

Artículos originales cortos

Algunas características cinéticas de la beta galactosidasa recombinante libre y conjugada de *E. coli* empleada en UltramicroELISA

R. R. GONZÁLEZ¹ y J. H. ALFONSO²

¹ Instituto Nacional de Endocrinología. Hospital "Comandante Manuel Fajardo", Vedado, La Habana 4, Cuba

² Centro de Inmunoensayo, La Habana, Cuba

Recibido en junio de 1989

Aprobado en junio de 1990

RESUMEN

En este trabajo presentamos algunas de las características cinéticas de la β galactosidasa de *E. coli* recombinante utilizada en la preparación de conjugados para los ensayos inmunoenzimáticos con la tecnología del Sistema Ultramicroanalítico (SUMA).

Se estandarizó la técnica de determinación de la actividad enzimática empleando 4-metil-umberiferil- β -D-galactopiranosido como sustrato y se calculó la correlación con la actividad específica determinada con el sustrato ortonitrofenil- β -D-galactopiranosido.

Se estudió la afinidad enzima-sustrato de la β galactosidasa libre y conjugada a diferentes proteínas y haptenos, utilizada en UltramicroELISA (UME) de tipo competitivo y sandwich. Las K_m reales y aparentes fueron calculadas según el método de Lineweaver-Burk.

La conjugación por el método del glutaraldehído no provocó grandes cambios en la afinidad enzima-sustrato, sin embargo las K_m aparentes de los conjugados adsorbidos fueron diferentes en los distintos UME.

Los resultados obtenidos pueden ser utilizados en la estandarización de la conjugación y en el montaje de los UME en el SUMA, así como en la interpretación de los fenómenos moleculares que ocurren en los ensayos inmunoenzimáticos.

SUMMARY

This paper concerning results of some kinetic characteristics of recombinant β -galactosidase from *E. coli*, which is used for the preparation of conjugates suitable for immunoassays developed for the Ultramicroanalytical System (SUMA).

The measurements of the enzymatic activity employing 4-methyl umbelliferyl- β -D-galactopiranoside as substrate were standardized and the correlation between the specific activity with orthophenyl- β -D-galactopiranoside and with the former substrate was calculated.

The affinity enzyme-substrate, both of the free and conjugated enzyme was determined for different proteins and haptens in competitive and sandwich ultramicroELISA (UME).

The real and apparent K_m were obtained following the method of Lineweaver-Burk.

Conjugation to glutaraldehyde did not bring about relevant changes in the affinity enzyme-substrate, but the apparent K_m of the adsorbed conjugates were different in diverse UME.

Our results are useful to standardize the conjugation step and for the interpretation of the molecular process in the development of immunoassay for the SUMA.

INTRODUCCION

En los últimos años se han desarrollado numerosos ensayos inmunoenzimáticos (EIA) para la detección de drogas, hormonas, antígenos, organismos patógenos y anticuerpos, como alternativa del empleo del radioinmunoensayo (RIA), con motivo de los inconvenientes de este, por el manejo y la contaminación de sustancias radioactivas (Oellerich, 1984; Kallner *et al.*, 1987; Neuman y Cohen, 1989; Chan y Ko, 1988; Mortensen *et al.*, 1989).

Con el empleo del EIA pueden alcanzarse niveles de sensibilidad comparables con los RIA. Sobre este aspecto influyen grandemente la selección de la enzima marcadora, el método de conjugación y el sistema de detección (O'Sullivan *et al.*, 1979).

Los EIA pueden ser catalogados como heterogéneos u homogéneos. En los primeros la actividad catalítica del conjugado no varía por la influencia de la reacción antígeno-anticuerpo y requieren pasos de separación. Estos ensayos, caracterizados por la unión del conjugado a la fase sólida (ELISA) presentan mayor sensibilidad que los ensayos homogéneos.

Los ELISA pueden ser de tipo competitivos, sandwich competitivos o no, con antígenos o anticuerpos (indirectos) o inmunoenzimométricos, de acuerdo con la naturaleza del compuesto inmovilizado en la fase sólida y el sistema de captura utilizado con uno o más anticuerpos libres o marcados (Oellerich, 1984).

Entre las enzimas empleadas con mayor frecuencia en ELISA se encuentran la peroxidasa, fosfatasa alcalina, β galactosidasa y glucosa oxidasa. Estos marcadores pueden ser acoplados a antígenos o anticuerpos por diversos métodos (Tijssen, 1985).

La unión a través de la reacción con el glutaraldehído ha sido ampliamente utilizada para la obtención de conjugados con buenos resultados (Avrameas, 1969).

En la mayoría de los ELISA la actividad enzimática se determina por fotometría, aunque la utilización de sustratos fluorogénicos (Arakawa *et al.*, 1983) o quimioluminogénico (Weerasekera *et al.*, 1983) permite el incremento de los niveles de detección.

El empleo del ELISA para pesquisajes masivos se facilita con la aplicación de la tecnología del Sistema Ultramicroanalítico (SUMA), lográndose el procesamiento automatizado de varios pasos, de las lecturas y cálculos, además de reducirse grandemente el costo a causa de los pequeños volúmenes de reactivos utilizados (Güell *et al.*, 1988).

La estandarización de la producción a grandes escalas de los kit de UltramicroELISA (UME) requiere del estudio de las características de las enzimas marcadoras, de los anticuerpos y antígenos utilizados para estos fines.

En este trabajo presentamos algunas características cinéticas de la β galactosidasa libre y conjugada por reacción con el glutaraldehído, para la síntesis de conjugados que se utilizan en los UME con sustrato fluorogénico.

MATERIALES Y METODOS

Equipos

Se utilizó un equipo SUMA 121b, un sistema ultramicroanalítico que comprende: un espectrofluorímetro completamente computarizado para la detección y cuantificación de los resultados, una multipipeta computarizada de 96 posiciones (ERIZO 101) y otros materiales específicos para el procesamiento de muestras en el rango ultramicroanalítico (10 μ l), producido por el Centro de Inmunoensayo, Ciudad de La Habana, Cuba.

Reactivos

Enzimas

Se emplearon diversos lotes de β galactosidasa recombinante de *E. coli*, donada por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de La Habana, Cuba.

Conjugados

Se utilizaron diversos conjugados de β galactosidasa con anticuerpos policlonales o hapteno, que se emplean en los kit de UltramicroELISA (UME) para la detección de antígeno carcinoembrionario (CEA), IgM anti *M. leprae*, alfa-fetoproteína, antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) y Tiroxina (T4), producidos en el Centro de Inmunoensayo, Ciudad de La Habana, Cuba.

Sustratos

Se utilizó el sustrato fluorigénico 4-metil-umbeliferil β -D-galactopiranosido de Koch Light Limited, Haverhill, Suffolk, England y del Centro Nacional de Biopreparados (BIOCEN), Ciudad de La Habana, Cuba.

Placas

Se emplearon placas para UME de cloruro de polivinilo (PVC) de 96 posiciones, recubiertas con las sustancias específicas para cada tipo de ensayo del Centro de Inmunoensayo:

UME-T4: Recubrimiento de anticuerpo monoclonal anti-T4

UME-CEA: Recubrimiento de anticuerpo monoclonal anti-CEA

UME-alfa-fetoproteína: Recubrimiento de anticuerpo policlonal anti-alfa-fetoproteína

UME-IgM anti *M. leprae*: Recubrimiento de antígeno sintético BSA de *M. leprae*

UME-HBsAg: Recubrimiento anticuerpo policlonal anti-HBsAg

Sueros

Se emplearon diversos sueros: carnero, conejos, ternera, ratón y suero humano libre de T4, del Centro de Inmunoensayo.

Otros reactivos

La 4-metil-umbeliferona (Koch Light Limited, Haverhill, Suffolk, England) BSA fracción V de Cohn (Sigma, Chemical Co.), St. Louis, Missouri, USA).

Métodos

Determinación enzimática

La actividad enzimática de los diferentes lotes de β galactosidasa se determinó a 37°C, utilizando 50 μ l de solución de enzima y 50 μ l de sustrato fluorigénico a una concentración de 1,18 mM/l. Se relacionó la actividad enzimática calculada con la actividad específica reportada por el productor. Se prepararon soluciones de 1 mg/ml de β galactosidasa en PBS-MgCl₂, NaN₃ 0,1 % y se ajustó la dilución final de la enzima (1:20 000) para obtener lecturas de fluorescencia entre 90 y 150, a longitud de ondas de excitación de 367 nm y de emisión de 449 nm.

Unidades de actividad enzimática. Una unidad de actividad enzimática (UA) equivale a una unidad de fluorescencia a 449 nm de la 4-metil-umbeliferona producida, por mililitro de solución enzimática en la reacción a 37°C por 30 minutos.

Determinación de la afinidad enzima-sustrato

Se estudió el efecto de concentración de sustrato sobre la actividad de la β galactosidasa libre y conjugada a diversas proteínas y haptenos. Se incubaron 50 μ l de enzima (1 mg/ml) a disolución adecuada (F_{max} aproximada entre 100-140) con igual volumen de sustrato fluorigénico para obtener concentraciones finales de 1,18; 1,03; 0,88; 0,73; 0,59; 0,44; 0,3 y 0,1 mM de sustrato por litro. Se calculó la constante de Michaelis (Km) según el método de Lineweaver-Burk (1934).

Enzima conjugada

Se utilizaron las mismas concentraciones de sustrato descritas para la determinación de la actividad de la enzima libre. Para los conjugados libres se incubaron a 37°C, 50 μ l de sustrato con 50 μ l de cada conjugado, adecuadamente diluidos en el buffer o disolución del ensayo específico y se determinó la actividad de la enzima conjugada en solución. La determinación de la actividad enzimática de los conjugados absorbidos por la reacción inmunológica en las placas de PVC recubiertas específicamente para cada sistema de UltramicroELISA se realizó siguiendo las especificaciones de cada kit de UME descrito y se incubaron las placas con las diferentes concentraciones de sustrato indicadas anteriormente.

Cálculos estadísticos

La actividad enzimática de los lotes de enzima se determinó en 10 ensayos independientes con 8 réplicas por ensayo. La regresión exponencial fue calculada por el programa de cálculo estadístico del paquete de programas de software del Microstat.

La determinación de las K_m se realizó al menos en 5 ensayos independientes, con 10 réplicas de cada concentración de sustrato empleada. Las varianzas de la actividad enzimática fueron comparadas por el test de Fisher y las medias por el test de Student, para un nivel de significación de 0,05 utilizando también el Microstat.

RESULTADOS Y DISCUSION

Relación de la actividad enzimática fluorimétrica con la actividad específica de la beta galactosidasa

En la tabla 1 se muestran los resultados de la actividad enzimática de 6 lotes de β galactosidasa y los valores de actividad específica reportadas por el productor.

En el cálculo de la regresión exponencial entre ambos métodos, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,990. La actividad específica de los diferentes lotes de enzima β galactosidasa que se emplean en la obtención de conjugados puede entonces calcularse según la expresión:

$$\text{Actividad específica} = 8,73 F - 215,82$$

donde F es la fluorescencia medida.

La aplicación de esta ecuación permite el control de los lotes de enzima para la conjugación en los diferentes sistemas y, a la vez, es posible realizar controles de la calidad del sustrato empleado a partir de la actividad enzimática calculada en unidades de fluorescencia.

Tabla 1
ACTIVIDAD ENZIMATICA DE DIFERENTES LOTES DE β -GAL
POR EL METODO FLUORIMETRICO

Lote β -Gal	Actividad específica (U/mg)	Actividad enzimática del sustrato fluorescente		
		Fluorescencia n = 80	D.S.	C.V. (%)
I 010	605	98,88	6,03	6,16
I 012	994	147,28	9,68	6,6
I 013	824	129,36	6,58	5,15
I 014	475	79,84	5,03	6,42
I 015	1091	150,55	8,79	5,85
I 016	926	135,94	7,97	5,88

El método de determinación de la actividad enzimática por fluorimetría es notablemente simple, rápido y reproducible de acuerdo con los 10 ensayos independientes ($n=80$, C.V. % interensayo de 5,1-6,6) realizados a los diferentes lotes. Este método es más ventajoso que el método tradicionalmente utilizado para la determinación de la actividad enzimática utilizando el sustrato colorigénico ONPG.

Afinidad enzima-sustrato

Beta galactosidasa libre

La enzima β galactosidasa presentó una K_m de 0,256 mM y V_{max} de $142,29 \times 10^3$ UA/min.

La ecuación obtenida fue:

$$1/V_0 = 0,000507 1/S + 0,005857; r = 0,990.$$

Conjugado beta galactosidasa-T4

En la figura 1 se muestran las rectas correspondientes del efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática del conjugado β galactosidasa-T4 en forma soluble y adsorbido sobre placas de PVC con anticuerpos monoclonales anti T4.

La ecuación $1/V_o = 0,000509 \text{ 1/S} + 0,006149$; $r = 0,990$ define la recta obtenida para el conjugado soluble. En este caso la K_m aparente calculada fue de 0,245 mM y la V_{max} de $704,745 \times 10^3 \text{ UA/min}$.

Para el conjugado adsorbido la ecuación calculada fue: $1/V_o = 0,000795 \text{ 1/S} + 0,006471$; $r = 0,990$.

La K_m aparente para la enzima inmovilizada de esta forma fue de 0,363 mM y la V_{max} de $2,576 \times 10^3 \text{ UA/min}$.

La comparación de las K_m aparentes indica que el conjugado adsorbido presenta una afinidad menor por el sustrato fluorigénico que el conjugado soluble. Asimismo la V_{max} calculada es menor para el primero, aunque este dato sólo tiene valor para la comparación de sistemas en igualdad de condiciones.

Conjugado beta galactosidasa - anti IgM

Las rectas correspondientes a la ecuación de Lineweaver-Burk aplicada al conjugado β galactosidasa-anti IgM se muestran en la figura 2. En este caso, la ecuación obtenida para el conjugado soluble fue: $1/V_o = 0,00567 \text{ 1/S} + 0,007594$; $r = 0,999$.

La K_m aparente calculada fue de 0,221 mM y la V_{max} de $342,372 \times 10^3 \text{ UA/min}$.

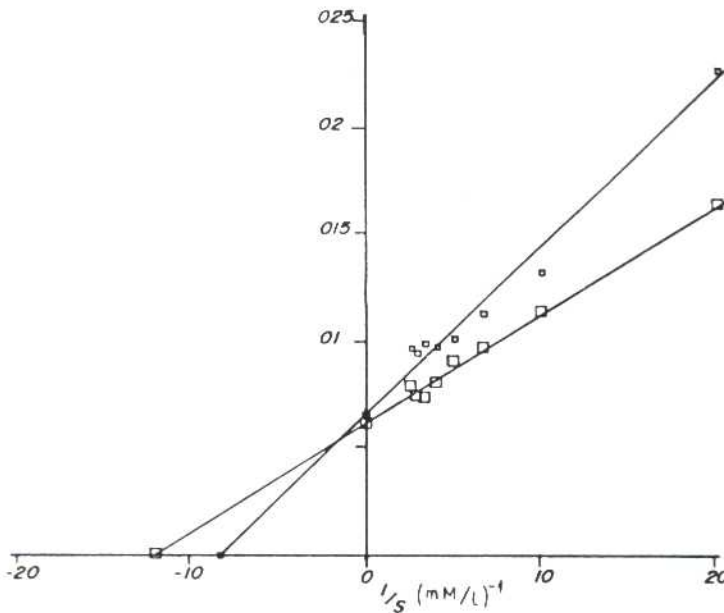


FIG. 1. Influencia de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática en el UME -T4

- Conjugado soluble
- Conjugado adsorbido

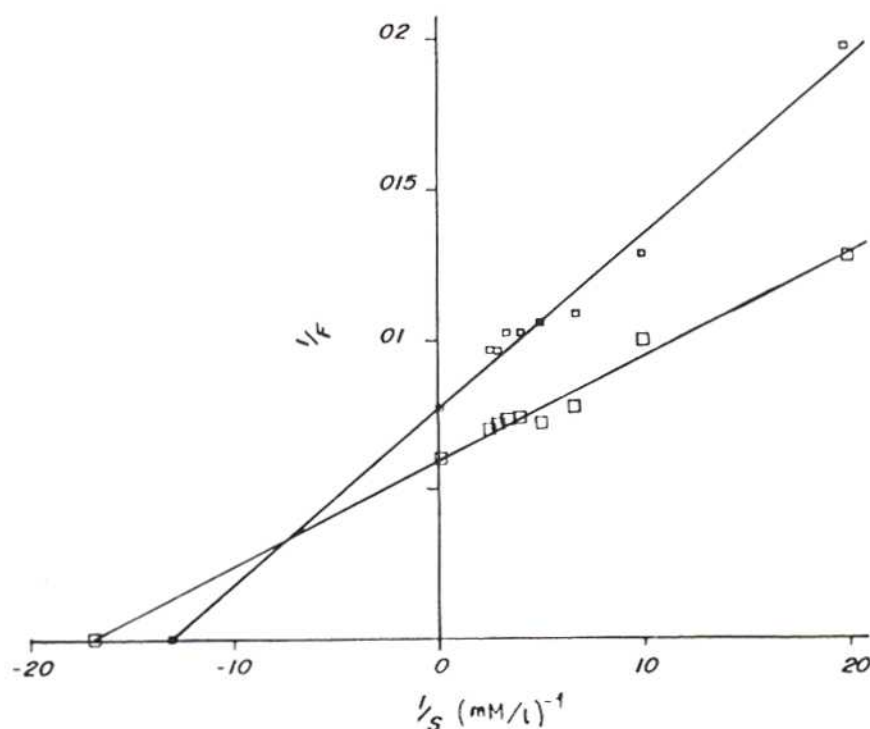


FIG. 2. Influencia de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática en el UME - IgM *M. leprae*.

- Conjugado soluble
 ◻ Conjugado adsorbido

Para el conjugado adsorbido en las placas de PVC recubiertas con BSA-antígeno sintético *M. leprae* la ecuación obtenida fue: $1/V_o = 0,000339 1/S + 0,005676$; $r = 0,980$, con una K_m aparente de $0,174 \text{ mM}$ y V_{max} de $4,337 \times 10^3 \text{ UA/min}$.

Conjugado beta galactosidasa - anti HBs Ag

El conjugado β galactosidasa-anti HBs Ag se emplea en un UME de tipo sandwich. En este sistema al conjugado soluble se le calculó una K_m aparente de $0,501 \text{ mM}$ y una V_{max} de $348,480 \times 10^3 \text{ UA/min}$. La ecuación de la recta obtenida (figura 3) fue: $1/V_o = 0,000973 1/S + 0,005739$; $r = 1,000$.

En el caso del conjugado adsorbido (figura 3), la K_m aparente calculada fue dos veces mayor ($1,032 \text{ mM}$) lo que sugiere que la enzima inmovilizada tiene una afinidad notablemente menor por el sustrato. La V_{max} calculada fue de $0,347 \times 10^3 \text{ UA/min}$, según la ecuación: $1/V_{max} = 0,003352 1/S + 0,009602$; $r = 0,982$.

En este tipo de UME se ajusta el recubrimiento (anticuerpos anti HBs Ag) de las placas de PVC para obtener la máxima captación del antígeno específico. Asimismo se utiliza una dilución de conjugado que revele con exactitud la cantidad del antígeno de las muestras adsorbido en la placa.

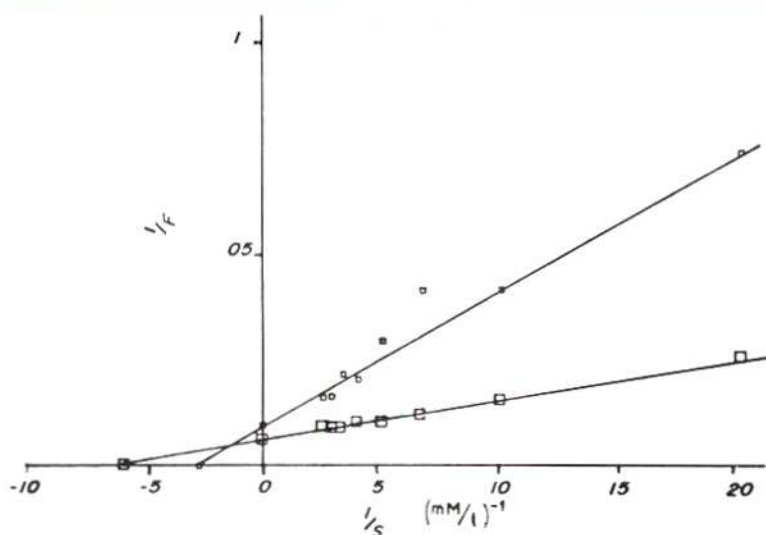


FIG. 3. Influencia de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática en el UME - HBs Ag.
□ Conjugado soluble
○ Conjugado adsorbido

Conjugado beta galactosidasa - anti CEA

En la figura 4 se muestran las rectas correspondientes al sistema de detección de CEA.

La ecuación de la recta obtenida para el conjugado soluble fue $1/V_0 = 0,000268 1/S + 0,009319$; $r = 1,000$.

Se obtuvo un valor de 0,085 mM para la K_m aparente y de $231,772 \times 10^3$ UA/min para la V_{max} calculada a partir de la ecuación: $1V_{max} = 0,000439 1/S + 0,005303$; $r = 0,990$.

Para el conjugado adsorbido la K_m aparente fue mayor (0,245 mM), con V_{max} de $5,656 \times 10^3$ UA/min.

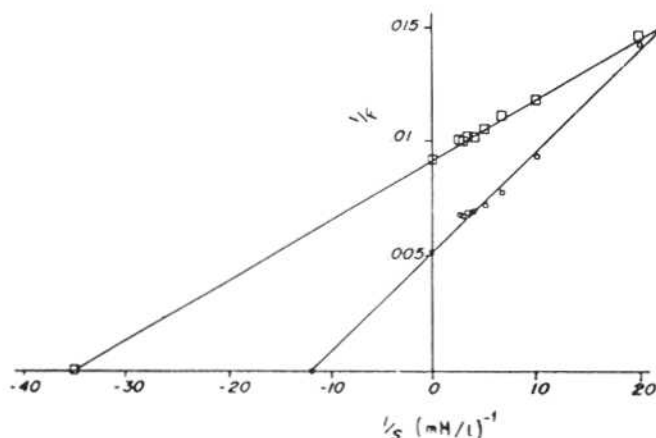


FIG. 4. Influencia de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática en el UME - CEA
□ Conjugado soluble
○ Conjugado adsorbido

Durante la conjugación de la β galactosidasa con los anticuerpos anti CEA mejoró la afinidad-sustrato, ya que la K_m aparente del conjugado soluble es menor que la K_m de la enzima libre.

Conjugado beta galactosidasa - anti AFP

El sistema de detección y cuantificación de AFP constituye también un UME tipo sandwich y en este se observan resultados similares en los cambios de la afinidad enzima-sustrato (figura 5). Para el conjugado soluble, la K_m aparente calculada fue de 0,208 mM, con V_{max} de $209,407 \times 10^3$ UA/min y la ecuación calculada fue de: $1/V_o = 0,000560 1/S + 0,007959$; $r = 1,000$.

En el caso del conjugado adsorbido la ecuación de la recta fue: $1/V_o = 0,000660 1/S + 0,003991$; $r = 0,990$.

La K_m aparente calculada fue 0,489 y V_{max} de $7,516 \times 10^3$ UA/min.

El éxito del montaje de los ensayos inmunoenzimáticos depende de muchos factores; entre ellos son relevantes la calidad de los anticuerpos (título, especificidad y pureza) y de los conjugados (título y especificidad). Para este último aspecto, el método de conjugación empleado tiene una gran influencia sobre los resultados.

Todos los conjugados evaluados en este trabajo fueron obtenidos por síntesis con glutaraldehído (Avrameas, 1969), por lo cual sus características presentan rasgos comunes en cuanto a los grupos químicos de la β galactosidasa involucrados en la unión con anticuerpos o hapteno, y en cuanto al espaciador molecular utilizado

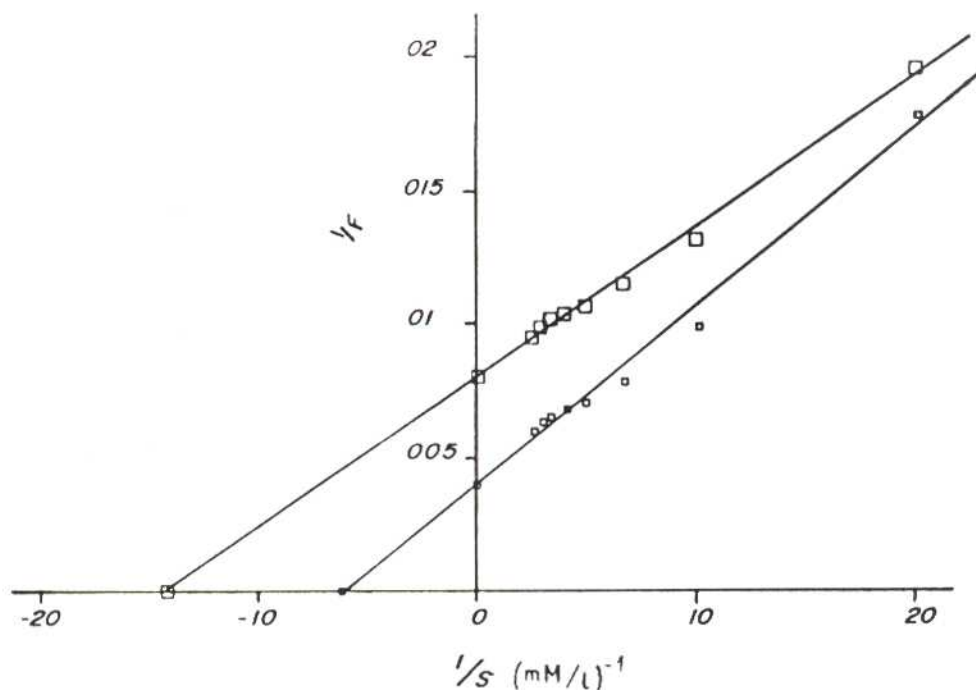


FIG. 5. Influencia de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática en el UME - AFP.

- Conjugado soluble
- ◻ Conjugado adsorbido

como puente químico, poliglutaraldehído. La reacción de los grupos poliméricos con los grupos amino de la enzima provoca la formación de enlaces etilénicos. Esto explica la gran estabilidad de los derivados obtenidos después de la reacción con el glutaraldehído (Monsan *et al.*, 1975).

La β galactosidasa recombinante de *E. coli* empleada presenta adecuadas características para el montaje de los UME. Esta enzima, con actividad específica entre 800 y 1 000 U/mg es aplicable para la conjugación con resultados satisfactorios.

La afinidad de la enzima libre por el 4-metil umberiferil β -D-galactopiranosido se afecta de diferente manera, en dependencia de la molécula que se acople a esta, y sobre todo, por el tipo de UME donde se aplique. Por lo general, la conjugación con glutaraldehído no provocó grandes cambios de la afinidad enzima-sustrato, sin embargo cuando se estudió la KM aparente de los conjugados adsorbidos se observaron diferencias entre los sistemas.

Diversos factores pueden afectar la afinidad enzima-sustrato, entre los cuales se encuentran los impedimentos estéricos, los fenómenos de difusión, la integridad del sitio catalítico, los cambios de polaridad o de hidrofobicidad alrededor del sitio catalítico, etc. (Durand y Monsan, 1982). Como resultado de la conjugación pueden producirse variaciones de estos factores con respecto a la enzima libre.

La enzima adsorbida a través de la unión del conjugado y el anticuerpo, representa una forma especial de inmovilización enzimática, en la cual ocurren fenómenos quimicofísicos que pueden influir sobre la reacción catalítica. Entre estos tienen gran importancia la orientación estereoespecífica del sitio catalítico y el impedimento estérico

de las propias moléculas participantes en la reacción conjugado-anticuerpo.

En el UME de T4 el aumento de la Km aparente fue pequeño, a diferencia de lo observado en los otros sistemas. Este ensayo competitivo fue ajustado para la obtención de la máxima sensibilidad a la mayor dilución de conjugado y la mínima concentración de recubrimiento, por lo cual el factor estérico no fue determinante, a causa de que se adsorbió poca cantidad de conjugado y la competencia se estableció con una molécula sumamente pequeña con relación a este.

En los ensayos restantes, por lo general el aumento de la Km aparente fue evidente; en estos casos la manifestación de la actividad enzimática fue afectada por el número de moléculas de conjugado adsorbidas a la compleja estructura molecular que se establece entre uno o más antígenos o anticuerpos y las moléculas proteicas específicas usadas en los recubrimientos y en los bloqueos de las placas. Generalmente, los procesos de inmovilización enzimática provocan disminución de la afinidad enzima-sustrato, aunque este hecho es imprevisible teóricamente (González *et al.*, 1988). El único caso donde no se observó este fenómeno fue en el UME para la determinación de lepra.

El aumento de la afinidad aparente de la enzima conjugada en el ensayo indirecto para la determinación de anticuerpos (IgM) anti *M. leprae* puede haber sido ocasionado por varios factores que determinan que el posible impedimento estérico de la molécula de IgM no sea el más importante.

Entre los factores particulares que favorecen la catálisis del conjugado adsorbido en este ensayo pudieran encontrarse: la mejor orientación del

hapteno sintético inmovilizado en la fase sólida, a causa de que se recubre con cantidades varias veces inferiores con relación a los otros sistemas, de manera que el anticuerpo se orienta también con mejor disposición y menor complejidad de estructura, y a su vez, el conjugado establece la unión con la IgM en condiciones más favorables. Así en este sistema, aunque no es competitivo, se recubre con mínima concentración de antígeno o molécula de "captura" y ocurre un fenómeno semejante al observado en el UME de T4, donde la Km prácticamente no varió.

Otro factor importante en este resultado puede ser la ausencia de bloqueo con BSA, a diferencia de lo obtenido con los otros ensayos. La BSA puede contribuir a que el medio químico alrededor del conjugado adsorbido cambie, disminuyendo en cierta medida la afinidad enzima-sustrato.

En este trabajo hemos estudiado el comportamiento cinético de la β galactosidasa conjugada. Las diferencias entre las Km aparentes en los UME pueden ser utilizadas en la interpretación de los complejos fenómenos moleculares que ocurren en los diferentes ensayos inmunoenzimáticos, así como en la estandarización de la síntesis de conjugados de β galactosidasa y en el montaje de los UME para el Sistema Ultramicroanalítico.

REFERENCIAS

- ARAKAWA, H.; M. MAEDA; A. TSUJI; S. ISHII; H. NARUSE y G. KLEINHAMMER (1982). Fluorophotometric enzyme immunoassay of thyroxine in dried blood samples on filter paper. *Bunseki Kagaku* 31: 55-61
- AVRAMEAS, J. (1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochem.* 6: 53-62.
- CHAN, S.W. y R.C. KO (1988). Comparison between standard ELISA and dot-ELISA for serodiagnosis of human trichinosis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Met. Hygien.* 82: 892-894.
- DURAND, G. y P. MONSAN (1982). *Les Enzymes: Production et utilisation industrielles.* Gauthiers Villars, París.
- GONZALEZ, R.R.; P. MONSAN; F. ESCALE y O. ROS (1988). Inmovilización covalente de beta galactosidasa del *A. fonsecaeus* sobre derivados celulósicos del maíz. *Inierferon y Biotecnología* 5: 237-244.
- GUELL, R.; R. ROBAINA; J.L. FERNANDEZ YERO; O. ARAUJO y M. AMAT (1988). "Screening for neonatal hypothyroidism: Ultramicroanalytic system (SUMA)". En: Libro Resúmenes 8th Intern. Congress Endocrinol. (Abstract 04-22045:174).
- KALLNER, A.; G. KALLNER; G. LUNDELL y H.E. SJOBERG (1987). Highly sensitive assays of serum-thyrotropin in the diagnosis of hyperthyroidism. Assessment of performance reference values. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 47: 157-164.
- LINWEAVER, H. y D. BURK (1934). Determination of enzyme dissociation constant. *J. Am. Chem. Soc.* 56: 658-664.
- MONSAN, P.; D. PUZO y H. MAZARGUIL (1975). Etude du mécanisme détablissement des liaisons glutaraldéhyde-protéines. *Biochimie* 57: 1281-1292.
- MORTENSEN, J.; S.L. NIELSEN; I. SORENSEN y H.K. ANDERSEN (1989). Specific serum immunoglobulin D detected by antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Cytomegalovirus infection 75: 234-236.
- NEUMAN, R.G. y M.P. COHEN (1989). Improved competitive enzyme linked immunoassay (ELISA) for albuminuria. *Clin. Chim. Acta* 179: 229-237.
- OELLERICH, M. (1984). Enzyme-Immunoassay: A review. *J. Clin. Biochem.* 22: 895-904.
- O'SULLIVAN, M.J.; E.GNEMMI; D. MORRIS; G. CHEREGATTI; A.D. SINMONDS; M. SIMMONS; J.W. BRIDGES y V. MARKS (1979). Comparison of two methods of preparing enzyme-antibody conjugates: Applications of these conjugates for enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.* 100: 100-108.
- TIJSSSEN, P. (1985). "Practice and theory of enzyme immunoassays". En: *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology.* Burdon, R.H. y Van Knippenberg, P.H. (Eds). Elsevier Science Publishers, B.V.
- WEERASEKERA, D.A.; J.B. KIM; G.J. BARNARD y W.P. COLLINS (1983). Measurement of serum thyroxine by solid phase chemiluminescence immunoassay. *Ann. Clin. Biochem.* 20: 100-104.