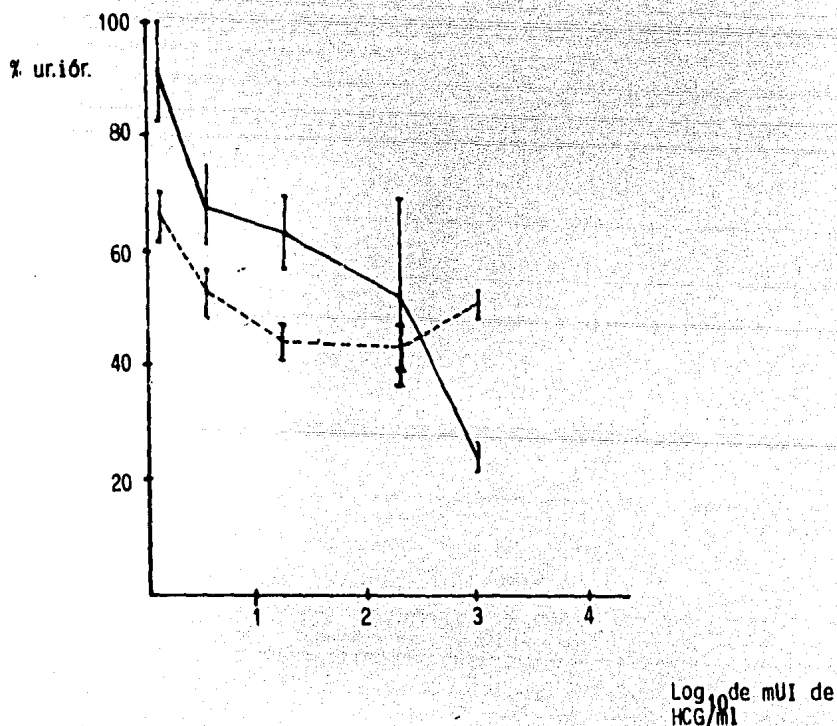


Fig. 13: Ensayos de desplazamiento de HCG-FA, por adición al sistema de diferentes cantidades de HCG estándar. En línea continua (—), el ensayo competitivo en dos pasos y en línea punteada (- - - -), el ensayo competitivo en un paso. Se observa un mejor comportamiento de desplazamiento en el método en dos pasos.

ENSAYO COMPETITIVO EN DOS PASOS PARA HCG CON DIFERENCIA EN TIEMPO
DE PREINCUBACION

En la tabla VII muestra los resultados de dos diferentes tiempos de preincubación de HCG de 15 y 30 minutos con la suspensión de E-anti-HCG, antes de la adición del conjugado HCG-FA. El ensayo con 15 minutos de preincubación se realizó por cuadruplicado por muestra y para el que utilizó 30 minutos se hizo por triplicado.

Tabla VII.- Resultados de absorbancias de ensayos competitivos en dos pasos para HCG utilizando dos tiempos de preincubación de HCG con E-anti-HCG.

ENSAYO COMPETITIVO EN DOS PASOS CON 15 MINUTOS DE PREINCUBACION

Log ₁₀ de mUI de HCG/ml	A1	A2	A3	A4	\bar{A}	DE	% Unión
3.0	0.077	0.084	0.082	0.104	0.086 [±] 0.003		28
2.9	0.097	0.088	0.072	0.070	0.079 [±] 0.012		25
2.7	0.112	0.136	0.073	0.076	0.099 [±] 0.030		32
2.6	0.115	0.138	0.106	0.169	0.132 [±] 0.028		42
2.3	0.151	0.149	0.149	0.151	0.150 [±] 0.001		48
2.0	0.200	0.157	0.176	0.217	0.187 [±] 0.026		60
0.0	0.300	0.330	0.345	0.261	0.307 [±] 0.037		100

ENSAYO COMPETITIVO EN DOS PASOS CON 30 MINUTOS DE PREINCUBACION

3.0	0.05	0.094	0.097		0.093 [±] 0.003		20
2.9	----	0.100	0.104		0.102 [±] 0.002		22
2.7	----	0.106	0.102		0.104 [±] 0.002		22
2.6	0.141	0.152	0.156		0.144 [±] 0.007		32
2.3	0.164	0.174	0.156		0.164 [±] 0.009		35
2.0	0.280	0.251	0.220		0.250 [±] 0.030		54
0.0	0.496	0.456	0.422		0.458 [±] 0.037		100

Donde:--: Muestras no determinadas

\bar{A} : Absorbancia promedio

En la fig. 14 aparecen las curvas de dos tiempos de preincubación en el ensayo competitivo en dos pasos para la determinación cuantitativa de HCG. Se observa que hay mayor desplazamiento de HCG-FA, con menores concentraciones de HCG, en el ensayo con 30 min. de preincubación. En ensayos posteriores se trabajó con el procedimiento de 30 min de preincubación del E-anti-HCG, antes de la adición de HCG-FA.

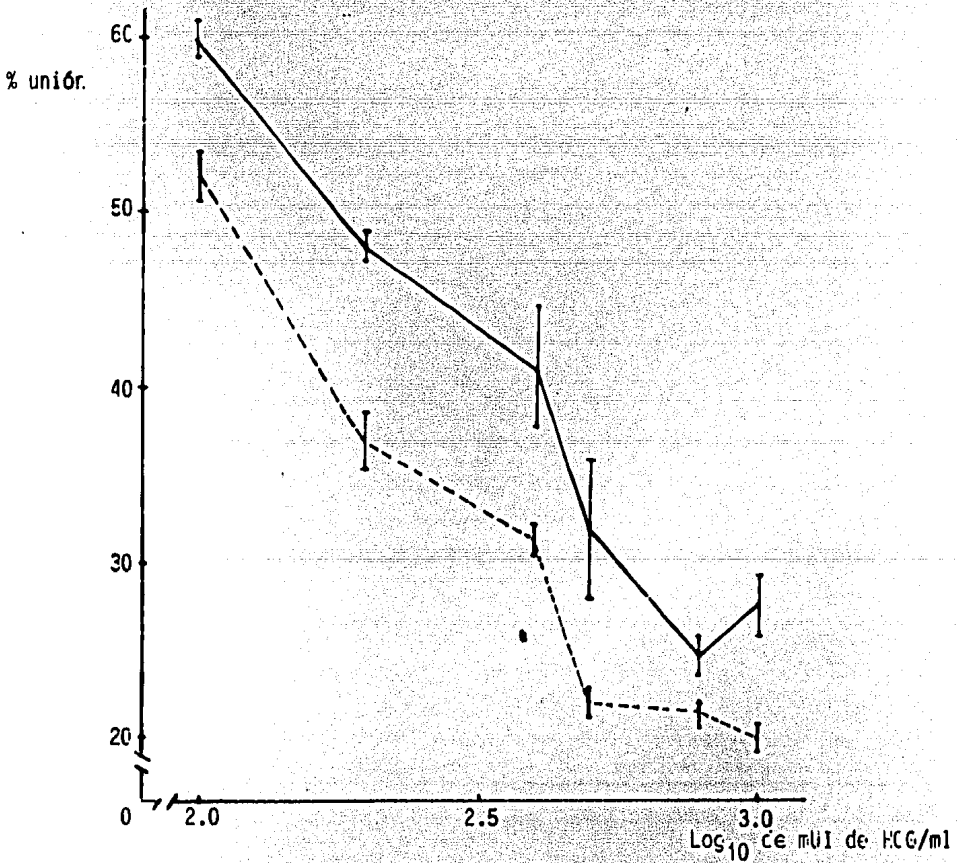


Fig. 14: Ensayo de dos diferentes tiempos de preincubación en el ensayo enzimático competitivo en dos pasos para la determinación de HCG. En línea continua se representa 15 min. de preincubación y en línea -- discontinua 30 min.

CONTROLES DE UNION INESPECIFICA EN EL ENSAYO INMUNOMETRICO

Como se observa en la tabla VI el uso del detergente Monolaurato de polioxietilensorbitan (Tween 20) al 0.5% en el PBS utilizado en el ensayo disminuye a menos del 10% la unión inespecífica. Las medias de las absorbencias a 405 m μ , son el resultado de muestras por triplicado.

Tabla VI.- Inhibición de la unión inespecífica por el uso de Tween 20, en el amortiguador de ensayo, expresados en por - - ciento de unión.

Control	Vol. de esta- filococos sin anti-HCG (ul)	Vol. de esta- filococos an- ti-HCG (ul)	PBS (ul)	Vol.de HCG-FA(ul)	PBS		PBS-Tween	
					A	% U	A	% U
100 % de Unión	--	50	100	50	0.45	100	0.89	100.0
Unión inespecífica a vidrio	--	--	150	50	0.12	26	0.05	6.6
Unión inespecífica a estafilococo	50	--	100	50	0.21	47	0.081	9.1
0 % de Unión	--	50	150	--	0.0	0.0	0.0	0.0

Donde: \bar{A} ; absorbancia promedio de muestras por triplicado.

OBTENCION DE CURVA ESTANDAR PARA DETERMINACION DE HCG

Los resultados obtenidos para la curva estándar, aparecen en la tabla - VIII, también se muestran los resultados del procesamiento de estos datos, - con el sistema logit-log, para linearizar la curva (42).

Tabla VIII.- Resultados de la obtención de curva estándar para la deter_ minación cuantitativa de HCG, mediante análisis immunoenzi_ mático competitivo en dos pasos.

mUI de HCG/ml	Lc ₅₀ de mUI de HCG/ml	Absorbancia	Y- % Unión	\bar{Y}	Lcgit Y	Logit \bar{Y}
125	2.09	0.679	89.57	94.47	2.15	3.06
		0.743	98.02		3.90	
		0.711	95.82		3.13	
250	2.39	0.622	94.52	77.46	2.84	1.48
		0.515	67.94		0.75	
		0.530	69.92		0.04	
500	2.69	0.305	40.23	37.37	-0.39	-0.56
		0.258	34.03		-0.66	
		0.280	37.83		-0.49	
750	2.87	0.145	25.46	27.56	-1.44	-1.09
		0.243	32.05		-0.35	
		0.191	25.19		-1.00	
1000	3.0	0.131	17.41	17.45	-1.56	-1.55
		0.140	18.46		-1.48	
		0.125	16.49		-1.62	

Donde:

$$Y = \% \text{ Unión} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia para 0 mUI de PCE}} \times 100$$

\bar{Y} = Promedio de los porcentajes de unión (% U), por dosis.

$$\text{Logit } Y = \text{Ln} \left(\frac{Y}{100 - Y} \right)$$

Logit \bar{Y} = Promedio de los valores logit Y por dosis.

REPRODUCIBILIDAD

Para observar la reproducibilidad del ensayo inmunoenzimático se presenta en la tabla IX el promedio de las lecturas de absorbancias obtenidas de -- dos dosis, una baja y otra alta. Por sextuplicado para los intraensayos y de tres días: 1, 5 y 6, para los interensayos.

Tabla IX.- Resultados de reproducibilidad del ensayo inmunoensimático.

Concentración mUI de PCE/ml	D.O.	Intra-Ensayo		D.O.	Inter-Ensayo	
		D.E.	C.V.%		D.E.	C.V.%
250	0.326	0.048	14.7	0.403	0.130	33.0
750	0.211	0.011	5.2	0.205	0.010	4.8

En la figura 15 se muestra la curva estándar obtenida para la determinación -
cuantitativa de HCG, en el rango de 200 a 1000 mUI/ml.

En la figura 16 se grafican los resultados de la curva estándar pero sometidos
al proceso logit-log.

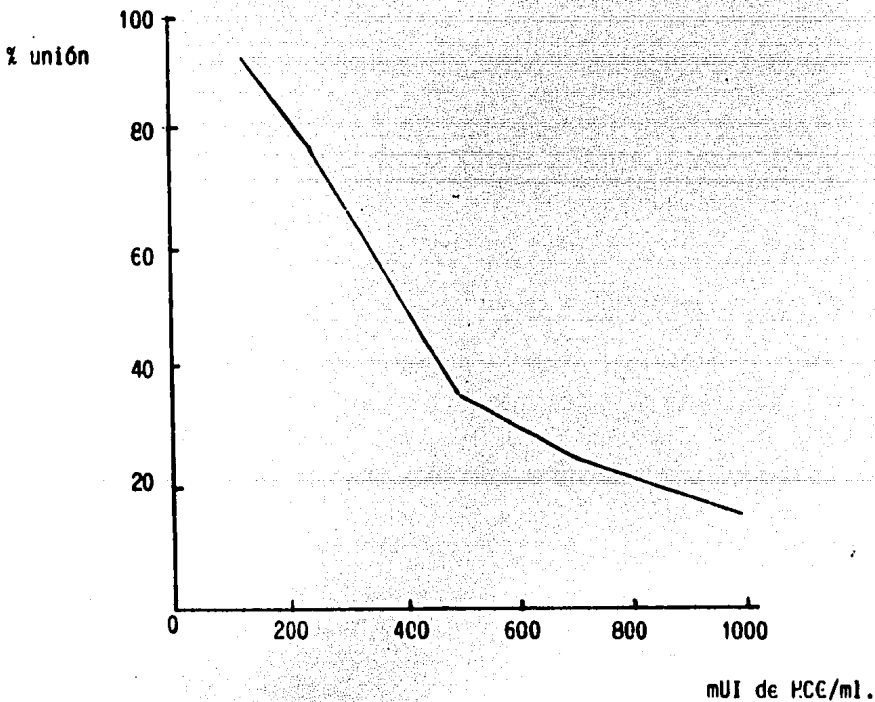


Figura 15: Curva estándar dosis-respuesta para la determinación de HCG, por el método inmunoenzimático de tipo competitivo en dos pasos.

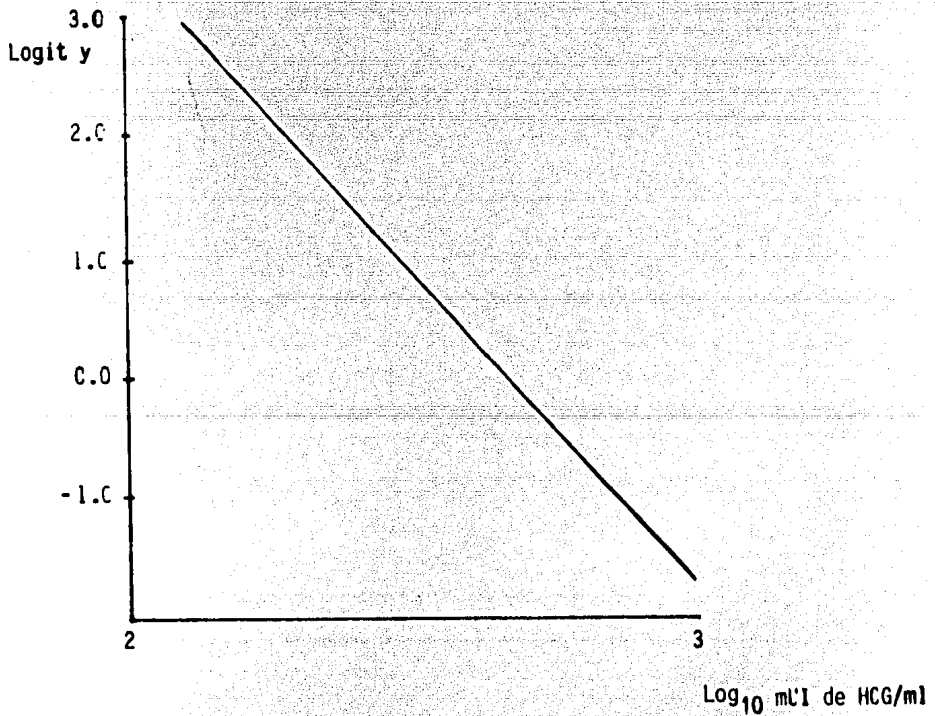


Fig. 16: Curva estándar dosis respuesta transformada en forma lineal mediante el sistema Logit-log. $r=0.993$.

DISCUSION

Con base a los resultados obtenidos en la adaptación de la coagulina para la determinación de HCG, se demuestra que es tan confiable comparada con los métodos cualitativos existentes comercialmente como la técnica de inhibición de la hemaglutinación. Sin embargo la aglutinación que se observó no es tan intensa como la de aglutinación de látex. Las razones para este comportamiento posiblemente se deban a que la HCG, es una proteína de PM bajo y que esto sea la causa de que las bacterias de E-anti-HCG no formen grandes aglutinados visibles, como se formaron cuando en un experimento diferente se elaboró una suspensión de estafilococos con anticuerpos anti-IgG humana y luego se efectuó una prueba de coagulación para la determinación de IgG humana.

Con respecto a la especificidad se considera que ésta depende del antisuero utilizado. El anticuerpo utilizado en la coagulación como en la técnica inmunocimática, fué purificado por cromatografía de afinidad y no fue tan específico como lo hubiera sido el poseer el anticuerpo específico contra la subunidad beta de HCG, o mejor aún contra la porción carboxilo terminal de esta subunidad, que comprende 30 aminoácidos aproximadamente y que realmente es la región más específica de la hormona, esto podría haber disminuido algunos resultados falsos positivos, aunque aumentaría el costo de la prueba. Los falsos positivos obtenidos reportaron contaminación bacteriana (examen del sedimento urinario) y al parecer esto interfiere en la coagulación y en la hemaglutinación. Otras causas de pruebas falsas positivas pueden ser la presencia de ferotiacinas o sus derivados, eritrocitos o altos niveles de proteína en orina (1). La posibilidad de una reacción cruzada con LH es mínima ya -

que las concentraciones normales reportadas para esta hormona en orina son de 0.25 ± 0.14 UI/ml para mujeres post menopáusicas y 0.12 ± 0.06 UI/ml para mujeres en edad fértil (13), que están por abajo del nivel de sensibilidad de nuestra prueba.

Una vez establecida la técnica cualitativa de coaglutinación, la fase siguiente consistió en adoptar el principio para la determinación cuantitativa de HCG, utilizando la misma suspensión de estafilococos recubierta con anti-HCG, para lo cual se elaboró un conjugado HCG-FA, mediante la técnica de glutaraldehído. Se comenzó probando dos modalidades del tipo de ensayo competitivo: en un solo paso y en dos pasos, en este último se observó mejor comportamiento de desplazamiento del conjugado HCG-FA. Por lo tanto se eligió como el método más viable y se continuó su estandarización. Cuando se sometió a dos tiempos diferentes de preincubación de la muestra (HCG), con la suspensión de E-anti-HCG, se observó mejor sensibilidad cuando se preincubaba por 30 minutos en vez de 15 minutos.

En cuanto a las reacciones inespecíficas, muchas de ellas son dadas por interacciones hidrofóbicas entre proteínas y vidrio o plástico, detergentes no iónicos previenen este tipo de interacción, aunque no la revierten. La incorporación de bajas concentraciones de un detergente en el amortiguador de incubación ayuda a eliminar en mucho la reacción inespecífica y no interviene con la reacción antigénico anticuerpo (43). Algunos investigadores adicionan proteínas no relacionadas como albúmina sérica bovina o gelatina, para minimizar estas interacciones inespecíficas. En nuestro caso la reacción inespecífica del ensayo se disminuyó hasta menos del 10% con la adición del detergente no iónico Tween 20 al 0.5% en el amortiguador empleado (PBS), aunque se intentó disminuir aún más la reacción inespecífica aumentando el número de lavados hasta cinco en lugar de los tres que se empleaban o transfiriendo la sus-

penión de estafilococos lavados de los tubos de incubación a tubos limpios, esto no se logró ya que las lecturas de absorbancia disminuían y eran más imprecisas. La mejor curva dosis respuesta se obtuvo en el rango de 125 a 1000 mUI de HCG/ml de PBS. Esta sensibilidad no es muy alta en comparación con la que se reporta para muchos ensayos cuantitativos que determinan HCG como RIA y ELISA.

Esta falta de sensibilidad puede deberse a que el conjugado HCG-FA se hizo con glutaraldehído, un agente acoplante homotifuncional. El glutaraldehído es un dialdehído donde sus grupos carbonilo se combinan con los grupos ϵ -amino de las proteínas. Los resultados obtenidos en otros trabajos han demostrado que el glutaraldehído es uno de los reactivos más efectivos y convenientes para producir conjugados proteína-enzima que retengan en gran parte su actividad enzimática e inmunológica (44), sin embargo los grupos aldehído reaccionan indistintamente con los grupos amino primarios, inclusive de la misma proteína, produciéndose una población heterogénea de complejos y polímeros de las proteínas que se quiere conjugar (45,46) en nuestro caso de HCG y FA. Además es necesario también utilizar algún procedimiento de purificación del conjugado elaborado, para que éste no contenga enzima (activa o desnaturalizada) y hormona sin conjugar. El uso de agentes acoplantes heterobifuncionales como: Tollen-2,4-diisocianato (47), ó N-(m-maleimidobenzoil-oxi) succinimida (48), junto con procesos de purificación del conjugado, como puede ser una continuación de cromatografía de afinidad y gel filtración, pueden dar resultados más satisfactorios en la elaboración de inmunoensayos más sensibles.

La reproducibilidad representada por las determinaciones inter e intra-ensayo, demostró ser baja. Esto se podría explicar por una posible libera---

ción gradual de IgG de la pared celular del estafilococo, aunque no se han -- hecho estudios al respecto, se puede inferir esta liberación por resultados -- obtenidos por Kessler (38), de suspensiones de estafilococos al 10% (v/v) inicialmente unían aproximadamente 42 ug de IgG, sin embargo este nivel disminuía aproximadamente un 10% después de tres semanas de almacenamiento a 4 C. Suponiendo que este porcentaje tuviera equivalencia en IgG que se liberara en el caso del recubrimiento de un lote fresco de una suspensión de estafilococo, esta continuaría siendo útil para la determinación cualitativa de HCG, pero -- esta misma pérdida de IgG tendría un mayor efecto en la determinación cuantitativa. Una alternativa posible para solucionar el problema sería que después de llevar a cabo la unión espontánea de IgG, a la pared del estafilococo, -- usar entonces algún reactivo que la fijara en forma covalente para utilizar a la suspensión en determinaciones cuantitativas con una mayor reproducibilidad. Este procedimiento puede aplicarse a otras bacterias de las cepas estreptococales humanas del grupo G, en las que se ha demostrado que también expresan -- proteínas de superficie con afinidad para la región Fc de inmunoglobulina G -- (32).

Dentro de las ventajas de utilizar al estafilococo recubierto con anticuerpos como soporte sólido en los inmunoensayos, está su preparación fácil, el procedimiento de recubrimiento no lleva más de dos horas y la reactividad se conserva por al menos cuatro meses a 4°C (20), para fines cualitativos y -- para pruebas cuantitativas, es necesario preparar las suspensiones con poco -- tiempo de anticipación para su uso y evitar utilizar la suspensión después de 15 días aproximadamente de preparada, realizando curva estándar cada vez que se hagan determinaciones. Incluso, la suspensión de estafilococos se puede -- preparar en grandes cantidades, se allicueta, se liofiliza y luego puede rehidratarse y recubrir con anticuerpos específicos en el momento que se requiera

C O N C L U S I O N

La determinación de HCG, es una de las pruebas más utilizadas por el laboratorio de diagnóstico clínico. En este trabajo se desarrollaron dos técnicas para su detección tanto en forma cualitativa como cuantitativa. Para ambas técnicas se utilizó a la bacteria Staphylococcus aureus cepa Cowan 1, como soporte sólido. El método cualitativo, denominado coaglutinación, resultó ser tan confiable como el método de inhibición de la hemaglutinación disponible en el comercio, como lo demostró el análisis comparado que se llevó a cabo. Por otro lado, para el ensayo cuantitativo se diseñó una técnica inmunoenzimática para lo cual se establecieron las condiciones óptimas de ensayo ya que no existían antecedentes en la literatura del uso de la bacteria en esta modalidad, anteriormente solo se había utilizado como agente precipitante de complejos inmunes. Se obtuvo una curva estándar para la determinación de 200 a 1000 mUI de HCG/ml, sin embargo, es necesario hacer estudios comparativos de esta técnica con métodos cuantitativos comerciales.

Las ventajas del uso de la bacteria de estafilococo en estas técnicas -- son su bajo costo, su sensibilidad, su fácil ejecución y además la versatilidad para poder recubrir al estafilococo con anticuerpos específicos contra -- los antígenos que se deseen determinar, ya sea en forma cualitativa o cuantitativa. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios para conocer y -- mejorar la estabilidad de la suspensión de estafilococo recubierta con anti-- cuerpos para su uso rutinario en el laboratorio.

REACTIVOS EMPLEADOS

PBS (amortiguador salino de fosfatos) 0.15 M, pH 7.2

NaCl.....	8.0 g.
KH_2PO_4	0.2 g.
Na_2HPO_4	1.15 g.
KCl.....	0.2 g.
H_2O hasta aforar a.....	1.0 l.

PBS - Tween.

PBS.....	1.0 l.
Tween 20.....	0.5 ml.

Amortiguador de recubrimiento

Na_2CO_3	1.59 g.
NaHCO_3	2.39 g.
NaN_3	0.2 g.
H_2O hasta aforar a.....	1.0 l.

Amortiguador de sustrato

Na_2CO_3	1.34 g.
NaHCO_3	1.27 g.
$\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.20 g.
H_2O hasta aforar a.....	1.0 l.

GLOSARIO DE TERMINOS MEDICOS ONCOLOGICOS

Carcinoma; crecimiento maligno de tejido epidérmico (p.ej. piel, membrana) mucosa) y derivados como las glándulas.

Coriocarcinoma; un tumor altamente maligno originándose de células coriónicas, usualmente después de una mola hidatidiforme, pero puede seguir -- aborto o aún preñez normal, rápidamente hace metastasis especialmente -- hacia los pulmones.

Mola hidatidiforme; una condición en que el vello coriónico de la placenta sufre una degeneración cística y el feto es absorbido. Una proporción de las molas son activas y se continúan remanentes cambios malignos pueden continuar dando origen a un corioepitelioma.

Seminoma; un tumor maligno de los testículos.

Teratoma; un tumor de origen embrionario y compuesto de varias estructuras incluyendo tejidos tanto epitelial como conectivo, más comúnmente encontrado en los ovarios y testículos, la mayoría son malignos.

- 1.- Davidsohn, I.; Bernard, H.J.: Diagnóstico clínico por el Laboratorio. Ed. Salvat España. 1979; cap 26:1325.
- 2.- Guyton, C.A.: Tratado de Fisiología Médica. Cuarta Edición. Ed. Interamericana. España. 1971:1011.
- 3.- Kerber, I.J.; Inclan, P.; Fowler, E.A.; Davis, K. and Fish, S.A.: Immunologic test for pregnancy. Obstet Gynec. 1970; 36:37
- 4.- Yashia, C.: The quantitative toad test in normal and abnormal early gestation. Obstet Gynec. 1964; 23:547.
- 5.- Char, P.K.; Lee, C.Y.; Ma.L.: Purification and characterization of human chorionic gonadotropin in hydatidiform mole. Gonadotropins and gonadal function N.R. Mcdgal. Academic Press. N.Y. 1974:93
- 6.- Ayala, A.R.; González, E.; Castorena, G.; McIntoy, J.J.: Seguimiento de neoplasias del trofoblasto mediante radioinmunoanálisis del fragmento carboxiterminal de beta-coriogonadotropina (CCCH-beta-HCG-RIA) en orina. - - Arch. Invest. Med. (Mex). 1984; 15:139.
- 7.- Carlsen, B.R.; Bahl, P.O.; Swaminathan N.: Human chorionic gonadotropin. Journal of Biological Chemistry. 1973; 248:6810.
- 8.- Mergar, F.; Birken, S.; Canfield, E.: Chemistry of human chorionic gonadotropin. Gonadotropins and gonadal function. N.R. Mcdgal Academic Press. N.Y. 1974:79
- 9.- Morgan, J.F.; Canfield, E.R.: Nature of the subunits of human chorionic gonadotropin. Endocrinology. 1971; 88:1045.
- 10.- Rao, S.S.; Murthy, D.; Sheth, A.: Gonadotropins: a correlation of their biological and immunological activities. Gonadotropins and gonadal function. N.R. Mcdgal. Academic Press N.Y. 1974. 161.

- 11.- Lenton, A.E.; Grudzinskas, J.G.; Neal, M.L.; Chard, T.; Cooke, D.I.: --- Chorionic gonadotropin concentration in early human pregnancy: Comparison of specific and nonspecific assays. Fertility and sterility. 1981; - 35:40.
- 12.- Foster, J.P.: Detection of early pregnancy using immunological methods. Immunological Aspects of Reproduction in Mammals. Ed. Buher Worths. London. 1984: 91.
- 13.- Leuversing, W.H.; Goverde, C.B.; Thal, P.; Schuurs A.: A homogeneous sol - particle immunoassay for human chorionic gonadotropin using monoclonal - antibodies. Journal of Immunological methods. 1983; 60:9.
- 14.- Bellet, D.; Bidart, M.J.; Jolivet, M.: A monoclonal antibody against a - synthetic peptide is specific for the free native human chorionic gonadotropin B-sub unit. Endocrinology. 1984; 115:330
- 15.- Caraux, J.; Chichehian, B.; Gestin, C.; Longhy, B.: Non-cross reactive - monoclonal antibodies to human chorionic gonadotropin generated immunization with a synthetic peptide. The Journal of Immunology. 1985; 134:835.
- 16.- Rouslahti, E.; Engvall, E.: Monoclonal antibodies in immunoassays. Clinical Immunology Newsletter. 1982; 3:139
- 17.- Yolken, H.R.: Enzyme immunoassay for the detection of infectious antigens in body fluids: Current limitations and future prospect. Reviews of infectious diseases. 1982; 4:35.
- 18.- Olsner, P.: Serological methods for rapid diagnosis of Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis and Streptococcus pneumoniae in cerebrospinal fluid: A comparison of coagglutination, immunofluorescence and immunoelectrophoresis. Scandinavian Journal Infectious Diseases. 1979; 148:453.

- 19.- Rockhill, C.R.; Rumans, W.L.; Lesmana, M.; Dennis, T.D.: Detection of -- *Salmonella typhi*. D, Vi, and c. antigens, by slide coagglutination, in -- urine from patients with typhoid Fever. Journal of Clinical Microbiology; 1980; 11:213.
- 20.- Saksanong, M.; Dajani, S.A.: Detection of *Haemophilus influenzae* type b antigens in body fluids, using specific antibody coated staphylococci. - Journal of clinical Microbiology. 1977; 5:81.
- 21.- Thyrumoorthi, M.; Dajani, A.: Comparison of staphylococcal coagglutination Latex agglutination, and counter immunoelectrophoresis for bacterial antigen detection. Journal of Clinical Microbiology 1979; 9:28
- 22.- Davis, D.B.; Dulbecco, R.; Eisen, N.; Ginsberg, S.H.; Wood, B.: Treatado de Microbiologia 2a. edición. Ed. Salvat. España. 1978;752.
- 23.- Castrelos, D.O.; Constantino, S.; Cardoso, I.: Estudio sobre las condi-- ciones de fijación de IgG a la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 1985; XIX:83.
- 24.- Langone, J.J.: Protein A of *staphylococcus aureus* and related immunoglobulin receptors produced by streptococci and pneumococci. Advances in - - Immunology. 1962; 32:157.
- 25.- Fcrrsgren, A.; Sjoquist, J.: Protein A *Staphylococcus aureus* III Reaction with rabbit-globulin. The Journal of Immunology. 1967; 99:19.
- 26.- Sjoquist, J.; Moritz, J.; Johansson, I.; Hjelm, H.: Localization of protein A in the bacteria. European Journal Biochemistry 1972; 30:190.
- 27.- Sjoquist, J.; Meloun, B.; Hjelm, H.: Protein A isolated from *Staphylococcus aureus* after digestion with lysostaphin. Eur. J. Biochem. 1972; 29: 572.

- 28.- Lindmarck, R.; Movitz, J.; Sjoquist, J.: Extracellular protein A from a methicillin-resistan strain of Staphylococcus aureus. Eur. J. Biochem. 1977; 74:623
- 29.- Jensen, K.: Undersogelser over statylococernes antigenstruktur. Ejnar - Munksgaard, Copenhagen. 1959.
- 30.- Krcnvall, G.; Seal, U.; Finstan, J.; Williams, R.: Phylogenetic insight into evolution A. The Journal of Immunology. 1970: 104:140
- 31.- Bjork, I.; Petterson, B.; Sjoquist, J.: Some physicochemical properties of protein A from Staphylococcus aureus. European Journal Biochemistry 1972; 29:579.
- 32.- Akerstrom, B.; Crodin, T.; Reis, K.; Bjorck, L.: Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. The Journal of Immunology. 1985; 135:2589.
- 33.- Jonsson, S.; Krcnvall, G.: The use of protein A containing Staphylococcus aureus as solid phase anti-IgG reagent in radioimmunoassays as exemplified in the quantitation of -Fetoprotein in normal human adult serum. European Journal Immunology. 1974; 4:29.
- 34.- Tevaawerk, M.J.; Clarck, F.; Rose, I.; Mcriarty, T.; Hurst, J.: An ultra sensitive radioligand assay for IgG using the protein A on Staphylococcus aureus bacteria. Journal of Immunoassay. 1984; 5:267
- 35.- Langone. J.J.: Use of labeled protein A in quantitative immunochemical - analysis of antigens and antibodies. Journal of Immunological Methods. - 1982; 51:3
- 36.- Keros-Gangeot, L.; Lebrun, L.;Briantais, M.; Pillot, J.: A critical study of the use of staphylococci containing protein A for separation of -- IgG and IgM antibodies. Journal of Immunological Methods. 1982; 51:33.

- 37.- Envall, E.: Preparation of enzyme-labelled staphylococcal protein A and its use for detection of antibodies. Scandinavian Journal Immunology. -- 1978; 8:25
- 38.- Kessler, W.: Cell membrane antigen isolation with the staphylococcal protein A-antibody adsorbent. The Journal of Immunology. 1976; 117:1482.
- 39.- Ergvall, E.; Perlmann, P: Enzyme Linked immunosorbent assay (ELISA) Immunochimistry. 1971; 8:874.
- 40.- Parkhouse, R.M.E.; Abney, E.R.: Manual del curso de Tecnología de hibridomas aplicada al diagnóstico serológico de la oncocercosis. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. I.P.N. 1972,
- 41.- Galen, S.R.: Predictive value theory. Diagnostic Medicine. 1979; Feb:31.
- 42.- Bedolla, T.N.; Ulloa-Aguirre, A.; Landeros, V.; Pérez-Palacios, G.: Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis. I. Guía para la evaluación de resultados. Revista de Investigación Clínica (Mex) 1984; 36:179.
- 43.- Nakamura, R.M.; Dito, W.R.: Immunoassays in the clinical Laboratory Ed. Alan, R. Liss, Inc. New York. 1979:92.
- 44.- Avrameas, S.: Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Immunochimistry. 1969; 6:43
- 45.- Bocrsma, D.M.; Streefkerk, J.G.: Periodate or glutaraldehyde for preparing peroxidase conjugates. Journal of Immunological Methods. 1979; 30: 245.
- 46.- Johnson, D.G.; Holborow, J.E.; Dorling, J.: Immunofluorescence and immunoenzyme techniques in the Handbook of Experimental Immunology. Third -- edition. Ed. by Weir. Blackwell Scientific Publications. Vol. 1 Chap. 15 Londres. 1978.

- 47.- Wood, B.T.: Fluorescent antibody staining III. Journal Immunology. 1965; 95:225
- 48.- Kikutani, M.; Ishiguro, M.; Kitagawa, T.; Imamura, S.; Miura, S.: Enzyme immunoassay of human chorionic gonadotropin employing B-galactosidase as Label. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 1978; 47:980.
- 49.- Cambiaso, C.L.; Cottinet, A.; Vaerman, J.P.; Heremans, J.: Glutaraldehyde-activated 6-amino-hexyl-sepharose as a new versatile immunoabsorbent. -- Immunochemistry. 1975;12:273.