

SESION DE POSTERS III

Inmunopatología

POSTER N° 42

DOSIFICACION DE BETA-1-GLICOPROTEINA POR RADIOINMUNOENSAYO Y ENZIMAINMUNOENSAYO.

C.V. Jiménez, I. Ferrer, E. Calvet, F. Ramón

Servicio de Bioquímica. Hospital Infantil San Juan de Dios. Carretera de Esplugas, s/n. Barcelona(34).

La Beta-1-Glicoproteína (SP-1) se forma en los sincitiotrofoblastos de la placenta humana, detectándose precozmente en sangre materna y alcanzando niveles dosificables a los siete días de la fecundación. Su principal utilidad al inicio del embarazo radica en la predicción de amenaza de aborto, siendo a su vez una prueba fiable en el establecimiento del diagnóstico diferencial del embarazo ectópico con respecto al de quiste de ovario.

Su dosificación es también de utilidad para valorar la evolución de los tumores trofoblásticos tras terapia citostática. En la última fase del embarazo, los niveles de SP-1 bajos son indicativos de toxemia gravídica y retraso de crecimiento intrauterino.

Se presenta el estudio comparativo de dos técnicas para la determinación sérica de SP-1: radioinmunoensayo y enzaimmunoensayo en fase heterogénea (ELISA).

Se compara la sensibilidad, la imprecisión intra e inter-series a distintos niveles, la especificidad y la recuperación en ambas técnicas. Asimismo se hace una correlación con los valores obtenidos por ambos métodos en distintos estadios del embarazo.

POSTER N° 43

ESTUDIO DE DOS METODOS DE CUANTIFICACION DE INMUNOGLOBULINAS (INMUNODIFUSION RADIAL E INMUNOFLUOR) EN SUEROS NORMALES Y EN SUEROS DE ENFERMOS CON MIELOMA.

A. Mingo, V. Ramos, J. Jiménez, F. Lopez Hombrados, E. Fernandez.

Servicio de Bioquímica. Residencia Sanitaria "Virgen de la Salud". TOLEDO/R.S. "Virgen de la Salud". Avda. Barber s/n. TOLEDO.

En 50 sueros normales se realizó la cuantificación de inmunoglobulinas según el método tradicional de inmunodifusión radial (placas y controles de los laboratorios Boehringer) y por un método fluorescente (inmunofluor del laboratorio Bio-Rad) que determina las inmunoglobulinas mediante una reacción antígeno anticuerpo y ligando al complejo una antirrinoglobulina fluorescente.

La correlación entre ambos métodos fue satisfactoria y la T de Student no dió diferencias significativas.

En sueros de mielomas, Waldenström, etc. al valorar las inmunoglobulinas por inmunodifusión radial encontramos valores altos que no concordaban ni con las proteínas totales ni con el proteinograma. Estudiamos en 20 sueros de estos enfermos las inmunoglobulinas por los dos métodos antes citados, comprobando que la T de Student da ba diferencias significativas.

Los valores obtenidos por el método de inmunofluor daban significativamente más bajos y concordaban mejor con las gammaglobulinas del proteinograma.

Pensamos que la inmunofluorescencia puede ser un método de elección en la determinación de inmunoglobulinas de sueros de estos pacientes.

DETECCION DE UNA PROTEINA ANORMAL CON CAPACIDAD DE UNION ESPECIFICA DE T₃ EN EL SUERO DE UN PACIENTE CON HEPATOCARCINOMA.

J.A. Gómez, J. Ordóñez y J. Rodríguez.
Servicio de Bioquímica. Hospital de la Santa Cruz y San Pablo. Avda. San Antonio nº Claref, 167. Barcelona-25.

La presencia de autoanticuerpos antihormonas tiroideas en el suero de pacientes con enfermedades tiroideas es bien conocida desde que Robbins et al. en 1956, la describieron en un enfermo con carcinoma papilar de tiroides. Desde entonces, la mayoría de observaciones al respecto se refieren a pacientes con enfermedades autoinmunes del tiroides. Como aportación a las descripciones de este fenómeno, se presenta el caso de un paciente con un hepatocarcinoma, sin signos histológicos de enfermedad autoinmune del tiroides, en cuyo suero se demostró la presencia de una proteína que unía específicamente la T₃.

La presencia de dicha anomalía se demostró empleando los siguientes procedimientos: 1) RIAs de T₃ mediante técnicas de doble anticuerpo (T₃=11,1 nmol/l), de un solo anticuerpo y precipitación con PEG (T₃=<0,31 nmol/l) y de doble anticuerpo previa extracción con etanol (T₃=1,2 nmol/l); 2) precipitación del suero con T₃-¹²⁵I y precipitación con PEG (% de unión= 78,4), y 3) electroforesis en agarosa del suero previamente incubado con T₃-¹²⁵I (60% de radioactividad en la fracción de gammaglobulinas, en presencia y ausencia de ANS). Mediante el análisis del % de unión de T₃-¹²⁵I añadida al suero tras la precipitación con diferentes antiinmoglobulinas antihumanas y cromatografía en GAE Sephadex A50, se observó que la proteína responsable de la unión anormal de T₃ sólo poseía parcialmente propiedades inmunológicas. El análisis de Scatchard mostró una afinidad de dicha proteína por la T₃ de 0,77 · 10⁹ l/mol y una capacidad de unión de 1,02 nmol/l.

La muerte del paciente no permitió continuar el estudio de las características de la proteína responsable de la unión de T₃ al suero.

ESTUDIO COMPARATIVO E INCIDENCIA DE DISGLOBULINEMIAS MONOCLONALES EN AUSENCIA DE ENFERMEDAD MALIGNA PRIMITIVA DE LINFOCITOS B.

J.J.Zaragoza, A.Mª Jardi, J.I.Buj, M.M.Pérez, J.L.Cid
Servicio de Análisis Clínicos.- Residencia Sanitaria "Virgen de la Cinta", Carretera Sispática s/n.-TORTOSA-

Las proteínas monoclonales que se descubren en el exámen del proteinograma solicitado a pacientes sin linfopatías B, se agrupan en sus diferentes diagnósticos clínicos. Se estudia la naturaleza e identidad de la paraproteína descubierta, la posible excreción renal de proteínas de Bence-Jones y se sigue al enfermo en su proceso clínico para ver si se confirma su diagnóstico presuntivo.

El objeto de este estudio es el de esclarecer la existencia de una relación significativa entre la aparición de bandas monoclonales y los diferentes grupos de diagnóstico clínico no propiamente hematológico.

El estudio del suero y la orina se realiza por electroforesis inmunolectroforesis e inmunodifusión radial con el uso de antisueros específicos que conducen a la identificación de tipo, clase, cadenas ligera y pesada de la paraproteína.

Los resultados obtenidos nos indican la existencia de un aumento de la proporción de paraproteínas en enfermedades que, hasta ahora, no estaban descritas con esta anomalía.

Concluimos que entre la muestra estudiada de la población autóctona del área sanitaria de esta Residencia, existe un aumento en la frecuencia de disglobulinemias monoclonales en enfermedades no hematológicas.

CONTENIDO DE IgE EN INMUNOGLOBULINAS INYECTABLES

A.Hernández García, C.Gas Carpio.
Dpto.de Bioquímica, Fundación Farmacéutica Avenzoar, C/Alfonso XII, nº51. Sevilla. (España).

Los requisitos de composición y pureza exigidos en las farmacopeas a las gammaglobulinas inyectables son, desde el punto de vista inmunológico muy superficiales, lo cual lleva al desconocimiento de su composición real y por tanto a su utilización errónea; así, puede darse la paradoja de pretender combatir una disgamaglobulinemia con déficit de IgM con un fármaco cuya composición mayoritaria es de IgG, o infecciones respiratorias de repetición con un fármaco de escaso o nulo contenido en IgA.

Se sabe que las reacciones anafilácticas en el hombre son mediadas por anticuerpos IgE y pueden tener lugar no sólo en individuos inmunizados activamente sino también en aquellos sensibilizados pasivamente con antisuero que contenga IgE; por otra parte, el suero de una persona con "atopia", incluso después de diluido, puede sensibilizar a la piel de una persona sana.

Estos datos y el hecho de que se hayan descrito reacciones adversas de tipo inmunológico (alergia, isoimmunización) nos han inducido a averiguar la composición real de dichos preparados farmacéuticos. (1)

Actualmente aportamos un nuevo dato a este estudio con la cuantificación del contenido de IgE en 30 gammaglobulinas inyectables específicas e inespecíficas comercializadas en nuestro país.

Dicha cuantificación se ha llevado a cabo por un método inmunoenzimático de fase sólida. Previamente al análisis de las muestras se ha evaluado la precisión, exactitud, linealidad y recuperación de la técnica.

Los resultados obtenidos indican un contenido de IgE, en los mencionados medicamentos, en algunos casos altamente significativo.

(1) "Fraccionamiento analítico de Inmunoglobulinas inyectables por inmunonefelometría LASER" C.Gas, M.E.Cabeza, C.Ariaza y J.Herrera. Comunicación 515. II Congreso de la FESBE.

* CAPACIDAD HISTAMINOLIBERADORA DE TRES EXTRACTOS ANTIGENICOS DE DOS PROCEDENCIAS COMERCIALES SOBRE UNA CASUÍSTICA DE 237

ENFERMOS * F. L. Elorza., N. Rubio, F. Malagon, M. Lizaso.
Dpto. de BIOQUIMICA CLINICA, Hospital Universitario. Sevilla.

Exponemos en el presente trabajo la capacidad histaminoliberadora "in vitro" de tres diferentes extractos antigénicos (polvo doméstico, D. Pteronyssinus y U. Farinae) de dos procedencias comerciales distintas A y B.

Como muestra se ha utilizado sangre total perteneciente a 237 enfermos afectados de rinitis y/o asma de los cuales a 86 se les testó polvo, 80 pteronyssinus y a 71 farinae. Como criterio de inclusión de enfermos se consideró tener positivos los test cutáneos con los mismos extractos utilizados "in vitro", así como una historia clínica sugestiva.

El test de liberación de histamina se realizó mediante un sistema automatizado de flujo continuo utilizando cuatro concentraciones distintas de antígeno, se han considerado positivas aquellas liberaciones específicas superiores al 10% respecto a la histaminemia total. A todos los enfermos se les realizó IgE total utilizando el kit Enzygnost-IgE.

Los resultados obtenidos para la triada de antígenos mencionada, correlacionando p. cutánea positiva/ liberación de histamina positiva, dan 97, 100 y 90% respectivamente para la procedencia comercial A y de 70, 37 y 71% para la procedencia comercial B.

Se evidencia de una forma objetiva la necesidad de estandarizar los extractos antigénicos tanto para su uso diagnóstico (in vivo e in vitro) como para su utilización en inmunoterapia hiposensibilizante.

DETECCION DE IgE ESPECIFICA PARA DERMATOPHAGOIDES PTERONYSSINUS POR ENZIMOINMUNOENSAYO REVERSO
I.Moneo;M.Cuevas;V.Ureña;A.Bootello.
Servicio de Inmunología, Centro Ramón y Cajal, Utra. de Colmenar Km. 9,1 Madrid.

Sueros de pacientes con supuesta sensibilización a Dermatophagoides Pteronyssinus han sido estudiados por el método de Rast (radioalergosorbent test) y por un método de enzimoimmunoensayo reverso (REIA). De los 133 sueros estudiados el Rast fue positivo en 48 casos y el REIA en 59.72 sueros fueron negativos en ambas técnicas.

El método descrito utiliza microplacas recubiertas de antisuero anti IgE mono específico y antígeno conjugado con peroxidasa.

La técnica es altamente específica para el antígeno así como para IgE, de fácil realización y no precisa reactivos isotópicos.

Su sensibilidad está limitada en parte por la cantidad de IgE que un pocillo de microplaca es capaz de captar (unos 100 ng). Sin embargo pensamos que constituye una alternativa eficaz para el diagnóstico "in vitro" de los pacientes alérgicos.

CUANTIFICACION DE IgE A BAJOS NIVELES POR ENZIMOINMUNOENSAYO.
V.Ureña, M.Cuevas, I.Moneo, A.Bootello.
Servicio de Inmunología; Centro Ramón y Cajal; Crta. de Colmenar km. 9,1; Madrid.

Se ha desarrollado una técnica de ELISA a doble paso para la detección y cuantificación de inmunoglobulina E a bajos niveles. Para ello se construyó una curva standard con distintas diluciones de IgE a concentración conocida y en ella se interpolan las lecturas de las muestras problema, lograndose detectar cantidades de IgE entre 50 y 0,05 ng/ml.

Así mismo se han realizado distintos controles de especificidad del sistema demostrandose que:
1º. La IgG presente en las muestras a analizar no es detectada por los antisueros utilizados en la prueba, ya que cantidades de IgG añadidas a los diferentes standards de IgE (en una relación de concentraciones G/E de 10.000/1) no provocaron variación alguna en la curva standard. 2º. Entre los distintos antisueros y reactivos utilizados en esta técnica no se han detectado reacciones inespecíficas capaces de producir interferencias en las lecturas.

Dadas las características de sensibilidad y reproducibilidad de este método, lo consideramos apropiado para la detección de inmunoglobulina E a bajos niveles, y puede sustituir a las técnicas convencionales de radioinmunoensayo desarrolladas para este fin.

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE PRUEBAS CUTANKEAS, RAST, LIBERACION DE HISTAMINA Y ENZIMOINMUNOENSAYO EN EL DIAGNOSTICO DE ENFERMOS ALERGICOS.
P.Diaz Mateo, I.Moneo, M.Cuevas, V.Ureña, A.Bootello.
Servicio de Inmunología, Centro Ramón y Cajal, Crta. de Colmenar km.9,1, Madrid.

Enfermos con historia sugestiva de sensibilización a ácaros o pólenes han sido estudiados mediante "prick test". Al mismo tiempo se realizó liberación de histamina con el mismo lote de antígenos en las primeras 24 horas de extracción de la sangre. Por otro lado se realizó estudio de IgE específica en suero por el método de Rast y por enzimoimmunoensayo reverso según técnica que se describe en anterior comunicación.

Los antígenos estudiados en este grupo de pacientes fueron Dermatophagoides pteronyssinus, Lolium perenne y Olea europaea.

Los datos de este estudio reflejan ciertas discrepancias entre los diferentes métodos de diagnóstico y tienen a su vez distintas características en cuanto a costo, rapidez, seguridad para el enfermo, etc.

Por ello pensamos que en este momento no existe una única técnica "in vivo" o "in vitro" absolutamente fiable para el diagnóstico, pero que las técnicas "in vitro" son las más idóneas para seguir la evolución y el pronóstico del enfermo alérgico.

CUANTIFICACION DE LA IgE TOTAL, EN PLACAS DE MICROTITER, - POR ENZIMOINMUNOENSAYO.
E. Alvarez Ouesta, M. Cuevas, I. Moneo, V. Ureña, A. Bootello.
S. Inmunología, Centro Ramon y Cajal, Crta Colmenar Km 9,1.- Madrid 34.

El proposito de este trabajo consiste en la descripción de un método "in vitro", para la determinación de la IgE total en líquidos biológicos, que nos libere de la dependencia de los Kits comerciales.

Se emplearon placas de Dynatech M 1298. Se incubaron 16 horas a 4°C con 100 microlitros de una dilución 1/100 de antiIgE humana en PBS. Posteriormente se añadieron los sueros problemas, diluidos 1/10 en PBS, manteniéndolos tres horas en la cámara húmeda. En un tercer escalon, se depositó 100 microlitros de anti-IgE marcada con fosfato alcalino diluido al 1/2 en PBS tween durante 18 horas. Por fin se añadió el sustrato (Paranitrofenilfosfato) 1 mg/ml, parandose la reacción a los 30 minutos con hidróxido sódico 0,4 N, leyendose la placa con Titertek Multiskan. Después de cada escalon, en los tres primeros, se lavaron las placas con PBS tween.

Los resultados obtenidos han sido comparados con el Kit comercial (enzynost) obteniendose una r= 0,983 en 150 casos

- Con el método arriba descrito se consigue:
- 1) Determinar la IgE total en líquidos biológicos, sin depender de los Kits comerciales y reduciendo su costo en un 75%.
 - 2) Resultados fiables con 10 microlitros de suero, en concentraciones de IgE que oscilan entre 10 y 1000 U.I./ml
 - 3) Que la información obtenida por el lector de placas, pueda ser computarizada y tratada con un programa adecuado en ordenador.

ANÁLISIS DE LA CONCENTRACION REAL DE HISTAMINA EN LAS SOLUCIONES DE REFERENCIA PARA TESTS CUTÁNEOS. CONSIDERACIONES DIAGNÓSTICAS.

F. Malagon, F.L.Elorza, N. Ruolo, M. Lizaso y M. Dorado.
Departamento Bioquímica Clínica, Inmunodiagnostico, Hospital Universitario de Sevilla.

Ante el avance conseguido en los últimos años del llamado Test de Liberación de Histamina, dada la sensibilidad de la técnica empleada (Fluorimétrica) es evidente la necesidad de obtener unas soluciones standards apropiados ya que representan el modulo de referencia en dicha cuantificación. Nos hemos planteado, por similitud, el interés que tendría conocer en cifras absolutas la concentración de histamina existente en los viales-control que se incluyen rutinariamente en los estudios diagnósticos para las diversas modalidades de test cutáneos. Si un buen standard de concentración absolutamente conocida es de vital importancia para la cuantificación de histamina liberada, será lógico un preciso conocimiento de la concentración de histamina existente en los viales de referencia para tests cutáneos. Este dato solo se expresa vagamente como titulo y no en todos los preparados comerciales existentes.

Se han cuantificado como mínimo 3 viales de cada preparado con los resultados que se expresan en microgramos/ml.

Casa A Solucion Intradermo	53,686, sol. para Prick..	169,10
Casa B	"	183,42
Casa C	"	102,89
Casa D	"	443,66

Observando variaciones de hasta el 500% en soluciones de histamina destinada a un mismo uso y modalidad con lo que una determinada prueba podria ser positiva o negativa en función del control utilizado. Aparecerian tantos mas falsos positivos cuanto mas bajo en concentración de histamina sea el control empleado.

LA B₂ MICROGLOBULINA COMO MARCADOR DE NEOPLASIAS.

R. PEREZ, C. BOSCH, C. BRACCINI.

DEPARTAMENTO BIOQUIMICA (HOSPITAL INSULAR)

R. PEREZ - DEPARTAMENTO BIOQUIMICA - HOSPITAL INSULAR - LAS PALMAS DE GRAN CANARIA.

El presente trabajo, tiene como objetivo estudiar los niveles de B₂ en el paciente portadores de enfermedad Neoplásica en grado avanzado, intentando demostrar que este parametro puede ser un marcador de este tipo de condición clínica.

El material consiste en un grupo de 36 pacientes diagnosticado de Neoplasia avanzada de origen diverso y evidenciadas, con otros medios diagnósticos y un grupo control, de 11 pacientes. Se cuantifico la B₂ por R.I.A. usando el Phadebas Micro test (Uppsala Suecia). Se determino asimismo Creatinina Sérica, su aclaramiento Renal y la relación B₂/Cr.

Los valores de B₂ obtenidos en el grupo de Neoplasias, fueron de 4,5 ± 2,8 (X ± Sd Mg/l), y en el grupo control fue de 1,06 ± 0,3, siendo la diferencia entre ambos estadísticamente significativa (P < 0,001). Asimismo, existe diferencia significativa entre los valores del cociente B₂/Cr, en los Cancerosos (5,46 ± 3,9) y normales (1,61 ± 0,54).

Se concluye que los aumentos de B₂ Sérica y el cociente B₂/Cr, se puede considerar marcadores de Neoplasias en estado avanzado y su hallazgo obliga, en ausencia de fallo Renal, a la investigación por otros medios de posibles metastasis.