

## Bioquímica

Volumen 29  
Volume

Número 2  
Number

Abril- Junio 2004  
April-June

*Artículo:*

Ensayo inmunturbidimétrico para la  
cuantificación de IgA, IgG e IgM en  
suero humano

Derechos reservados, Copyright © 2004:  
Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC

**Otras secciones de  
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in  
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



[www.Medigraphic.com](http://www.Medigraphic.com)

# Ensayo inmunturbidimétrico para la cuantificación de IgA, IgG e IgM en suero humano

Vivian Alonso Ramos,\* Antonio Melchor Rodríguez,\*\* Raquel López Cisneros,\*\*  
Ivonne Gómez Cordero,\*\*\* Orlando Zulueta Rodríguez,\*\* Liliana Hernández Pérez,\*\*  
Milagros Álvarez García,\* Enny Morales Rodríguez,\* Grisell Turró Grau\*

## RESUMEN

La determinación de inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM contribuye significativamente al diagnóstico de diversas enfermedades por inmunodeficiencias, gammopatías monoclonales y enfermedades infecciosas crónicas y agudas entre otras, por lo que se decidió estandarizar un método para su cuantificación utilizando la tecnología SUMA. Con este objetivo se prepararon el estándar, el suero de control y los antisueros humanos anti IgA, IgG e IgM. Las concentraciones de las inmunoglobulinas en el estándar fueron IgA: 4.75 mg/mL, IgG: 21.5 mg/mL e IgM: 2.61 mg/mL y se determinaron utilizando como referencia un estándar secundario (Boehringer Mannheim, Precimat IgA, G, M; Alemania). Los estándares fueron correlacionados obteniéndose los siguientes coeficientes: para IgA 0.96; para IgG 0.98; para IgM 0.98, los resultados de los estudios de precisión intra e interensayo fueron inferiores al 10%, la recuperación superior al 96% y se obtuvo buen paralelismo entre las muestras ensayadas. Los estudios de estabilidad de los antisueros demostraron que son confiables hasta 98 días después de haber sido reconstituidos. Para el estándar se obtuvo una estabilidad de 24 meses y para el suero de control de 12 meses. El estudio poblacional mostró valores de  $2.2 \pm 1.4$  mg/mL para IgA, de  $12.75 \pm 3.18$  mg/mL para IgG y de  $1.91 \pm 0.84$  mg/mL para IgM.

**Palabras clave:** IgA, IgG, IgM, turbidimetría.

## ABSTRACT

The determination of immunoglobulins IgA, IgG and IgM, significantly contribute to the diagnosis of several illnesses caused by immunodeficiencies, monoclonal gammopathy, and chronic and acute infectious diseases among others, what led to the decision of standardizing a method for their quantification using the SUMA Technology. To this aim, the standard, the control serum and the human antisera anti IgA, IgG and IgM were prepared. The immunoglobulin concentrations in the standard were as follows: IgA: 4.75 mg/mL, IgG: 21.5 mg/mL and IgM: 2.61 mg/mL, and they were determined using as reference an secondary standard (Boehringer Mannheim, Precimat IgA, G, M; Germany). The standards were correlated obtaining the following coefficients: for IgA 0.96; for IgG 0.98; for IgM 0.98, the results of the precision studies (intra and inter assay) were lower than 10%, the recovery values were superior to 96%, and a good parallelism was obtained among the samples assayed. The stability studies of antisera demonstrated that they are reliable after 98 days of having been reconstituted. For the standard a stability of 24 months was obtained, and 12 months for the control serum. The population study results were  $2.2 \pm 1.4$  mg/mL for IgA,  $12.75 \pm 3.18$  mg/mL for IgG and  $1.91 \pm 0.84$  mg/mL for IgM.

**Key words:** IgA, IgG, IgM, turbidimetry.

\* Laboratorio de Control de Calidad, Centro de Inmunoensayo.

\*\* Laboratorio de Purificaciones, Centro de Inmunoensayo.

\*\*\* Laboratorio de Síntesis de Péptidos del Centro de Inmunoensayo.

## Correspondencia:

Lic. Vivian Alonso Ramos

Laboratorio Control de Calidad, Centro de Inmunoensayo, Calle 134 y Ave 25, Reparto Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana, Cuba.

E-mail: ccinmuno@cie.sld.cu

Recibido: 05-08-2003

Aceptado: 16-04-2004

## INTRODUCCIÓN

El estudio de las principales clases de inmunoglobulinas A, G y M, específicas o totales es de especial interés en el laboratorio inmunoquímico moderno. Así, la caracterización y cuantificación de estas inmunoglobulinas son exámenes necesarios para el diagnóstico y seguimiento de las inmunodeficiencias y otras enfermedades.

Las inmunoglobulinas son moléculas de la inmunidad humoral específica y una de sus principales funciones fisiológicas es la defensa contra los microorganismos extracelulares y las toxinas producidas por los distintos agentes microbianos.<sup>1</sup>

La unidad estructural básica de estas inmunoglobulinas es una glicoproteína de peso molecular de 150,000 Da compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, las cuales están asociadas por cuatro puentes disulfuros.<sup>2</sup>

La inmunoglobulina A (IgA) es producida principalmente por las células B en placas de Peyer, amígdalas y otros tejidos linfoides asociados a mucosas.<sup>3</sup> En humanos existen dos subclases de IgA: IgA1 e IgA2, en suero predomina la IgA1, constituyendo del 10 al 15% de las inmunoglobulinas totales (1.4–4 mg/mL), y allí aparecen como monómeros, pero en las secreciones seromucosas es muy abundante la IgA2, que es dimérica.<sup>4</sup> Ésta es la responsable de la respuesta inmunitaria humoral de las mucosas, por tanto constituye la primera línea de defensa específica para la mayoría de las infecciones.<sup>5</sup> La deficiencia de IgA tiene lugar en aproximadamente 1:1,000 de la población y está frecuentemente asociada con la deficiencia de inmunoglobulina G.<sup>6</sup>

La inmunoglobulina G (IgG) es la clase más abundante en suero (8-16 mg/mL), constituyendo el 80% de las inmunoglobulinas totales. Existen cuatro subclases en humanos (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) que se diferencian estructuralmente entre sí por el tamaño de la región bisagra y el número de puentes disulfuro entre las cadenas pesadas.<sup>4</sup> Es el anticuerpo más abundante durante la respuesta inmunitaria secundaria de tipo humoral.<sup>6</sup> Es la única clase de inmunoglobulina que puede atravesar la barrera placentaria y es la responsable, mediante esta inmunidad pasiva natural, de proteger a los recién nacidos durante los primeros meses de vida.<sup>3,5</sup> La IgG enlazada al antígeno también puede fijar el complemento.<sup>3</sup>

La inmunoglobulina M (IgM) supone del 5 al 10% de las inmunoglobulinas séricas (1.5 mg/mL en promedio), se secreta como pentámero que contiene la

cadena J.<sup>3,4</sup> Los anticuerpos de tipo IgM predominan en la respuesta inmunitaria temprana a la mayor parte de los antígenos aunque tiende a hacerse menos abundante subsecuentemente. La IgM se expresa en la superficie de las células B, en particular los linfocitos B vírgenes donde actúa como receptor específico para el antígeno y es la inmunoglobulina más eficiente para activar el complemento, ya que una molécula de IgM unida al antígeno es suficiente para iniciar la cascada del complemento.<sup>7,8</sup>

La determinación de estas inmunoglobulinas contribuye significativamente al diagnóstico de diversas enfermedades por inmunodeficiencias,<sup>9-11</sup> gammopatías monoclonales y enfermedades infecciosas crónicas y agudas entre otras.<sup>12,13</sup> Sus cifras séricas dependen de diversos factores del desarrollo, genéticos y ambientales. Éstos incluyen: características étnicas, edad, sexo, antecedentes de alergia, o infecciones recidivantes y factores geográficos.<sup>3</sup>

Los volúmenes de utilización de la cuantificación de inmunoglobulinas en suero en la práctica clínica, sólo son superados por las cuantificaciones de metabolitos de comprobada eficacia en la detección temprana de enfermedades de gran frecuencia, como la glicemia para la diabetes, la creatinina sérica para enfermedades renales o por la certificación de la sangre y hemoderivados como libres de agentes infecciosos (antígeno de la hepatitis B, virus de la hepatitis C y de la inmunodeficiencia humana, etc).

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado el objetivo del presente trabajo es la estandarización de un método para la cuantificación de inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM utilizando la tecnología SUMA (Sistema Ultramicroanalítico).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### • Materiales

Los sueros estándar y control empleados en la cuantificación de inmunoglobulinas se prepararon a partir de una mezcla de sueros humanos procedentes del área del Bioterio de la Agrupación de Producción de Reactivos del Centro de Inmunoensayo, libre de antígenos de superficie de la hepatitis B y de anticuerpos al virus de la inmunodeficiencia humana y al virus de la hepatitis C.

Se utilizaron ovejas de la raza Pelibuey Bermejo Oscuro procedente del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana, Cuba, para la obtención de los antisueros anti IgA, IgG e IgM.

Las muestras empleadas en los estudios de normalización y poblacional se obtuvieron de pacientes del Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas y del Banco de Sangre de Marianao, Ciudad de la Habana, Cuba.

Como material de referencia se utilizaron el estándar secundario de la Boehringer Mannheim (Precimat [Ch.-B./Lot.:174200], Alemania) y el estuche comercial Immunoglobulins IgG IgA IgM (Human, Alemania). El resto de los reactivos empleados fueron de calidad analítica.

Para la lectura e interpretación de los resultados se utilizó un lector SUMA 121 perteneciente a la Tecnología SUMA del Centro de Inmunoensayo (Cuba), compuesto por dos partes fundamentales: un espectrofotómetro-fluorímetro y el sistema de cómputo, asociadas entre sí permitiendo que los programas que posee la computadora controlen el fotómetro-fluorímetro.

El soporte de lectura es una multicubeta de borosilicato (BK-7) de 96 posiciones, constituida por una tapa inferior y una superior con un separador de 1.5 mm, construidos en el Centro de Inmunoensayo. La interpretación de los resultados se realizó por el Programa de Cuantificación de Inmunoglobulinas.

El procesamiento estadístico de los resultados se realizó con el programa Microsoft Excel 2000 (Microsoft, Co.).

## • Técnicas

### *Cuantificación de IgA, IgG e IgM*

La prueba inmunturbidimétrica, para la determinación cuantitativa de inmunoglobulinas A, G y M en suero humano, se basa en la reacción entre cada inmunoglobulina y su anticuerpo específico. Esta reacción produce un complejo antígeno anticuerpo insoluble que genera una turbidez medible por fotometría a 365 nm. La cantidad de inmunocomplejos formados es proporcional a la concentración de inmunoglobulina presente en la muestra.

El método de ensayo seleccionado para la cuantificación de IgA, IgG e IgM en suero humano fue un ensayo inmunturbidimétrico de punto final.

Para realizar el ensayo se añadió 50 µL de la solución amortiguadora (polietilenglicol 6000 al 2% [p/v] en solución salina fosfato [NaCl 0.14 mol/L, fosfato disódico 0.0081 mol/L a pH 7.4]), de las soluciones de la curva estándar, el suero de control y las muestras en la tapa inferior del soporte de lectura. Las muestras se diluyeron previamente a la misma dilución del

tercer calibrador de la curva estándar. Sobre la tapa superior se adicionaron 10 µL del antisuero. Se colocó esta tapa sobre la tapa inferior y se homogeneizó bien la mezcla. Se efectuó la lectura de absorbancia a los 10 minutos en el lector SUMA a una longitud de onda de 365 nm. Este procedimiento tuvo lugar a temperatura ambiente (20 - 25°C).

La interpretación de los resultados se realizó de forma automatizada por el Programa de Cuantificación de Inmunoglobulinas, que se basa en el cálculo de la concentración de la muestra interpolando la absorbancia de la misma en la curva estándar del ensayo.

En caso de que alguna de las muestras ensayadas no entrara dentro del rango de la curva de calibración se aumentó o disminuyó la dilución según fue necesario y se repitió el ensayo.

### *Obtención de los sueros estándar y control*

#### • Suero estándar

El suero humano normal (SHN) se congeló y descongeló tres veces y se centrifugó (Hitachi 20PR-52D) a 15,000 g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró primeramente a 4°C utilizando papel de filtrado rápido y, posteriormente, utilizando un sistema constituido por un prefiltro de fibra de vidrio de 500 µm y tres membranas de acetato de celulosa de 0.8 µm, 0.5 µm y 0.45 µm respectivamente, a una presión de 200 kPa. En iguales condiciones se centrifugó, y el sobrenadante se filtró con papel. El suero se congeló a - 20°C, se descongeló a 4°C y se le extrajo la fase superior transparente, correspondiente con un 33% del volumen total del suero. La fase restante se diluyó 1/3 con agua destilada y se le adicionó gota a gota una solución saturada de sulfato de amonio, con agitación constante a 22°C. Posteriormente se continuó agitando 20 minutos a 22°C y se dejó reposar una hora a la misma temperatura. El precipitado se recuperó por centrifugación (Hitachi CR 7 BA) a 3,550 g, durante 20 minutos a 22°C, luego se resuspendió con solución de sulfato de amonio semisaturada y se centrifugó nuevamente en iguales condiciones.

El sobrenadante se desechó y el precipitado se resuspendió en un volumen mínimo de solución salina fosfato, se depositó en una bolsa de diálisis (nivel de corte 10 a 12 kDa) y se dializó a 4°C durante 18 horas con solución salina fosfato y agitación magnética, se realizaron 3 cambios de solución de diálisis. El contenido de la bolsa se centrifugó a 3,550 g, durante 20 minutos a 22°C.

La concentración de proteínas totales se determinó por el método de Biuret.<sup>14</sup> Finalmente al suero procesado se le adicionó albúmina bovina, glicina y azida sódica para concentraciones finales de 6, 2.5 y 0.2% respectivamente.

#### • Suero de control

El SHN se procesó igual que para el estándar sólo que al extraérsele la fase superior transparente del suero, correspondiente al 33%, se le añadió igual volumen de etilenglicol. Posteriormente se le añadió azida sódica y glicina para concentraciones finales de 0.2 y 2.5% respectivamente.

#### *Obtención de los antisueros anti IgA, IgG, IgM*

Se inmunizaron ovejas (raza Pelibuey Bermejo Oscuro), obteniéndose el suero y procesándolos para obtener los antisueros (anti IgA, IgG e IgM) según Melchor.<sup>15</sup>

Los antisueros se envasaron en frascos de cristal a un volumen de 2 mL y se sometieron al proceso de liofilización.

#### *Preparación de la curva de calibración del estándar secundario*

Para determinar la concentración en mg/mL de cada inmunoglobulina en el estándar se utilizó el estándar secundario (Boehringer Mannheim, Precimat IgA, G, M [Ch.-B./Lot.:174200], Alemania) con las concentraciones de inmunoglobulinas: IgA 3.46 mg/mL, IgG 23.6 mg/mL, IgM 2.47 mg/mL. El estándar secundario se diluyó con solución amortiguadora de la siguiente forma para confeccionar la curva de calibración:

*IgA:* 1/200 (Punto 3), 1/400 (Punto 2) y 1/800 (Punto 1).

*IgG:* 1/1,800 (23.6 mg/mL, Punto 3), 1/3,600 (Punto 2) y 1/7,200 (Punto 1).

*IgM:* 1/50 (Punto 3), 1/100 (Punto 2) y 1/200 (Punto 1).

Se utilizó como blanco de cada curva la solución reguladora.

#### *Cuantificación de IgA, IgG e IgM en el estándar y suero de control*

Utilizando las curvas antes preparadas se cuantificaron las 3 inmunoglobulinas en el estándar que se diluyó de la siguiente forma: IgA: 1/400, IgG: 1/3,600, IgM: 1/100.

Con el programa Excel 2000 (Microsoft, Co.) se determinó la media aritmética ( $\bar{X}$ ), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV) para cada inmunoglobulina.

Una vez determinada la concentración de IgA, IgG e IgM en el estándar, éstas se utilizaron para construir una curva estándar y determinar la X del suero de control y su rango de aceptación con  $\pm 3$  DE y un 10% de CV. Esto se realizó a partir de los resultados de 100 determinaciones durante 10 días.

#### *Análisis de correlación*

Para comparar los estándares se ensayaron por ambas curvas (estándar propio y estándar secundario) 120 muestras provenientes del Banco de Sangre de Marianao, Cuba en 3 placas con 40 muestras cada una durante 3 días. La curva del estándar se preparó de igual forma que las antes descritas para estándar secundario. Se correlacionaron las concentraciones en mg/mL de las muestras según Westgard, 1999<sup>16</sup> y Zady.<sup>17</sup> Para la realización del análisis de correlación y los parámetros estadísticos correspondientes (coeficiente de correlación, pendiente, intercepto y ángulo) se utilizó el programa Excel 2000 (Microsoft, Co.).

#### *Precisión*

#### • Variación intra e inter-ensayo

Las concentraciones de IgA, IgG e IgM se determinaron durante 10 días a tres muestras de suero humano con concentraciones conocidas de las inmunoglobulinas en los siguientes rangos de valores: bajo, medio y alto. Posteriormente se determinó la X, DE y CV intra e inter-ensayo por medio del programa Excel 2000 (Microsoft, Co.).

#### *Exactitud*

#### • Recuperación

La prueba de recuperación se realizó analizando 7 muestras de suero humano para IgA, IgG e IgM: 3 con concentraciones altas, una con concentración baja y 3 preparadas mezclando en igual proporción cada una de las muestras altas con la baja.

Se calcularon los porcentajes de recuperación para cada una de las mezclas según la fórmula:

$$\% R = (VP/VM) * 100\%$$

Donde: % R: Porcentaje de recuperación.

VP: Valor promedio entre la muestra baja y la muestra alta (Valor esperado).

VM: Valor de la mezcla (Valor observado).

Los valores de concentración en mg/mL de las muestras altas utilizadas son: para IgA 3.92; 4.04 y 4.95; para IgG: 19.00; 22.61 y 23.20; para IgM: 6.90; 8.20 y 10.90. Los valores de concentración de las muestras bajas son: para IgA 1.23; para IgG 6.72 y para IgM 0.99.

### *Paralelismo*

Para esta prueba se seleccionaron tres muestras de suero humano para cada inmunoglobulina con las siguientes concentraciones: IgA 2.49, 4.60 y 5.05 mg/mL; IgG 18.93, 23.22 y 18.43 mg/mL e IgM 4.95, 8.20 y 6.90 mg/mL.

A las muestras se les realizaron las diluciones siguientes:

Para IgA la muestra 1 1/400, 1/300, 1/250; la muestra 2 1/400, 1/300, 1/250 y la muestra 3 1/400, 1/300, 1/250.

Para IgG la muestra 1 1/3,600, 1/2,700, 1/1,900; la muestra 2 1/3,600, 1/2,700, 1/2,000 y la muestra 3 1/3,600, 1/2,500, 1/1,800.

Para IgM la muestra 1 1/200, 1/150, 1/100; la muestra 2 1/400, 1/300, 1/200 y la muestra 3 1/400, 1/300, 1/200.

### *Estabilidad*

#### • Antisueros

Los antisueros (anti IgA, anti IgG y anti IgM) se reconstituyeron y almacenaron entre 2 y 8°C para analizar su comportamiento durante 98 días después de haberse reconstituido. Los mismos se ensayaron en la curva del estándar y se analizaron los valores de absorbancia de cada punto de la curva obtenidos comparándolos con los valores obtenidos el día de la reconstitución de cada antisuero (control).

#### • Estándar

La estabilidad del estándar almacenado entre 2 y 8°C se evaluó a los 12 y 24 meses de producido, cuantificando cada inmunoglobulina frente al estándar secundario.

#### • Suero de control

La estabilidad del suero de control almacenado a 4°C se evaluó a los 12 meses después de su produc-

ción, cuantificando cada inmunoglobulina frente al estándar.

### *Comparación con el estuche comercial Immunoglobulins IgG, IgA, IgM (Human, Alemania)*

Una vez determinada la concentración de cada inmunoglobulina en el estándar del ensayo empleando el estándar secundario (Boehringer Mannheim, Alemania), realizada la correlación entre ambos y los estudios de precisión, exactitud y estabilidad; se llevó a cabo la comparación con un estuche de referencia (Immunoglobulins IgG, IgA, IgM; Human, Alemania),<sup>18</sup> que se basa en la cuantificación de estas inmunoglobulinas por un método inmunturbidimétrico. Para ello se tomaron 200 muestras provenientes de pacientes del Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas a las que previamente se les cuantificó la IgA, IgG e IgM en el Laboratorio de Inmunología de esta institución por el estuche de referencia. Una vez en nuestro centro se les realizó la misma cuantificación pero empleando el método elaborado por nosotros. Se ensayaron 2 placas con 20 muestras cada una durante 5 días. La curva del estándar se preparó de igual forma que la antes descrita para el estándar secundario. Se correlacionaron las concentraciones en mg/mL de las muestras según Westgard, 1999<sup>16</sup> y Zady, 2000.<sup>17</sup> Para el análisis de correlación y la determinación de los parámetros estadísticos correspondientes (coeficiente de correlación, pendiente, intercepto y ángulo) se utilizó el programa Microsoft Excel 2000 (Microsoft, Co.).

### *Estudio poblacional*

La cuantificación de IgA, IgG e IgM se realizó en 200 muestras de adultos clínicamente sanos procedentes del Banco de Sangre de Marianao, Ciudad de la Habana, Cuba. Empleando el programa Excel 2000 (Microsoft, Co.), se determinó la  $X \pm DE$ .

### *Control de calidad*

Las curvas de calibración obtenidas en los ensayos deben cumplir los siguientes parámetros:

1. Blanco (B) < 0.02 unidades de absorbancia (UA).
2. Incremento de absorbancia del punto 1 de la curva respecto al B > 0.01 UA.
3. Relación de incremento entre los puntos de la curva > 0.02 UA.
4. Exactitud relativa del suero de control < 20%.

5. Homogeneidad del suero de control con un CV < 10%.

## RESULTADOS

Determinación de la concentración de IgA, IgG e IgM en el estándar.

Las concentraciones para cada inmunoglobulina en el estándar fueron: IgA: 4.75 mg/mL, IgG: 21.5 mg/mL e IgM: 2.61 mg/mL

### Análisis de correlación

La comparación entre el estándar propio y el estándar secundario para IgA mostró un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0.96, un intercepto de 0.33, una pendiente de 0.92 y un ángulo de  $43^\circ$ . Para IgG,  $r = 0.98$ , intercepto de 0.37, pendiente de 1.05 y ángulo de  $46^\circ$ . Y para IgM,  $r = 0.98$ , intercepto de 0.13, pendiente de 0.95 y ángulo de  $43^\circ$ .

La curva de calibración obtenida para el estándar y el estándar secundario se muestra en la figura 1.

### Resultados del suero de control

El valor de la media y los límites de aceptación para cada inmunoglobulina fueron: IgA 2.05 (1.43-2.66) mg/mL, IgG 10.83 (7.58-14.08) mg/mL e IgM 1.25 (0.87-1.62) mg/mL.

### Precisión

Los valores de los CV en el caso de IgM estuvieron entre 4 y 9%, para IgG entre 2 y 4% y para IgA entre 3 y 9%. Los resultados se muestran en el cuadro I.

### Exactitud

#### • Recuperación

En el cuadro II se muestran los porcentajes de recuperación para las mezclas, que oscilan entre 96 y 112%.

### Paralelismo

Los resultados muestran un paralelismo adecuado para las 3 muestras estudiadas de cada inmunoglobulina considerando el factor de dilución de cada muestra (Figura 2).

### Estabilidad

El comportamiento de estos antisueros con relación al blanco y a cada uno de los puntos de la curva se muestra en la figura 3. Para las tres inmunoglobulinas el estándar mantuvo las concentraciones iniciales a los 12 y 24 meses de producido. Así mismo, el suero de control fue estable hasta 12 meses (Cuadro III).

### Comparación con el estuche comercial Immunoglobulins IgG, IgA, IgM de referencia

Los resultados de la comparación entre el estuche comercial y el ensayo diseñado por nosotros mostró para la IgA una  $r = 0.98$ , intercepto de -1.29, pendiente de 0.99 y ángulo de  $45^\circ$ . Para IgG,  $r = 0.97$ , intercepto de -10.61, pendiente de 1.08 y ángulo de  $47^\circ$ . Y para IgM,  $r = 0.98$ , intercepto de 0.161, pendiente de 0.91 y ángulo de  $42^\circ$ .

### Estudio poblacional

En el estudio poblacional se obtuvieron los siguientes resultados para cada inmunoglobulina: IgA  $2.2 \pm 1.4$  mg/mL, IgG  $12.75 \pm 3.18$  mg/mL y para IgM  $1.91 \pm 0.84$  mg/mL.

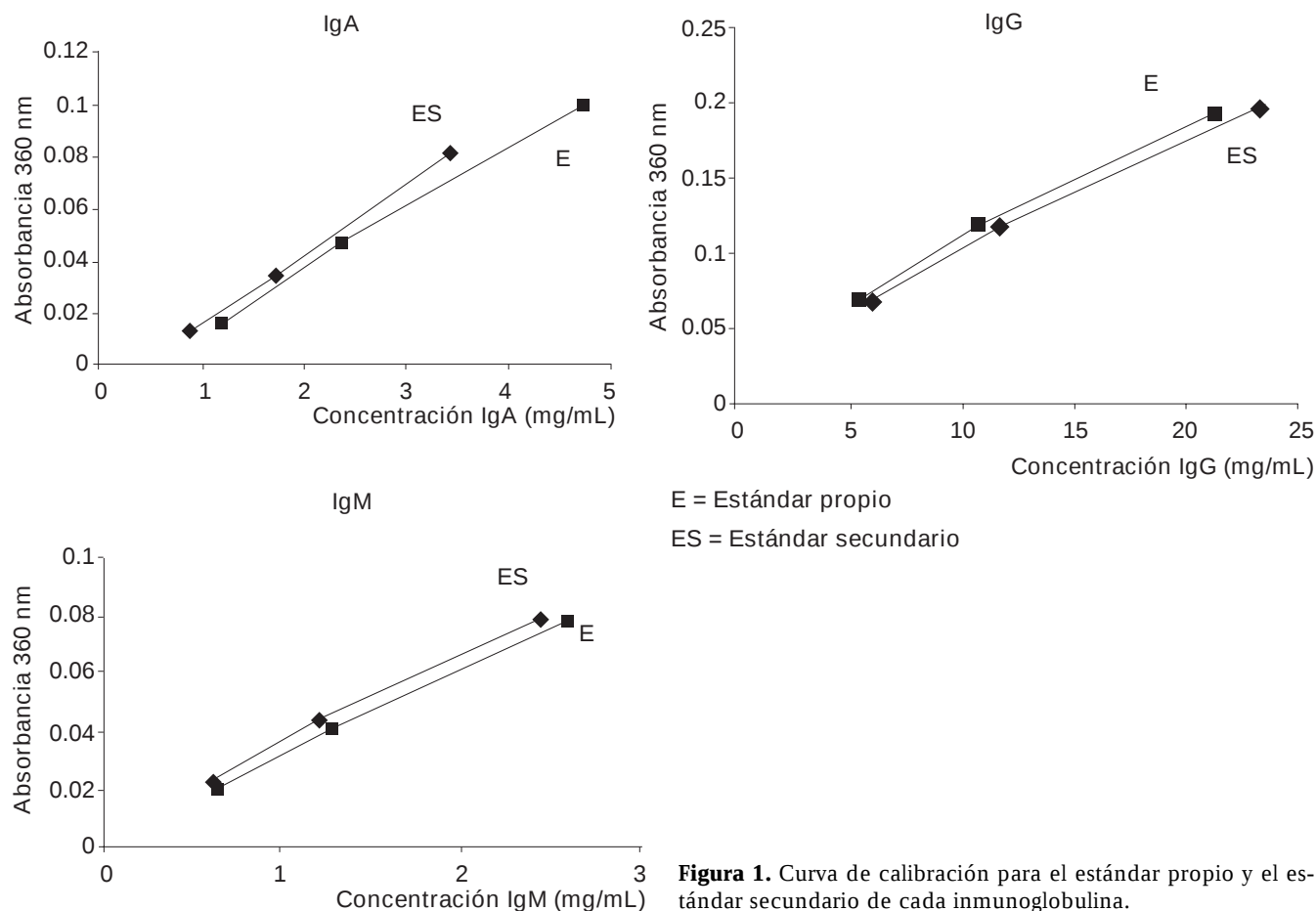
## DISCUSIÓN

Las concentraciones obtenidas para cada inmunoglobulina en el estándar resultaron semejantes a las que presenta el estándar secundario (Boehringer Mannheim, Alemania), lo que nos permite indicar que este nuevo estándar preparado puede ser utilizado para la cuantificación de IgA, IgG e IgM en muestras de suero humano en el laboratorio clínico.

Los coeficientes de correlación para las tres inmunoglobulinas se encuentran entre 0.90-1.00, que son los límites entre los cuales estos coeficientes demuestran una muy alta correlación. Este coeficiente representa la fortaleza de la asociación entre las dos variables comparadas, en este caso ambos estándares.<sup>16,17</sup>

El rango del suero de control se ubicó alrededor del segundo calibrador de la curva para las tres inmunoglobulinas. Estos rangos permiten controlar la calidad de la preparación de cada curva estándar, ya que los ensayos sólo deben ser aceptados cuando el suero de control muestre valores de concentración dentro de éste.

En los estudios de precisión los valores para los CV intra e inter-ensayo en todos los casos fueron in-



**Figura 1.** Curva de calibración para el estándar propio y el estándar secundario de cada inmunoglobulina.

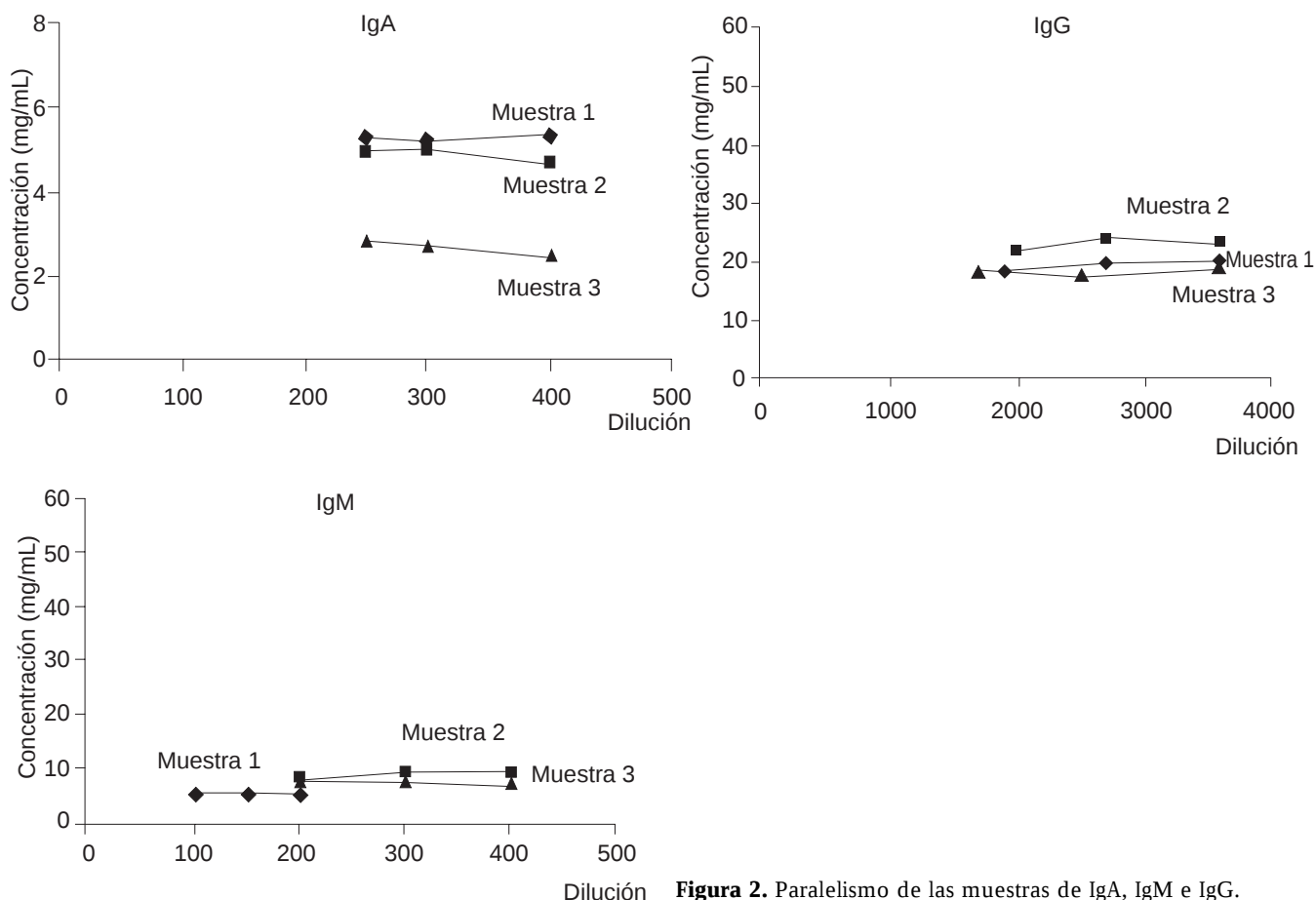
**Cuadro I. Precisión intra e inter-ensayo para cada inmunoglobulina.**

| $\bar{X}$ (mg/mL) | Intra-Ensayo<br>(n = 10) |        | Inter-Ensayo<br>(n = 30) |        |
|-------------------|--------------------------|--------|--------------------------|--------|
|                   | DE                       | CV (%) | DE                       | CV (%) |
| <b>IgA</b>        |                          |        |                          |        |
| 1.19              | 0.04                     | 3.42   | 0.11                     | 9.49   |
| 2.48              | 0.24                     | 9.49   | 0.12                     | 4.84   |
| 4.85              | 0.23                     | 4.68   | 0.39                     | 7.99   |
| <b>IgG</b>        |                          |        |                          |        |
| 7.44              | 0.23                     | 3.05   | 0.29                     | 4.01   |
| 10.09             | 0.28                     | 2.78   | 0.44                     | 4.37   |
| 19.64             | 0.37                     | 1.89   | 0.45                     | 2.29   |
| <b>IgM</b>        |                          |        |                          |        |
| 1.17              | 0.06                     | 5.49   | 0.12                     | 9.99   |
| 1.72              | 0.09                     | 5.03   | 0.09                     | 5.18   |
| 4.85              | 0.22                     | 4.55   | 0.00                     | 0.00   |

**Cuadro II. Recuperación de cada una de las inmunoglobulinas.**

| Mezclas      | Valor esperado<br>(mg/mL) | Valor observado<br>(mg/mL) | % de<br>recuperación |
|--------------|---------------------------|----------------------------|----------------------|
| Mezcla IgA 1 | 3.09                      | 3.25                       | 107                  |
| Mezcla IgA 2 | 2.57                      | 2.63                       | 103                  |
| Mezcla IgA 3 | 2.63                      | 2.67                       | 101                  |
| Mezcla IgG 1 | 16.16                     | 16.30                      | 98                   |
| Mezcla IgG 2 | 16.46                     | 16.56                      | 96                   |
| Mezcla IgG 3 | 14.36                     | 14.30                      | 100                  |
| Mezcla IgM 1 | 1.71                      | 1.90                       | 112                  |
| Mezcla IgM 2 | 1.98                      | 2.03                       | 99                   |
| Mezcla IgM 3 | 1.58                      | 1.60                       | 100                  |

feriores al 10% y, puesto que el coeficiente de variación máximo permitido es del 15%,<sup>19</sup> demostramos que la precisión obtenida del ensayo es la adecuada. La compañía Wiener Laboratorios (Argentina) reporta valores de reproductibilidad de las muestras



**Figura 2.** Paralelismo de las muestras de IgA, IgM e IgG.

( $n = 20$ ) que se encuentran entre 2 y 5% para IgM; 2 y 5% para IgG y para IgA entre 2 y 4%;<sup>20</sup> estos valores presentan similitud con los obtenidos con nuestro método turbidimétrico. Así mismo, Paradora y cols. en 1997, en un estudio realizado para adaptar el espectrofotómetro Shimadzu 160-A con el objetivo de cuantificar inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) por el método turbidimétrico, reportaron valores de coeficientes de variación de 7.27% para IgA, de 3.15% para IgG y de 9.85% para IgM, lo cual concuerda con los alcanzados en este estudio de precisión.<sup>21</sup>

Los porcentajes de recuperación para las mezclas oscilan entre 96 y 112% por lo que muestran una buena recuperación, la cual debe encontrarse entre 80 y 120%.<sup>22,23</sup>

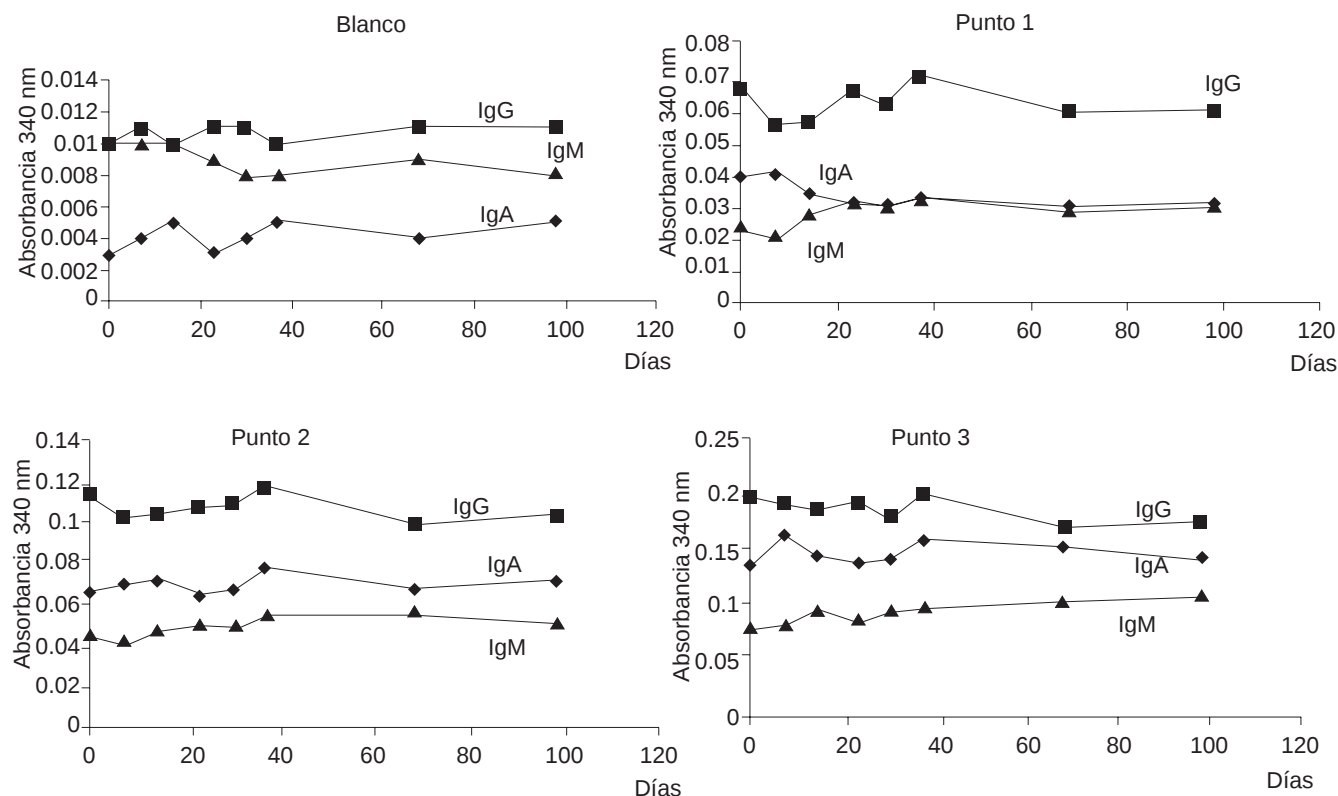
Por tanto podemos afirmar que existe un alto grado de identidad entre los valores analíticos obtenidos por el ensayo y el contenido real del parámetro.

Los resultados de paralelismo observados para las 3 muestras estudiadas de las inmunoglobulinas empleando el estándar del ensayo permiten plantear que las curvas elaboradas son paralelas entre sí y que

las concentraciones calculadas, después de la corrección con el factor de dilución correspondiente a cada inmunoglobulina, fue semejante para cada una y con valores de  $\pm 10\%$  de la concentración original de la muestra pura.

En cuanto a la estabilidad de los antisueros, los resultados fueron satisfactorios en el transcurso de los 98 días después de reconstituidos, pues se mantuvo el nivel de absorbancia del blanco por debajo de 0.02 y el incremento de absorbancia adecuado entre los puntos de la curva estándar, además, no se observó precipitado en los frascos de antisueros reconstituidos; lo cual muestra que son estables durante el tiempo estudiado. Por su parte, el estándar mantuvo sus características iniciales durante los 24 meses después de producido y almacenado entre 2 y 8°C. En el caso del suero de control, mantuvo las concentraciones iniciales a los 12 meses de producido, por tanto ambos pueden ser utilizados durante 24 y 12 meses respectivamente con fines analíticos en el laboratorio.

Los resultados de la comparación entre el estuche comercial empleado como referencia y el nuestro



**Figura 3.** Resultados de la estabilidad de los antisueros para IgG, IgM e IgA con relación al blanco y a los puntos 1, 2 y 3 de la curva estándar.

**Cuadro III. Estabilidad de las inmunoglobulinas en el estándar propio y el suero de control.**

| Meses            | $\bar{X} \pm DE$ (mg/mL) |                  |                 | CV (%) |      |      |
|------------------|--------------------------|------------------|-----------------|--------|------|------|
|                  | IgA                      | IgG              | IgM             | IgA    | IgG  | IgM  |
| Estándar         |                          |                  |                 |        |      |      |
| 0                | 4.75 $\pm$ 0.45          | 21.53 $\pm$ 0.82 | 2.26 $\pm$ 0.22 | 9.50   | 3.80 | 9.70 |
| 12               | 4.79 $\pm$ 0.40          | 21.72 $\pm$ 0.79 | 2.31 $\pm$ 0.19 | 8.35   | 3.64 | 8.22 |
| 24               | 4.88 $\pm$ 0.33          | 21.66 $\pm$ 0.81 | 2.44 $\pm$ 0.16 | 6.76   | 3.74 | 6.56 |
| Suero de control |                          |                  |                 |        |      |      |
| 0                | 2.05 $\pm$ 0.18          | 10.83 $\pm$ 0.83 | 1.25 $\pm$ 0.11 | 0.78   | 7.70 | 9.04 |
| 12               | 2.16 $\pm$ 0.18          | 11.02 $\pm$ 0.26 | 1.31 $\pm$ 0.11 | 8.19   | 2.40 | 8.43 |

para las tres inmunoglobulinas mostraron coeficientes cercanos a 1 y ángulos cercanos a 45°, teniendo una correlación muy alta y, por tanto, una relación lineal entre los dos estándares estudiados.<sup>16,17</sup>

El estudio poblacional mostró valores promedios determinados entre la DE que se consideran los valo-

res normales de inmunoglobulinas A, G y M en Ciudad de la Habana. Estos valores se asemejan a los reportados por los laboratorios Spinreact donde los valores normales se encuentran entre 8 y 18 mg/mL para IgG; entre 0.7 y 2.8 mg/mL para IgM y entre 0.9 y 4.5 mg/mL para IgA.<sup>24</sup>

Por lo anterior se concluye que la correlación entre ambos estándares fue buena, y la precisión y el paralelismo obtenidos para el ensayo resultaron correctos; las muestras ensayadas mostraron una buena recuperación y los antisueros, el estándar y el suero de control resultaron estables durante el tiempo analizado.

Los métodos clásicos para la cuantificación de antígenos o anticuerpos, tales como: inmunoprecipitación en gel (inmunodifusión radial), ensayos de aglutinación, entre otros, se basan en la observación de las etapas finales de la reacción antígeno-anticuerpo para obtener un producto final medible o cuantificable y estas etapas tardan horas y hasta días en desarrollarse para lograr un producto final estable,<sup>25</sup> a diferencia de esto, en el inmunoensayo turbidimétrico presentado en este trabajo las mediciones se realizan

en la etapa primaria de la reacción, la cual ocurre de segundos a minutos y puede ser medida mediante el incremento de la luz incidente a un ángulo de 180° con respecto a esta luz. Esta ventaja, unida a que se utiliza un espectrofotómetro-fluorímetro de la tecnología SUMA, permiten realizar las mediciones con mayor exactitud, confiabilidad y a menor costo.

#### REFERENCIAS

1. Delves J, Roitt IM. The immune system (first of two parts). *N Engl J Med* 2000; 343: 37-49.
2. Antibody Structure and Classification. [en línea] 2002 [fecha de acceso 27 de mayo del 2003]; URL disponible en: <http://www.probes.com/handbook/boxes/0439.html>.
3. Tristram G, Parslow MD. Inmunoglobulinas y sus genes. En: Stites DP, Terr A, Parslow TG. *Inmunología Básica y Clínica*. 9a ed. México: El Manual Moderno; 1998. p. 787-818.
4. Lañez E. Programa de inmunología. Moléculas y células que interaccionan con el antígeno. Inmunoglobulinas y otras moléculas de células B. [en línea] 1999 [fecha de acceso 21 de Mayo del 2003]. URL disponible en: <http://www.ugr.es/~eia-nez/inmuno/Programa97.htm>.
5. Goodman J, Parslow T, Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Immunoglobulin proteins. In: Basic and clinical immunology. 8th ed. Stamford: Appleton & Lange; 1994. p. 66-79.
6. Bradwell AR. *IgG and IgA subclasses in disease*. Birmingham: The Binding Site. 1995.
7. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Anticuerpos y Antígeno. En: *Inmunología Celular y Molecular*. 3ª ed. Editorial. Interamericana de España: S.A.U. Mc Graw-Hill; 1999. p. 39-70.
8. Walport MJ. Advances in immunology. Complement (Second of two parts). *N Engl J Med* 2001; 344: 1140-1144.
9. Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A. 6. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. *Clin Immunol* 1999; 93: 190-197.
10. Fontan G, García M, Pascual D, López T, Álvarez D, Ferreira A. New indications for gammaglobulins. *Ann Esp Pediatr* 1992; 36: 135-138.
11. Fleisher TA, Ballow M. Primary Immune Deficiencies: Presentation, Diagnosis, and Management. *Pediatric Clin North Am* W.B. Saunders Company 2000; 57: 100-103.
12. Méndez E, Osuna C, Sánchez A, Revilla Y, Soriano F, Montalbán C, et al. The structure of two IgMs showing different activity from a patient with Waldenstrom's macroglobulinemia. *J Clin Exp Immunol* 1992; 87: 472-477.
13. Alonso-Villaverde C, Castillejo G, González J, Olive JM. Idiopathic polyneuritis and IgA monoclonal gammopathy [Letter]. *Rev Clin Esp* 1993; 192: 54-55.
14. Dunn M. Determination of total protein concentration. In: Harris EL. *Protein purification methods. A practical approach*. (Eds). Oxford: IRL Press Oxford University; 1989. p. 10-19.
15. Melchor A. Obtención de antisueros ovinos monoespecíficos para IgG, IgA e IgM humanas. *Tesis de Maestría*. Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba. 1997.
16. Westgard JO. *Basic Method Validation*. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 1999.
17. Zady M. *Correlation and simple least squares regression*. Clinical laboratory science program. Louisville, Kentucky: University of Louisville. 2000.
18. Laboratorios Human S.A., Alemania. *Método turbidimétrico para la cuantificación de inmunoglobulinas*, 1994.
19. Cuantificación de proteínas en líquidos biológicos. [en línea] 2000 [fecha de acceso 10 de Febrero del 2003]; URL disponible en: [www.ispch.cl/labsal/imn](http://www.ispch.cl/labsal/imn).
20. Wiener Laboratorios S.A.I.C. Línea Turbitest AA. *Método inmunoturbidimétrico para la determinación cuantitativa de inmunoglobulina G, A, M*. 2000.
21. Paradora ML, Montoto AN, Marrero RM. Cuantificación de inmunoglobulinas mediante el espectrofotómetro Shimadzu 160-A. *Rev Cubana Pediatr* 1997; 69: 124-128.
22. Broughton PMG, Bergonzi C, Lindstedt G, Loeber JG, Malan PG, Mathieu M, et al. ECCLS. Guidelines for a user laboratory to evaluate and select a kit for its own use. *Cuantitativa Test* 1986.
23. Chaloner-Larsson G, Anderson R, Egan A. *A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements*. Part 2. Validation. WHO 1997: 65-95.
24. Laboratorios Spinreact S.A. *Método turbidimétrico para la cuantificación de inmunoglobulinas*, 1994.
25. Margni RA. *Inmunología e Inmunoquímica*. 5ª ed. Buenos Aires: Panamericana; 1996.

