

Artículos originales cortos

Ensayo diagnóstico para TSH humana por ultramicroELISA empleando anticuerpos monoclonales

M. LLANO,¹ E. CARPIO,¹ R. ROSQUETE,¹ R. ROBAINA,² M. GONZÁLEZ¹ Y J. GAVILONDO¹

¹ División de Híbridomas y Modelos Animales, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

² Centro de Inmunoensayo, Apartado 6940, La Habana, Cuba

Recibido en diciembre de 1988

Aprobado en marzo de 1989

RESUMEN

La cuantificación de las concentraciones séricas de la hormona estimulante del tiroides (TSH) en neonatos tiene gran importancia diagnóstica en el hipotiroidismo primario congénito, enfermedad que, de no ser tratada precozmente, evoluciona con complicaciones de retraso mental. En Cuba existe desde 1987 un programa nacional de diagnóstico de esta entidad, que emplea como elemento tecnológico fundamental un sistema ultramicroELISA (UME), con dos anticuerpos policlonales, anti β -TSH como anticuerpo de captura, y anti subunidad α conjugado con β -galactosidasa, para el revelado de la reacción. La introducción de anticuerpos monoclonales (AcM) en estos procedimientos puede proporcionar ventajas adicionales, especialmente en lo que se refiere a especificidad y producción del reactivo. Nosotros hemos obtenido híbridomas secretores de AcM contra β -TSH mediante la fusión del mieloma P3/x63.Ag8.653, con linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con TSH. El AcM CB-TSH.1 (IgG1) se estudió a mayor profundidad como anticuerpo de captura en UME. Se demostró que este AcM puede sustituir efectivamente el anticuerpo policlonal de referencia; el UME, que combina el AcM en la fase sólida, y el anticuerpo policlonal para el revelado fue evaluado con muestras de pacientes, ofreciendo 100 % de coincidencia diagnóstica con el UME policlonal y buenas repetibilidad y reproducibilidad.

ABSTRACT

The quantitation of sera concentrations of the thyroid stimulating hormone (TSH) in newborns has great importance for the diagnosis of the primary congenital hypothyroidism, a disease that, if untreated early, evolves with mental retardation as part of the complications. Since 1987, a national program for the early diagnosis of this entity has been functioning, mainly based on the use of ultramicroELISA assays with anti- β polyclonal antibodies as capture reagent, and anti- α chain polyclonal antibodies as revealing reagent. The introduction of monoclonal antibodies (MAbs) in these procedures can be advantageous, especially regarding specificity and production of the reagents. We have obtained MAbs against the β subunit of TSH through the fusion of splenic lymphocytes of mice immunized with TSH, and the P3/x63.Ag8.653 myeloma. MAb CB-TSH.1 (IgG1) was evaluated as capture antibody for ultramicroELISA. It was demonstrated that this antibody can effectively substitute the reference polyclonal antibody; the ultramicroELISA that combines the MAb, and a revealing anti- α chain polyclonal antibody was evaluated with samples from patients, giving a 100% diagnostic coincidence with the polyclonal system and adequate reproducibility and repeatability.

INTRODUCCION

La TSH es una glicoproteína de gran importancia diagnóstica. La cuantificación de sus niveles séricos es conveniente para el estudio de endocrinopatías tiroideas y no tiroideas, así como de otras enfermedades (Finlayson *et al.*, 1987; Bent *et al.*, 1986). En particular, la cuantificación de esta hormona es crucial para el diagnóstico de hipotiroidismo congénito primario, una causa frecuente de retardo mental severo, pero que puede ser prevenido con un diagnóstico y tratamiento precoz.

En Cuba, en un estudio realizado entre los años 1986 y 1988, se determinaron cifras patológicas de TSH séricas (>25 mUI/l) en 1 por cada 2 945 recién nacidos (Güell *et al.*, 1988), sobre la base de una muestra de 67 744.

Para la cuantificación de esta hormona se han desarrollado varios métodos inmunológicos, siendo los más útiles los inmunoensayos radioisotópicos y los enzimáticos. Estos procedimientos requieren anticuerpos específicos para la TSH, cuya obtención tiene como problema fundamental la reactividad cruzada que se observa con las hormonas folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica (CG).

La base de este fenómeno está en la propia composición de estas hormonas, que poseen dos subunidades: la α , prácticamente idéntica en las cuatro hormonas, y la β , que es específica para cada una de ellas (Liao *et al.*, 1970; Nilsson *et al.*, 1986; Ozturk *et al.*, 1987; Rahamin *et al.*, 1984).

Es comprensible entonces que las preparaciones policlonales de anticuerpos para la TSH deban ser fabricadas a partir de la subunidad β , o en su defecto, extensamente adsorbidas para eliminar los anticuerpos anti-subunidad α . El advenimiento de la tecnología para la generación de anticuerpos monoclonales (AcMs) (Kohler, 1981) ha permitido la obtención de reactivos útiles para estos ensayos, evitando además ésta y otras dificultades asociadas a la producción de anticuerpos policlonales específicos. En este artículo reportamos la obtención de AcMs murinos que reconocen específicamente la TSH, y su aplicación en la construcción de un ultramicroELISA diagnóstico.

MATERIALES Y METODOS

Antígenos y estándares

En la inmunización y en el ensayo primario de los hibridomas se empleó TSH humana purificada de hipófisis (Centro de Inmunoensayo, CIE, La Habana). En otros experimentos usamos el estándar de TSH producido por el CIE validado contra el estándar WHO (No. 80/558) con 0,2 mg/UI. Los estudios de reactividad cruzada se realizaron con CG, LH y FSH suministradas por el CIE.

Animales e inmunización

Se inyectaron ratones BALB/c machos (4-6 semanas), suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio, por vía intraperitoneal (i.p.) con 4 dosis de 20 μ g de TSH adsorbidas en 350 μ g de $Al(OH)_3$, a intervalos semanales, antes de la titulación del suero. Para la fusión se seleccionó un animal con título 1:10 000 (ver más adelante), que se inyectó i.p. con igual dosis de antígeno en solución salina tamponada con fosfatos pH 7,2 (SSTF), y se sacrificó tres días después para la obtención de los linfocitos esplénicos.

Fusión, clonaje y cultivo

El protocolo de fusión con PEG, la formulación de los medios y el cuidado básico de las células recién fundidas, han sido detallados antes (Gavilondo *et al.*, 1988). Los hibridomas seleccionados se clonaron al menos dos veces por dilución limitante, y los clones relevantes se expandieron para su criopreservación e inoculación a ratones.

Ensayo de los hibridomas

El ensayo se realizó por ultramicroELISA (UME) *sandwich* en el Sistema Ultramicroanalítico (SUMA, CIE) (Horn *et al.*, 1981; Otero *et al.*, 1984; Van Brunt, 1987). Este sistema se basa en reacciones antígeno-anticuerpo que son puestas en evidencia mediante ensayos tipo ELISA que emplean sustratos fluorogénicos.

Entre los componentes del SUMA están: placas de 96 posiciones (10 μ l/pozo), una pipeta multicanal controlada por un microprocesador, que dispensa, lava y transfiere a las placas de lectura, y un lector computarizado que procesa las lecturas de fluorescencia, que se expresan relativas a los valores de dos controles extremos.

Las placas se recubrieron con 10 μ g de IgG de carnero anti- β -TSH (CIE) (PcTSH) por ml, a 37°C durante 4 horas. Con estas placas activadas se realizaron dos tipos de experimentos:

a) Competencia de los anticuerpos de los sobrenadantes con el PcTSH: se mezclaron, volumen a volumen, los sobrenadantes con 50 mUI/l de TSH estándar diluida en SSTF con 10 % de suero de carnero, y se incubaron 1 hora a 37°C. Después de lavar, se añadió IgG de carnero anti α -TSH conjugada con fosfatasa alcalina (PcA-FA, CIE) 1/200 y se incubó durante 4 horas a 22°C. Luego se lavó y la reacción se reveló con 4-metilumbeliferil-fosfato en tampón de dietanolamina durante 30 minutos a 22°C. Las muestras se transfirieron a las placas de lectura y se evaluaron a 480 nm. Los sobrenadantes fueron considerados positivos cuando los valores de fluorescencia fueron, al menos, tres veces superiores a los de los controles negativos que contenían sobrenadantes de hibridomas no relacionados.

b) Competencia de los anticuerpos del sobrenadante con el PcA-FA: en este caso se incubaron las placas 1 hora a 37°C con estándar de TSH 25 mUI/l disuelto en SSTF con 5 % de suero de carnero. Después se añadió una mezcla, volumen a volumen de sobrenadante y PcA-FA 1/100 y se incubó 4 horas a 22°C. El resto del experimento y el criterio de positividad fueron como se describió antes.

UME para reactividad cruzada

Las placas se recubrieron con 1 μ g/ml de TSH, CG, FSH, albúmina sérica humana (ASH) y se añadieron los sobrenadantes positivos; la presencia o ausencia de los anticuerpos murinos se reveló con un IgG de carnero anti IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido 1/1000; los pasos de lavado y las condiciones de incubación fueron ya descritos. Este experimento se repitió empleando el anticuerpo monoclonal purificado.

Isotipaje de inmunoglobulinas

La clase y subclase de inmunoglobulina se determinó por inmunodifusión radial doble (Ouchterlony y Nielsson, 1978), empleando sobrenadante de cultivo diez veces concentrado y antiseros clasificadores (ICN immunobiologicals).

Producción y purificación de los AcMs

Los hibridomas seleccionados se inyectaron i.p. en ratones BALB/c preinoculados con aceite mineral, y el fluido ascítico, después de clarificado y deslipidizado, se purificó por cromatografía con proteína A Sepharose (Farmacia) como recomienda el fabricante (Ostlund, 1986). La fracción activa se identificó por UME indirecto (ver UME para reactividad cruzada) recubriendo con TSH. Las determinaciones de proteínas se realizaron por el método de Lowry *et al.* (1951); la pureza se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida, empleando dodecilsulfato de sodio y condiciones de reducción (Laemli, 1970).

UME para la cuantificación de TSH en suero

El UME empleado actualmente en el Programa Nacional de Diagnóstico de Hipotiroidismo Congénito se basa en el PcTSH (ver "Ensayo de los hibridomas"), como anticuerpo de captura y el PcA como anticuerpo de revelado. El AcM purificado se ensayó para determinar su utilidad como anticuerpo de

captura en este sistema, en lugar del PcTSH. Se adsorbieron varias concentraciones del AcM a placas de UME a 37°C durante 4 horas; después de lavar, se añadieron diluciones seriadas del estándar de TSH y se dejaron 18 horas a 4°C seguido por lavados, y la incubación por 4 horas a 22°C con el PcA-FA a una dilución de 1/200. Los siguientes pasos se desarrollaron como ya se ha descrito.

La determinación de la sensibilidad, la repetibilidad y el ensayo de sueros de recién nacidos y sueros controladores, se realizaron según estas mismas condiciones experimentales, pero empleando en la fase sólida 15 µg/ml del AcM purificado.

Como referencia se tuvo el UME del Programa Nacional cuyas condiciones experimentales se diferencian sólo en el empleo de 10 µg/ml del PcTSH en la fase sólida.

Procesamiento estadístico

La sensibilidad del UME descrito en este artículo se consideró como la concentración de antígeno más baja, cuya media de fluorescencia relativa fue diferente de la de una muestra con cero concentración de antígeno incrementada en tres veces el valor de su desviación estándar. El nivel de confiabilidad es del 99,9 % ($p < 0,01$).

Para comparar los dos UMEs durante la evaluación de los sueros de recién nacidos se realizó un análisis de correlación lineal simple, teniendo en cuenta los valores de TSH sérica de cada muestra.

RESULTADOS

La eficiencia de hibridación fue superior al 90 % (crecieron hibridomas en 864 pozos de los 960 sembrados con células fundidas). Después de dos ensayos consecutivos por UME de competencia y la prueba de reconocimiento frente a CG, LH, FSH y ASH, se seleccionaron cinco hibridomas por su identificación específica de TSH. Todos los cultivos se clonaron y reclonaron, encontrándose que secretaban anticuerpos de clase IgG.

Uno de ellos, el clon 115/70/1, que secreta el AcM CB-TSH.1 (IgG1), se seleccionó como anticuerpo de captura para el desarrollo de un UME tipo *sandwich*, por lo que se inyectó a ratones para la producción de ascitis y purificación.

En la prueba de este anticuerpo para la captura en un UME *sandwich* empleando como anticuerpo de revelado el PcA y teniendo como referencia el UME del Programa Nacional de Diagnóstico de Hipotiroidismo Congénito, se encontró que el recubrimiento de las placas con 15 µg/ml, el AcM reproducía una conducta similar a la exhibida por el sistema de referencia (figura 1).

El AcM CB-TSH.1 purificado (15 µg/ml) no mostró reactividad cruzada (figura 2) en el UME indirecto frente a los antígenos antes mencionados.

La sensibilidad del ensayo se determinó en experimentos realizados por triplicado, con varias concentraciones de TSH disueltas en SSTF con 5 % de suero de carnero. El blanco se preparó con el tampón de dilución. El valor de sensibilidad calculado fue de 0,8mUI/l ($p < 0,01$) (figura 3).

La repetibilidad del ensayo fue buena teniendo en cuenta los coeficientes de variación intraensayos (CV) ($< 7,1$ %, $n = 8$) interensayos ($< 15,1$ %, $n = 7$) para varias concentraciones de TSH (tabla 1).

El empleo paralelo de ambos UMEs para el ensayo en duplicados del suero (dil. 1:2) de sangre del cordón umbilical de 33 recién nacidos demostró una total coincidencia diagnóstica (tabla 2). El análisis de correlación lineal de los datos anteriores arrojó un coeficiente de Pearson de 0,99.

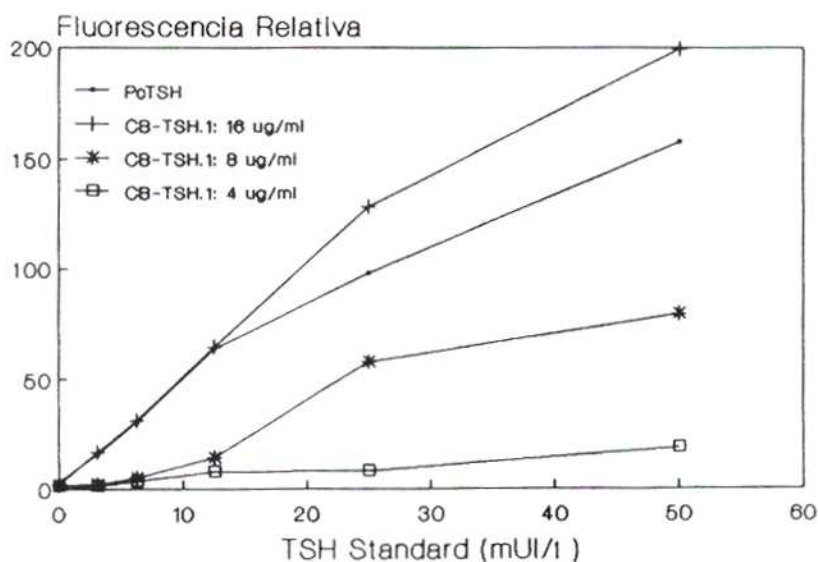


FIG. 1. Determinación de la concentración de recubrimiento óptima para el CB-TSH.1 en ultramicroELISA con respecto al anticuerpo policlonal anti-subunidad β -TSH de referencia (PeTSH).

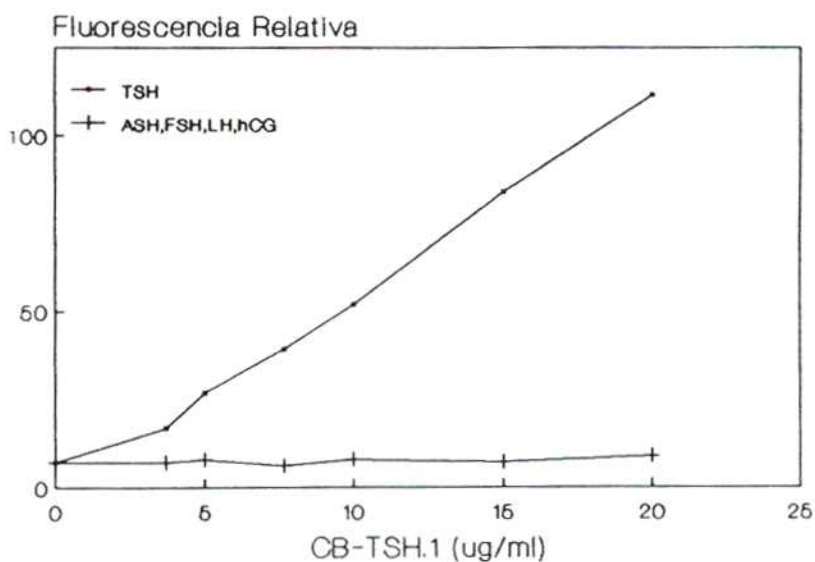


FIG. 2. Reactividad del AcM CB-TSH.1 con TSH y otros antígenos (LH, CG, FSH, albúmina sérica humana). Los pozos se sensibilizaron con 1 μ g de antígeno/ml. Se añadieron concentraciones incrementadas de CB-TSH.1 y la reacción se reveló con un anticuerpo policlonal antirratón, conjugado con fosfatasa alcalina.

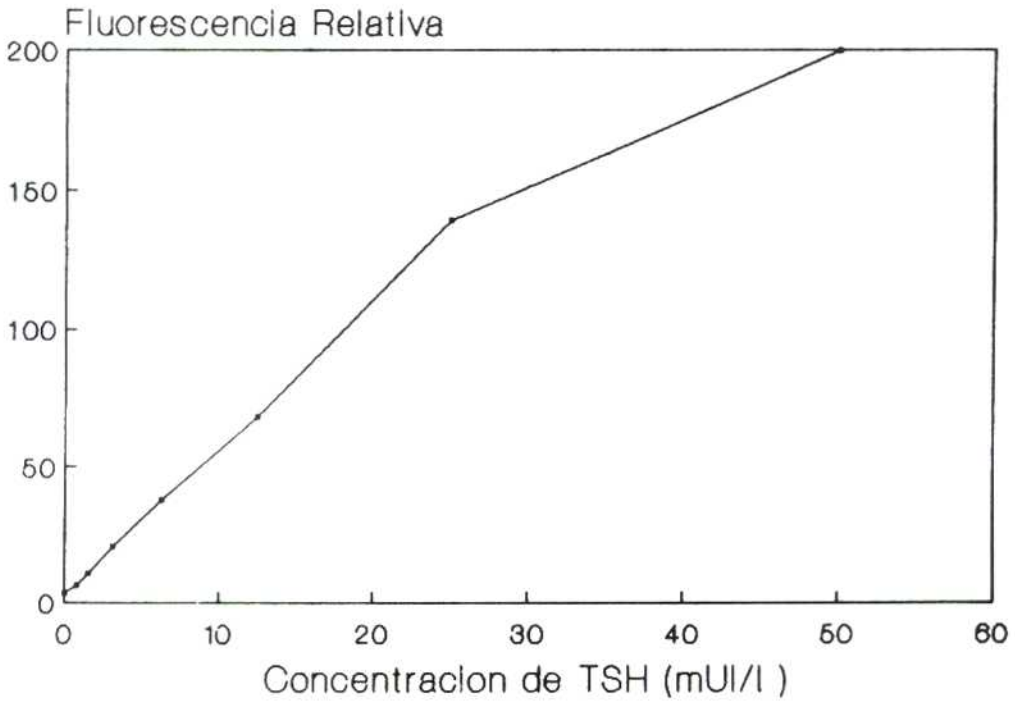


FIG. 3. Rango de sensibilidad del sistema ultramicroELISA AcM/PcA-FA para TSH.

Tabla 1
PRECISION DEL SISTEMA UME CB-TSH.1/PcA-FA PARA TSH

<i>Concentración de TSH (mUI/l)</i>	<i>Coefficientes de variación intraensayos (%) (n = 8)</i>	<i>Coefficientes de variación interensayos (%) (n = 7)</i>
50	6,4	15
25	5,2	13,2
12,5	7,0	14,3
6,3	5,3	11,8
3,1	6,8	10,1
1,6	4,5	9,8

n = número de muestras por ensayo o de ensayos independientes realizados.

Tabla 2
COMPARACION DEL ULTRAMICROELISA (UME) CB-TSH.1/PcA-FA
Y DEL PcTSII/PcA-FA EN LA CUANTIFICACION DE LAS CONCENTRACIONES SERICAS
DE TSH DE 33 RECIEN NACIDOS

	<i>UME AcM/AcP</i>	<i>UME AcP/AcP</i>
NORMALES < 20 mUI/l	3.1, 3.3, 3.1, 4.0	4.0, 4.1, 4.2, 4.6
	7.0, 3.4, 3.1, 13.2	8.3, 3.7, 5.0, 13.9
	10, 3.5, 3.3, 3.7	11.0, 3.9, 3.3, 3.1
	3.1, 2.1, 6.1, 3.1	2.1, 3.5, 7.0, 4.0
	3.5, 3.4, 3.1, 3.7	4.2, 4.0, 3.1, 3.6
	4.1, 7.4, 2.5, 8.9	4.2, 8.0, 3.0, 10.0
	7.9, 10.1, 12.3, 10.3	11.0, 9.0, 11.1, 11.0
ELEVADOS 25 mUI/l	5.5, 3.8	5.9, 4.1
	30.3, 35.4, 43.5	31.2, 37.1, 40.0

NOTA: AcM/AcP = AcM CB-TSH.1 en la fase sólida y el anticuerpo policlonal anti-cadena α -TSH conjugado con fosfato alcalina (PcA-FA) como segundo anticuerpo;
 AcP/AcP = anticuerpo policlonal anti- β -TSH como primer anticuerpo y el PcA-FA como revelador.
 El orden de los valores en una y otra columna indica que se trata de la misma muestra.

La evaluación de seis sueros controladores con concentraciones de TSH conocidas, se realizó por los dos UMEs. En todos los casos se encontró buena correlación entre el valor conocido y el encontrado. Estos experimentos se realizaron por cuadruplicado (tabla 3).

Tabla 3
COMPARACION DEL ULTRAMICROELISA (UME) CON ANTICUERPOS MONOCLONALES (AcM)
Y POLICLONALES (AcP) PARA LA CUANTIFICACION DE MUESTRAS
DE CONCENTRACIONES CONOCIDAS DE TSH

<i>Concentración real de TSH</i>	<i>Concentración de TSH</i> <i>UME AcM/AcP</i>	<i>Concentración de TSH UME</i> <i>AcP/AcP</i>
56	54,9	55,3
36	35,7	34,9
30	31,1	30,2
24	23,7	23,5
20	21,3	21,8
17	18,1	17,3

NOTA: Las concentraciones en mUI/l.
 AcM/AcP = CB.TSH.1 como anticuerpo de captura y el anticuerpo policlonal anti- α -TSH conjugado con fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo.
 AcP/AcP = El anticuerpo policlonal anti- β -TSH en la fase sólida y el anti- α -TSH antes mencionado como revelador.

DISCUSION

Por la importancia diagnóstica y pronóstica de la TSH y por sus bajas concentraciones séricas, se han desarrollado varios métodos inmunológicos radioisotópicos y no radioisotópicos para su cuantificación. Las características estructurales de esta hormona determinan que para su inmunocuantificación se requieran anticuerpos anti β -TSH (Liao *et al.*, 1970; Nilsson *et al.*, 1986; Rahamin *et al.*, 1984; Ozturk *et al.*, 1987).

En nuestros experimentos el esfuerzo principal se dirigió hacia el desarrollo de AcMs anti β -TSH, que pudieran sustituir eficientemente el anticuerpo policlonal empleado en la fase sólida del UME del Programa Nacional de Diagnóstico de Hipotiroidismo Congénito.

El desarrollo eficiente de tales AcMs requiere una detección temprana de los hibridomas secretores de anticuerpos que no reaccionan "cruzado" con las otras hormonas y es importante desde el primer ensayo determinar aquellos clones de interés para evitar gastos de tiempo y reactivos con hibridomas poco específicos. Esto no es siempre posible en virtud de que los pequeños volúmenes de sobrenadantes disponibles en las primeras etapas del cultivo (200 μ l para placas de 96 pozos) no son suficientes para realizar ensayos simultáneos. Por otro lado, la dilución de los sobrenadantes solo puede emplearse cuando se ha preparado un sistema de ensayo muy sensible (Khazaeli *et al.*, 1981).

En este trabajo, aprovechamos las ventajas de los pequeños volúmenes de reacción (10 μ l) y la alta automatización del SUMA para el ensayo temprano de los hibridomas contra varios antígenos (TSH, CG, LH, FSH, y ASH) sin necesidad de diluir los sobrenadantes.

Como resultado de la fusión se obtuvo cerca del 0,6 % de clones específicos de clase IgG; de ellos seleccionamos, para continuar su estudio, el clon 115/70/1 que secreta el AcM CB-TSH.1 (IgG1). Por su patrón de competencia con anticuerpos policlonales anti α -TSH y anti β -TSH en el UME *sandwich*, el CB-TSH.1 parece unirse a determinantes antigénicos presentes en la subunidad β de la hormona. Esto se correlaciona bien con los resultados obtenidos en los experimentos de reactividad cruzada frente a hormonas que tienen subunidades α similares y β diferentes.

Para definir la concentración óptima de recubrimiento, se eligió como patrón de referencia el UME del Programa Nacional de Diagnóstico de Hipotiroidismo Congénito y se realizaron los experimentos bajo las condiciones del UME de referencia. La concentración óptima del AcM resultó ser 15 μ g/ml.

Los experimentos de sensibilidad indican que el nuevo UME AcM/anticuerpo policlonal es adecuado para el diagnóstico, según los rangos de normalidad definidos en el país para los recién nacidos (normal: < 20 mUI/l, dudoso: de 20 hasta 24,9 mUI/l; patológico: > 25 mUI/l) y por lo tanto, para adultos.

El ensayo tiene una buena repetibilidad según los CVs intraensayos e interensayos que son menores que 7,1 y 15,1, respectivamente.

Existe una alta correlación lineal entre el UME aquí reportado y el empleado en el Programa Nacional de Diagnóstico, sobre la base de una muestra de 33 recién nacidos. La cuantificación de TSH en presencia de suero humano (sueros controladores) tuvo también alta fidelidad.

En resumen, los datos experimentales anteriores indican que el CB-TSH.1 es un sustituto adecuado del anticuerpo policlonal de captura que se emplea en el Programa Nacional de Diagnóstico de Hipotiroidismo Congénito. Este AcM reporta ventajas sobre el policlonal, por ser su producción más económica a largo plazo y constituir un reactivo más homogéneo.

REFERENCIAS

- BENT, G.A.; J.M. HERHSMAN y G.D. BRAUNSTEIN (1986). *Patients with severe non-thyroidal illness and serum thyrotropin concentrations in the hypothyroid range*. Amer. J. Med. **81**: 365-369.
- FILAYSON, J.; W. SUEDDON y I.W. PERCY ROBB. (1987). *Interference in commercial assays for TSH*. Lancet I (8530): 445-446.
- GAVILONDO, J.; A.M. VAZQUEZ; S. FONG; E. RENGIFO; A. FERNANDEZ; C.A. GARCIA; A. VELANDIA; A. PAVLENKO; S. HERNANDEZ; N. RUISANCHEZ; V. SUDIN y M.E. FAXAS (1988). *Anticuerpos monoclonales contra el antígeno carcinoembrionario en ensayos inmunohistoquímicos e inmunoquímicos*. Interferón y Biotecnología **4**: 143-156.
- GUELL, R. y R. ROBAINA (1988). *PROGRAMA NACIONAL PARA LA DETECCION PRECOZ DE HIPOTIROIDISMO CONGENITO*. Libro de resúmenes de la I Jornada Nacional de los Laboratorios Diagnósticos SUMA.
- HORN, A.; J.L. FERNANDEZ YERO y M. SHULSE (1981). *UltramicroELISA for alphafeto protein with the chamber analytical technique*. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **19**: 702-705.
- KHAZAEI, M.B.; B.G. ENGLAND; R.C. DIETERLE; G.D. WORDBLOM; G.A. KABZA y W.H. BEIERWALTER (1981). *Development and characterization of a monoclonal antibody which distinguishes the β -subunit of human chorionic gonadotropin (β hCG) in the presence of the hCG*. Endocrinology. **109**: 1290-1295.
- KOHLER, G. (1981). *The technique of hybridoma production* Immunological Methods. Vol. II: 285-298.
- LAEMMLI, N.K. (1970). *Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4*. Nature **227**: 680-685.
- LIAO, T.H. y J.G. PIERCE. (1970). *The presence of a common type of subunit in bovine thyroid-stimulating and luteinizing hormones*. J. Biol. Chem **245**: 3275-3280.
- LOWRY, O.H.; N.J. RESEMBROUGH; A.L. FARR y R.K. RANDALL (1951). *Protein measurement with the folin phenol reagent*. J. Biol. Chem. **193**: 265-269.
- NILSSON, B.O.; S.W. ROSEN; B.D. WEINTRAUB y D.A. ZOFF (1986). *Differences in the carbohydrate moieties of the common α -subunits of human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and thyrotropin: Preliminary structural inferences from direct methylation analysis*. Endocrinology **119** (6): 2737 - 2743.
- OSTLUND, C. (1986). *Large-scale purification of monoclonal antibodies*. Trends in Biotech. Nov: 288-293.
- OTERO, A.J.; J. SARRACENT; J.L. FERNANDEZ YERO y I. RODRIGUEZ. (1984). *A 10 microliter indirect ultramicroELISA for detection of monoclonal antibodies against human alphafeto protein*. Hybridoma **3**: 391-394.
- OUCHTERLONY, O. y L.A. NIELSSON (1978). "Immunodiffusion and immunoelectrophoresis", en: *Hand Book of Experimental Immunology*. Ed. D.M. Weir. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburg, Melbourne, p. 196.
- OZTURK, M.; D. BELLET; K.J. ISSELBACHER y J. WANDS (1987). *Ectopic β -human chorionic gonadotropin production by a human hepatoma cell line (focus): Isolation and immunochemical characterization*. Endocrinology **120**: 559-566.
- RAHAMIN, N.; M. IMBAR y C.S. HEXTER (1984). *Monoclonal antibody specific to the beta subunit of human chorionic gonadotropin (hCG) and capable of agglutinating hCG-coated red blood cells*. Hybridoma **3**: 49-53.
- VAN BRUNT, J. (1987). *Cuba focuses on monoclonals for health care*. Biotechnology **5**: 1262.