

ULTRAMICROANÁLISIS PARA LA CUANTIFICACION DE ANTIGENO CARCINOEMBRIÓNARIO EN SUERO.

Alvaro Velandia¹, Gilda Núñez² y René Robaina³

¹Instituto Nacional de Salud, Santa Fé de Bogotá, Colombia. Avenida Eldorado, carrera 50, zona 6, Apartado aéreo 80080, Santa Fé de Bogotá, D.C. Colombia. ²Centro de Inmunología Molecular, 216 y 15, Reparto Atabey, Ciudad de la Habana, Cuba. ³Centro de Inmunoensayo, Ciudad de La Habana, Cuba. ave. 25 y 146, Reparto Cubanacán, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido en diciembre de 1993. Aprobado en enero de 1995.

Key words: EIA, colorectal cancer, CEA.

SUMMARY

An ultramicroELISA (*sandwich*) system, using both, monoclonal and polyclonal antibodies against Carcinoembryonic antigen (CEA), was developed. The lowest detection limit of the assay is 600 pg/mL of CEA in human serum and has 3 incubation steps which can be performed in two days. Polyvinylchloride plates coated with monoclonal antibody ior-CEA1 specific against CEA are first incubated with human serum samples. Bound CEA is detected by addition of polyclonal antibodies raised in sheep labeled with β -Galactosidase. The developed colour is proportional to the amount of CEA present in samples. Some features of the system like intra and interassay variation (5.7% and 9.4% variation coefficients respectively), dilution studies and parallelism test, system accuracy (105% recovery) are reported. An optimal correlation ($r=0.9892$) was found by comparison of our system with a CEA ENZELSA kit developed by CIS (CIS, Gif-Sur-Yvette, France). Also, our standard curve was compared with the standard of the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, London, England), showing very similar behaviour. Samples of normal adult population ($n=14\ 459$) presented a mean value of 3 ng/mL of CEA while 21 colon cancer samples shown a mean values of 59 ng/mL.

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta el desarrollo de un ultramicroELISA tipo *sandwich* utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales dirigidos contra el antígeno carcinoembrionario (CEA). El límite de detección del ensayo es de 600 pg/mL de CEA en suero humano y tiene tres pasos de incubación que pueden realizarse en dos días. El anticuerpo monoclonal ior-CEA1 específico para este antígeno se utiliza como anticuerpo de recubrimiento en placas de polivinilo, a las que se añaden posteriormente las muestras de suero humano. El CEA unido se detecta añadiendo anticuerpos policlonales anti CEA obtenidos en carnero y marcados con β -galactosidasa. El color desarrollado es proporcional a la cantidad de CEA presente en las muestras. Se reportan algunas características del ensayo como son variación intra (5.7%) e interensayo (9.4%), estudios de dilución, prueba de paralelismo y exactitud (105% de recobrado). Un coeficiente de correlación $r=0.9892$ fue hallado al comparar el presente sistema con el ensayo ENZELSA para la cuantificación de CEA de la compañía CIS (Gif-Sur-Yvette, Francia). Además, la curva de calibración fue comparada con el patrón del Instituto Nacional de Patrones Biológicos y Control (NIBSC, Londres, Inglaterra), mostrando un comportamiento muy similar. Se ensayaron muestras provenientes de

población normal adulta ($n=14\ 459$) obteniéndose un valor promedio de 3 ng/mL. Para el grupo de pacientes con cáncer de colon y recto ($n=21$) el valor medio fue de 59 ng/mL.

INTRODUCCION

El CEA (antígeno carcinoembrionario) es una glicoproteína asociada a tumores del tracto gastrointestinal que fue descrita por Gold y Freedman en 1965 y cuya utilidad clínica ha sido demostrada en el manejo de los pacientes con cáncer colorrectal, mamario, pulmonar y pancreático (Lokich *et al.*, 1978; Falkson *et al.*, 1982; Wanebo *et al.*, 1983). El incremento persistente de este marcador está asociado a la presencia de la enfermedad residual o de metástasis ocultas, así como a la progresión de la enfermedad y a la ausencia de una respuesta adecuada al tratamiento (Martin *et al.*, 1977).

Algunos investigadores han sugerido que es posible usar los niveles séricos pre-operatorios de CEA como un marcador pronóstico de la respuesta a la resección quirúrgica del tumor (Staab *et al.*, 1981); mientras que otros autores consideran que un incremento post-operatorio de los niveles séricos del CEA puede ser por sí solo suficiente para la búsqueda de metástasis ocultas remanentes (Fantini y De-Cosse, 1990).

Para la cuantificación del CEA se han desarrollado métodos de base inmunológica entre los que se incluyen el radioinmunoensayo y ensayos inmunoenzimáticos de fase sólida (Carneiro *et al.*, 1987; Lynch *et al.*, 1988), actualmente disponibles en el mercado. El desarrollo de la tecnología de anticuerpos monoclonales (Kohler y Milstein, 1975) ofrece la posibilidad de disponer de reactivos altamente específicos para el CEA, cuestión de fundamental importancia si tenemos en cuenta que este antígeno pertenece a una familia de moléculas que presentan

entre sí patrones similares de identidad inmunoquímica y reacciones cruzadas, como por ejemplo, el NCA o antígeno no específico de reacción cruzada, (Mach y Pusztaszeri, 1972).

En el presente trabajo se describe la normalización de un ultramicroELISA (UME) para la cuantificación de CEA en suero humano con la utilización del anticuerpo monoclonal (AcM) ior-CEA1 que reconoce un epítipo expresado solamente en el CEA y se analizan algunas características del sistema como la variación intra e inter-ensayo, exactitud, estudios de dilución y la comparación con el ensayo comercial (ENZELSA) de la casa CIS (Gif-Sur-Yvette) y con el patrón de CEA del Instituto Nacional de Patrones Biológicos y Control (NIBSC, Londres, Inglaterra; Laurence *et al.*, 1975).

MATERIALES Y METODOS

Antígeno

El antígeno utilizado para las inmunizaciones de carneros con vistas a la obtención de los antisueros policlonales, fue purificado por el método descrito por Krupcy *et al.*, en 1972, a partir de metástasis hepáticas de tumor primario de colon. El nivel de pureza fue evaluado por electroforesis en geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970) al 7.5%, en presencia de dodecil sulfato de sodio.

Antisueros policlonales

Se obtuvieron en carnero mediante inmunizaciones con CEA purificado, según el esquema descrito por Lamerz y Burtin en 1983. El título o potencia de los antisueros fue evaluado por inmunodifusión doble bidimensional (Ouchterlony y Nielsson, 1978), frente a extracto de metástasis rico en CEA.

Con el objetivo de eliminar posibles reacciones cruzadas de los antisueros con moléculas relacionadas con CEA, los mismos fueron incubados con adsorbentes preparados por polimerización de extractos obtenidos por homogenización de diferentes órganos normales: colon, pulmón, bazo, hígado y riñón. Los extractos fueron preparados según una proporción 1:3 (g/mL) del órgano y agua destilada, seguido de homogenización en Polytron a 10 000 rpm durante 10 minutos. Después se centrifugaron a 5 000 rpm, 10 min a 4°C el sobrenadante fue polimerizado por adición lenta de glutaraldehído grado I (Sigma, St. Louis, USA) para un por ciento final de 0.06, según el método reportado por Avrameas y Ternynck en 1969.

El mismo método fue utilizado para preparar un inmunoadsorbente de suero humano, en este caso polimerizando directamente la mezcla de sueros humanos proveniente de donantes normales con glutaraldehído al porcentaje antes señalado. Al antisuero adsorbido se le probó su especificidad por inmunodifusión doble (Ouchterlony y Nielsson, 1978), frente a los extractos de órganos normales y suero humano. Los anticuerpos policlonales se purificaron por cromatografía de afinidad con CEA acoplado a AH-Sefarosa según las instrucciones del fabricante (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suecia). Los anticuerpos anti-CEA monoespecíficos purificados de esta forma se acoplaron a la enzima β -galactosidasa (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB, Habana, Cuba) por la técnica del glutaraldehído en un paso (Avrameas, 1968), con el objetivo de obtener el conjugado de revelado del sistema.

Purificación del AcM ior-CEA1

El hibridoma productor obtenido según lo descrito por Tormo *et al.*, en 1989, se inyectó peritonealmente en ratones Balb/c pre-inoculados con aceite mineral, y el fluido ascítico, después de clarificado y delipidizado por ultracentrifugación a 32 000 rpm, 4°C durante 1 h, se purificó por cromatografía de afinidad en proteína A-Sefarosa según recomendaciones del fabricante (Pharmacia-LKB, Uppsala, Suecia). Después de la purificación la fracción recogida se dializó contra tampón salino-fosfato (PBS), 0.15 mol/L, pH 7.2 y la pureza se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida, empleando dodecil sulfato de sodio y condiciones de no reducción, (Laemmli, 1970).

Preparación del patrón, suero control y muestras

Una mezcla de suero humano normal enriquecido con CEA purificado, fue diluido con una cantidad apropiada de suero humano normal negativo para CEA hasta una concentración de 100 ng/mL. La curva de calibración tuvo cinco puntos, estos fueron: 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL 12.5 ng/mL y 6.25 ng/mL, obtenidos por diluciones dobles seriadas del punto de más alta concentración (100 ng/mL).

El control se preparó con el mismo suero utilizado para el patrón, pero en este caso ajustado a una concentración aproximada de 20 ng/mL. La solución diluyente para muestras, patrón y control fue PBS 0.15 mol/L, 0.05% Tween 20 y suero de carnero al 5%. Las muestras se ensayaron a una dilución 1:2 con solución diluyente.

Ensayo inmunoenzimático

El ensayo se realiza por técnicas de ultramicroanálisis (Horn *et al.*, 1981). El UME para la cuantificación de CEA fue diseñado como un sistema ELISA tipo *sandwich*, con el anticuerpo monoclonal ior-CEA1 como anticuerpo de captura y anticuerpos policlonales monoespecíficos unidos a la enzima β -galactosidasa. El procedimiento básicamente consiste en lo siguiente: se adsorbe 10 μ L/pozo del anticuerpo monoclonal ior-CEA1 a una concentración de 15 μ g/mL en ultramicroplacas de cloruro de polivinilo en condiciones de alcalinidad en tampón carbonato/bicarbonato 0.1 mol/L pH 9.6 a 37°C durante 4 h en cámara húmeda. Después de lavar con tampón fosfato-salino (PBS) 0.15 mol/L con 0.05% de Tween 20, (solución de lavado); se añade 10 μ L por pocillo de diluciones seriadas del patrón, control y muestras diluidas 1:2 en solución diluyente y se incuban durante 18 h a 4°C en cámara húmeda. Pasado este tiempo, las placas se lavan de nuevo y se incuban con el conjugado de anticuerpos policlonales monoespecíficos anti-CEA / β -galactosidasa 4 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lava el exceso de conjugado y se revela con 10 μ L por pocillo de una solución de 4-metilumbeliferil β -D galactopiranosido (Koch-Light, North Mymms, Inglaterra), sustrato fluorogénico para la β -galactosidasa, 0.26 mg disueltos en 20 mL de tampón Tris-HCl 0.015 mol/L pH 7.8, al cual se le ha adicionado dimetil sulfoxido para una concentración final de 5% (v/v). La reacción se incuba durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda y se detiene mediante la transferencia del contenido de los pocillos a las placas de lectura, con ayuda de una multipipeta automática de 96 posiciones, evaluándose los valores de fluorescencia en un rango de 450-529 nm, con ayuda del fluorímetro SUMA.

Parámetros de calidad del UME-CEA

Para evaluar las características del sistema se analizaron los parámetros siguientes:

a) *Concentración mínima detectable*: Se determinó de acuerdo a Llano *et al.*, en 1989.

b) *Precisión del sistema:* La variación intraensayo fue comprobada ensayando tres mezclas de suero humano con concentraciones que estuvieron en el rango de la curva patrón, probándose seis réplicas de cada mezcla en seis placas diarias. La variación interensayo recogió la información de las seis placas diarias durante cinco días.

El coeficiente de variación (CV%) se determinó para estimar la variación estadística de la media de las réplicas, (Snedecor y Cochran, 1980).

c) *Estudios de dilución:* Para la prueba de paralelismo se seleccionó una mezcla de sueros normales y se añadió CEA para una concentración de 100 ng/mL, denominándose patrón secundario. También se seleccionó un suero patológico con una concentración cercana al punto máximo de la curva, denominándose patrón terciario. Se diluyen estas soluciones patrones con solución diluyente de forma seriada, midiéndose sus valores de concentración y comparándolos con el patrón primario en uso. El rango analítico de la curva dosis respuesta de cada patrón fue linealizado siguiendo el método sugerido por Smith *et al.*, en 1987. La linealidad fue comprobada por regresión lineal y el coeficiente de correlación para cada línea fue calculado. El paralelismo fue comprobado por el método de X² descrito por Acevedo *et al.*, en 1980.

d) *Exactitud:* Se analizó el recobrado, seleccionándose para ello una mezcla de sueros normales y se le determinó la concentración de CEA. A esta mezcla se añadieron seis cantidades crecientes de CEA, reevaluándose su concentración. El recobrado fue analizado por medio de la fórmula: valor medido + cantidad añadida = valor teórico, entonces (valor medido/valor teórico)100 = % de recobrado).

e) *Especificidad del sistema UME-CEA:* Se realizó con el objetivo de verificar si el sistema reconoce la presencia de antígenos que posean reacción cruzada con CEA en diferentes órganos normales (colon, pulmón, bazo, hígado, riñón). A los extractos obtenidos de la homogeneización de estos órganos, según lo descrito previamente, se les determinó concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y fueron ensayados en el sistema a las concentraciones siguientes: 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL, 0.5 µg/mL, 0.2 µg/mL y 0.06 µg/mL.

f) *Comparación con un ensayo comercial y con un patrón internacional de CEA:* Se analizaron 31 muestras de suero por medio del sistema aquí descrito y el ensayo que vende la casa CIS, calculándose el coeficiente de correlación de Pearson. Asimismo, la curva patrón del sistema se comparó con el patrón 2/22J del NIBSC.

Se ensayaron 14 459 muestras de suero de población aparentemente normal y 21 muestras de suero de pacientes con cáncer de colon por medio del sistema UME-CEA.

RESULTADOS Y DISCUSION

La purificación del antígeno para su uso en las inmunizaciones y en la confección del patrón, mostró una banda simple de peso molecular aparente de 180 000 Da al ser analizado por electroforesis en geles de poli-acrilamida con dodecil sulfato de sodio.

El antisuero anti-CEA obtenido en carnero después de adsorbido con diferentes inmunoabsorbentes preparados a partir de extractos de órganos normales y de suero humano normal, no mostró reactividad cruzada apreciable al ser analizado por inmunodifusión doble bidimensional.

Tabla 1

Precisión del sistema UME-CEA sérico evaluada por medio del coeficiente de variación intraensayo. C:concentración, CV:coeficiente de variación.

Dias		Muestras		
		A	B	C
1	C (ng/mL)	62.03	48.74	24.15
	CV%	5.03	4.56	4.88
2	C (ng/mL)	76.14	51.22	28.84
	CV%	3.52	5.16	9.54
3	C (ng/mL)	63.2	42.93	24.56
	CV%	6.02	4.15	8.43
4	C (ng/mL)	64.03	44.48	24.83
	CV%	5.45	7.02	8.68
5	C (ng/mL)	76.97	48.36	27.83
	CV%	4.37	3.95	5.48

La concentración óptima de recubrimiento del anticuerpo monoclonal anti-CEA usado en el ultramicroELISA, fue de 15 µg/mL y la dilución de conjugado escogida fue de 1:4 000. El rango de la curva se extiende desde 100 ng/mL a 6,25 ng/mL con un límite mínimo de detección de 600 pg/mL (p<0,01); esto permite trabajar con muestras patológicas sin necesidad de diluciones extremas. El coeficiente de variación intraensayo, (tabla 1) medido para tres concentraciones diferentes y el coeficiente de variación interensayo (tabla 2) no sobrepasaron el 10%, como se recomienda para este tipo de técnica.

Tabla 2

Precisión del sistema UME-CEA sérico evaluada por medio del coeficiente de variación interensayo. SD:Desviación estándar.

	Concentración de CEA en suero (ng/mL)		
	A	B	C
Media	68.53	47.15	26.04
S.D.	7.38	3.83	2.75
C.V.%	10.2	8.1	10.1

La prueba de paralelismo y de dilución de las soluciones patrones probadas mostró un comportamiento similar en el rango de medición evaluado (figura 1). Estas pruebas exhibieron un coeficiente de correlación promedio de 0.9978.

El promedio calculado de X^2 para evaluar paralelismo fue de 0.098 y no se hallaron diferencias significativas entre las soluciones estándares evaluadas para un nivel de significación del 5%.

El sistema no parece reconocer de forma apreciable moléculas relacionadas al CEA (antígenos de reacción cruzada), al ser cuantificados extractos de diferentes órganos normales; esto es consecuencia del pobre reconocimiento del monoclonal ior-CEA1 por antígenos asociados al CEA (Tormo et al., 1989) y de la especificidad lograda por las adsorciones del anticuerpo policlonal con extractos de órganos normales. Se encuentran 1,2 µg/g de CEA en colon normal, lo que es congruente con reportes que describen la presencia del CEA en este órgano (Egan et al., 1977). Dos de las mayores fuentes de NCA o antígeno no específico de reacción cruzada, como son el pulmón y el bazo (Mach y Pusztaszeri, 1972), exhibieron valores despreciables de CEA al ser analizados por el sistema; lo mismo ocurrió en el hígado y el riñón.

El recobrado del sistema UME-CEA para seis concentraciones de antígeno se ubica dentro de los límites aceptados que son de un 90% a un 110%, puesto que el valor promedio del recobrado fue de 105% (tabla 3).

El análisis de correlación simple de una muestra de 31 sueros evaluados por el sistema UME-CEA y el ensayo comercial de la casa CIS mostraron un coeficiente de Pearson de 0,9892, con pendiente de 0,987 e inter-

Tabla 3
Resultados del recobrado del sistema UME-CEA sérico

	Cantidad añadida (ng/mL)	Valor medido (ng/mL)	Valor teórico (ng/mL)	Porcentaje de recuperación (%)
A	12	23.8	20	119
B	22	33	30	110
C	32	46.1	40	115.3
D	42	50	50	100
E	52	60	60	100
F	72	70.8	80	88.5

cepto de 0,834 (figura 2), indicando con ello que las mediciones en ambos sistemas son similares. La figura 3 muestra la curva patrón típica para el sistema, y además las curvas obtenidas para el patrón 2/22J del NIBSC y el patrón de la casa comercial CIS, comprobándose que poseen un comportamiento muy similar.

La media de la concentración de CEA de una muestra de 14 459 personas sanas evaluadas por el UME-CEA fue de 3 ng/mL, similar a las reportadas por otros autores (Go y Zamcheck, 1976), pero inferior a la media de 16 ng/mL encontrada para una muestra de población cubana analizada por técnicas de radioinmunoensayo

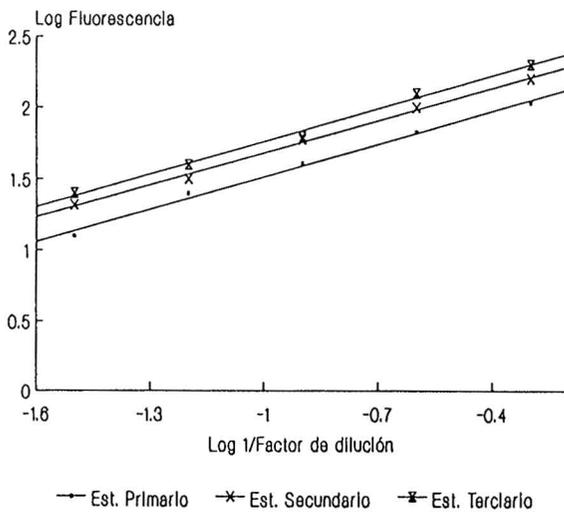


Fig.1 Prueba de paralelismo y lineabilidad. Est: estándar.

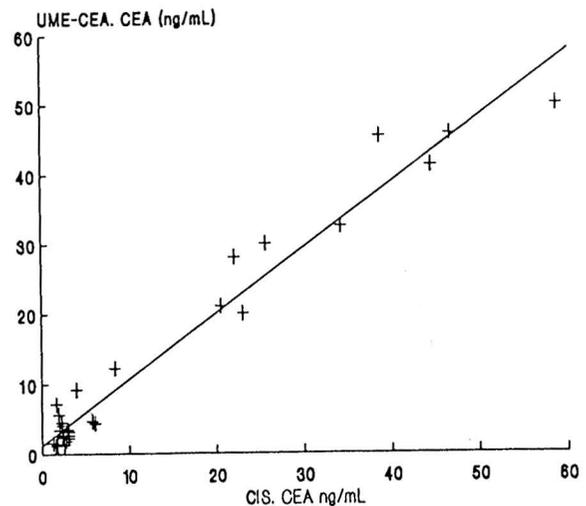


Fig.2 Gráfico obtenido al procesar los resultados de las muestras analizadas por el sistema UME-CEA y el ensayo comercial de la casa CIS.

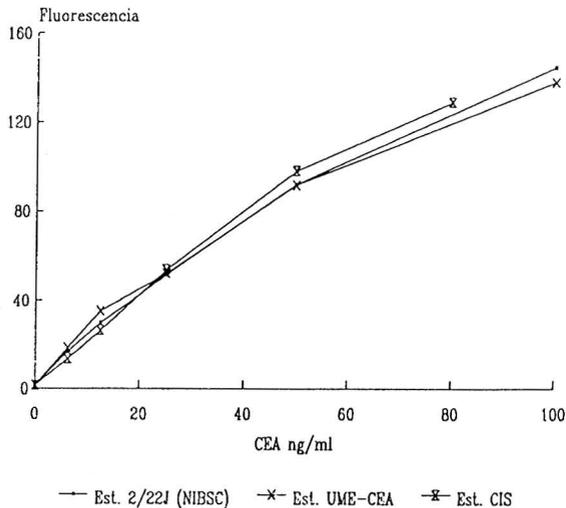


Fig. 3 Curva patrón del sistema UME-CEA sérico, curva patrón del sistema comercial CIS, y patrón 2/22J del NIBSC.

(Fong *et al.*, 1982). Esto pudiera ser explicado sobre la base de las diferencias atribuibles al método de medición, a la fracción antigénica o al sistema de captura utilizado (Kuroki, *et al.*, 1983; Hedin, 1982). El valor promedio de CEA en las muestras de pacientes de cáncer de colon y recto fue de 59 ng/mL y de forma general se observó un incremento del nivel del antígeno de los sueros de pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad.

El sistema propuesto es el primer ultramicroanálisis descrito para la cuantificación de CEA que utiliza un volumen total de reacción de 10 μ L, diseñado de acuerdo con la tecnología SUMA, automatizado, y que por sus parámetros de calidad puede ser utilizado de rutina para medir CEA de forma confiable.

REFERENCIAS

- ACEVEDO, G., J. MARTUSCELLI, J. KUMATE, M. RUIZ, R. ORTEGA, M. LIEBERMAN (1980). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Quinta edición. Secretaría de Salud, México, p. 388.
- AVRAMEAS, S. (1968). Detection d' anticorps et d' antigènes à l'aide d' enzymes. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**: 1169.
- AVRAMEAS, S. and T. H. TERNYNCK (1969). The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunosorbents. *Immunochemistry* **6**: 53-66.
- CARNEIRO, C. R., J. D. LOPES and M. M. BRENTANI (1987). Carcinoembryonic antigen (CEA): Production of immunoprecipitating monoclonal antibodies and development of an enzyme immunoassay. *Hybridoma*. **6** (6): 689-692.
- EGAN M. L., D. G. PRITCHARD, C. W. TODD, V. L. and W. GO (1977). Isolation and immunochemical and chemical characterization of carcinoembryonic antigen-like substances in colon lavages of healthy individuals. *Cancer Res.* **37**:2638.
- FALKSON, H. C., G. FALKSON and M. A. PORTUGAL (1982). Carcinoembryonic antigen as marker in patients with breast cancer receiving postsurgical adjuvant chemotherapy. *Cancer* **49**: 1859-1865.
- FANTINI, G. A. and J. J. DeCOSSE (1990). Surveillance strategies after resection of carcinoma of the colon and rectum. *Surg. Gynecol. Obstet.* **171**: 267-273.
- FONG, S., M. BETANCOURT, H. COSTA y S. MOROZ (1982). The radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen fraction. *Neoplasma* **29**: 1-5.
- GO, V. L. W. and J. ZAMCHECK (1976). The role of tumor markers in the management of colorectal cancer. *Cancer* **30** (supp): 2618-2623.
- GOLD, P. and S. O. FREEDMAN (1965). Demonstration of tumour specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. *J. Exp. Med.* **121**: 439-462.
- HEDIN, A. (1982). Monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen and their use in tumour diagnosis. A dissertation for the doctor's degree in Natural Science: University of Stockholm, 1982.
- HORN, A., J. L. FERNANDEZ YERO y M. SCHULSE (1981). ultramicroELISA for alphafeto protein with the chamber analytical technique. *J.Cli. Chem. Cli. Biochem.* **19**: 702-705.
- KOHLER, M. y C. MILSTEIN (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. **256**, 495.
- KRUPEY, J., T. WILSON, S. O. FREEDMAN, P. GOLD (1972). The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue. *Immunochemistry* **9**: 617-622.
- KUROKI, M., A. YAMAGUCHI, Y. KOGA y Y. MATSUOKA (1983). Antigenic reactivities of purified preparations of carcinoembryonic antigen (CEA) and related normal antigens using four different radioimmunoassay systems for CEA. *J. Immunol. Methods* **60**: 221-233.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- LAMERZ, R. and P. BURTIN (1983). Immunological comparison of carcinoembryonic antigen (CEA) extracted from tumor of various organs. *Br. J. Cancer* **47**: 823-832.
- LAURENCE, D. J. R., C. TURBERVILLE, S. G. ANDERSON, and M. NEVILLE (1975). First british standard for carcinoembryonic antigen (CEA). *Br. J. Cancer* **32**: 295-299.
- LLANO, M., E. CARPIO, R. ROSQUETE, R. SOLIS, M. GONZALEZ y J. GAVILONDO (1989). Ensayo diagnóstico para IgE humana por ultramicroELISA empleando anticuerpos monoclonales. *Interferón y Biotecnología*, **6**(2): 163-170.
- LOKICH, J. H., N. ZAMCHECK and M. LOWENSTEIN (1978). Sequential carcinoembryonic antigen levels in the therapy of metastatic breast cancer. *Ann. Intern. Med.* **89**: 102-106.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. K. RANDALL (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
- LYNCH, D., J. BRIGGMAN, K. BORDEN, H. FRITSCHKE and A. MALKIN (1988). An enzyme immunoassay for carcinoembryonic antigen wich employs simultaneous incubation of specimen with solid phase and enzyme-conjugated antibodies. *Tumor Biol.* **9**: 270-280.

- MACH J-P. and G. PUSZTASZERI (1972). Demonstration of a partial identity between CEA and a normal glycoprotein. *Immunochemistry* 9: 1031-1034.
- MARTIN, E. W., K. K. JAMES, P. E. HURTUBISE, P. CATLANO y J. P. MINTON (1977). The use of CEA as an early indicator for gastrointestinal tumor recurrence and second look procedures. *Cancer* 39: 440-446.
- OUCHTERLONY, O. y L. A. NIELSSON (1978). "Immunodifusion and immunoelectrophoresis", *Handbook of experimental Immunology*. Ed. D. M. Weir. Blackwell Scientific Publications. Oxford. London, Edinburg, Melbourne, p. 196.
- SMITH, S. J., G. R. COOPER, L. O. HENDERSON and W. H. HANNON (1987). International collaborative standardization of apolipoproteins A-1 and B. Part I. Evaluation of a liophilized candidate reference and calibration material. *Clin. Chem.* 33: 240.
- SNEDECOR, G. W. and W. G. COCHRAN (1980). *Statistical methods*, 7th edition. Iowa State University Press. Iowa.
- STAAB, H. J., F. A. ANDERER and T. BRUMENDORF (1981). Pronostic value of preoperative serum CEA level compared to clinical staging in colorectal carcinoma. *Br. J. Cancer* 44: 652-657.
- TORMO, B. R., J. V. GAVILONDO, C. DOMINGUEZ, M. FREYRE, T. RODRIGUEZ and P. BIBERFELD (1989). CEA in colonic adenocarcinomas and precancerous lesions. An immunohistochemical study with a novel monoclonal antibody. *APMIS* 97: 1073-1080.
- WANEBO, H. H., B. RAO, and C. M. PINSKY (1983). Preoperative carcinoembryonic antigen level as a prognostic indicator in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 299: 448-451.