

# Enzimoimmunoanálisis de alta especificidad y sensibilidad para la determinación de prolaminas tóxicas en alimentos para celíacos\*

M.C. Molina, G. Salinas y A. Nieto

Cátedra de Inmunología. Facultad de Química. Universidad de la República. Montevideo. Uruguay.

Se diseñó un ELISA-inhibición para calcular los títulos de prolaminas de trigo, avena, cebada y centeno (TACC) inmovilizando las prolaminas de esos cereales, haciéndolas reaccionar con un antisuero anti gliadina e inhibiendo esa reacción con soluciones de las diferentes prolaminas. Se realizaron ensayos de titulación de gliadina utilizando las diferentes prolaminas de avena, cebada y centeno (ACC) inmovilizadas para seleccionar la que genera la máxima sensibilidad en esta técnica. Los resultados de este experimento muestran que en todos los casos el 50 % de inhibición se observó con soluciones de gliadina de concentración menor que 4 µg/ml. Cuando la prolamina inmovilizada era la de avena este nivel de inhibición se logró con una concentración de 780 ng/ml de gliadina. Comparando este resultado con el obtenido utilizando gliadina inmovilizada en el mismo ensayo (8,5 µg/ml), se observa que la sensibilidad aumenta 10 veces al cambiar la gliadina por la prolamina de avena en la fase sólida.

También se calcularon con esta técnica los títulos de las prolaminas de ACC, utilizando estas proteínas en fase sólida. Los resultados mostraron un máximo de sensibilidad cuando se usó la misma proteína en solución y en fase sólida, observándose en esas condiciones que el 50 % de inhibición para las prolaminas de ACC se obtiene con 24 µg/ml, 32 µg/ml y 40 µg/ml, respectivamente. Usando gliadina inmovilizada e inhibiendo la reacción con las prolaminas de avena, cebada y centeno, no se observó ninguna inhibición con 24 µg/ml de cualquiera de estas proteínas.

En este trabajo se describe un nuevo diseño experimental del ELISA-inhibición para la detección de prolaminas de TACC que permite incrementar notoriamente la sensibilidad y especificidad del análisis, valiéndose de las diferencias relativas de avidéz de un antisuero anti gliadina frente a las diferentes prolaminas alimentarias.

## High sensitive and specific enzymeimmunoassay for quantification of toxic prolaminas in food for coeliac patients

An inhibition-ELISA was designed to titrate oats, rye, barley and wheat prolaminas. Prolaminas were immobilized and their reaction with an anti gliadin polyclonal antiserum

was inhibited with solutions of each different prolamine. Gliadin was titrated using each of the other three immobilized prolaminas to select the one that generated the maximum sensitivity with this technique. The results showed that in all cases 50 % inhibition was observed with less than 4 µg/ml gliadin solutions. When immobilized oats prolamine was used, 50 % inhibition was observed with a 780 ng/ml gliadin solution. Comparison of this result with that obtained with immobilized gliadin (8,5 µg/ml), shows a tenfold increase in sensitivity using oats prolamine instead of gliadin in the solid phase.

The oats, rye and barley prolaminas were titrated by this technique using each of these prolaminas in solid phase. The results showed that maximum sensitivity was obtained when the same prolamine is used in both phases. In these cases 50 % inhibition was observed with 24 µg/ml, 32 µg/ml and 40 µg/ml of oats, rye and barley prolaminas respectively. Using immobilized gliadin, it was not possible to obtain any inhibition using solutions of any other prolaminas up to a concentration of 24 µg/ml.

We report here a new experimental design of inhibition-ELISA to detect oats, barley rye and wheat prolaminas that increases significantly both sensitivity and specificity of the assay, taking profit of the difference in relative avidity of anti gliadin antibodies with the different prolaminas.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca es una intolerancia permanente a las prolaminas de TACC que constituyen la fracción proteica soluble en etanol al 70 % del gluten de estos cereales<sup>1</sup>.

La existencia de estas proteínas en la dieta de enfermos celíacos (EC) provoca cambios a nivel de la mucosa del intestino delgado tales como atrofia de las vellosidades intestinales e infiltración linfocitaria, paralelamente a la aparición de un síndrome malabsortivo. Este daño es revertido por una dieta libre de gluten con lo que el intestino se vuelve estructuralmente normal y la absorción de alimentos es restaurada<sup>2,3</sup>.

Los alimentos libres de gluten son esenciales para los enfermos celíacos ya que trazas de estas proteínas pueden provocar recaída en pacientes tratados<sup>2,4</sup> ya que la ingesta de gluten para estos enfermos puede asociar complicaciones mayores que la deficiencia nutricional, tales como enfermedades neoplásicas, linfomas, tumores de intestino delgado, etc.<sup>2,5,6</sup>.

Todo esto hace necesario contar con técnicas sensibles y específicas que permitan determinar si un alimento está exento de gluten. Éstas son aún más necesarias en países subdesarrollados donde no se cuenta en

Correspondencia y solicitud de separatas: A. Nieto. Cátedra de Inmunología. Facultad de Química. Gral. Flores 2124. -P. 11800 Montevideo, Uruguay.

\* Este trabajo ha sido financiado con fondos de la Agencia Sueca para Investigación y Cooperación (SAREC), de la Fundación Internacional para la Ciencia (IFS; Grant B/1.038-2), de la Comunidad Económica Europea (Grant CII.0120.U [h]), del Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PNUD, Project URU/84/002) y de la Universidad de la República.

el mercado con alimentos específicos para el consumo de EC. Un alimento se considera exento de gluten cuando el contenido de estas proteínas no excede de 1 mg/100 g de producto seco<sup>7</sup>. La técnica de referencia aconsejada por la OMS para el control de estos alimentos es el sandwich-ELISA, cuyo límite de detección es de 15 mg/g de producto seco<sup>7</sup>. Freedman et al<sup>8</sup>, utilizando anticuerpos monoclonales antigliadina, han detectado 15 ng/ml de gliadina, por sandwich-ELISA, pero la sensibilidad de este análisis es mucho menor para las prolaminas de avena, cebada y centeno. Resultados similares han obtenido Troncone et al<sup>1</sup> con la misma técnica, pero utilizando un antisuero policlonal antigliadina. En un ELISA-inhibición estos autores describen la inhibición del 50 % de la reacción con 312 ng/ml de gliadina en solución<sup>1</sup>. Otras técnicas como el radioinmunoanálisis (RIA)<sup>9</sup> han sido ensayadas para la detección de prolaminas, pero presentan el mismo problema de la baja sensibilidad para las prolaminas de ACC.

En este trabajo se describe un ELISA-inhibición que hace uso de las diferentes prolaminas inmovilizadas para diferenciar las prolaminas de TACC entre sí y de proteínas no tóxicas, permitiendo identificar el cereal contaminante en un alimento. Además, se describe que la sensibilidad del análisis para detectar gliadina se puede incrementar notablemente inmovilizando prolamina de avena en lugar de gliadina para aprovechar la menor avidéz por la prolamina de avena de los anticuerpos antigliadina.

**MATERIALES Y MÉTODOS**

**Antígenos**

Los antígenos utilizados fueron gliadina (Sigma, EE.UU.), prolaminas de avena, cebada y centeno extraídas de los respectivos granos y zeína extraída de harina de maíz. La solución de gliadina se preparó disolviendo ésta en etanol al 70 %.

Las prolaminas de ACC se obtuvieron a partir de los granos, sometidos a molienda y tamizado (malla: 0,14). De 100 mg de estas harinas se extrajeron las prolaminas con 1 ml de etanol al 70 % y agitación en vórtice durante 10 minutos, se clarificó por centrifugación y filtrado. La solución de zeína se preparó de manera análoga a partir de harina de maíz. Se determinó la concentración de proteínas totales de los extractos por el método de Bradford<sup>10</sup>, utilizando gliadina como referencia.

Los extractos alcohólicos preparados de esa manera fueron luego diluidos al décimo en PBS (pH: 7,2) y luego diluidos a la concentración deseada en PBS o en PBS-0,05 % T-1 % se-roalbúmina bovina (PBS-T-BSA) según fueran utilizados para sensibilizar la fase sólida o para inhibir la reacción a ésta, respectivamente.

**Sueros**

Se hiperinmunizaron conejos (New Zealand, 2,5 kg) con una emulsión de 5 mg/ml de gliadina en PBS; adyuvante completo de Freund (1:1); de acuerdo con el siguiente protocolo: el día 0 se inyectó 1 ml de la emulsión antigénica, por vía i.m. en cada muslo. En el día 7 se inyectaron 0,5 ml de la misma emulsión en cada paleta por la misma vía, el día 14 se

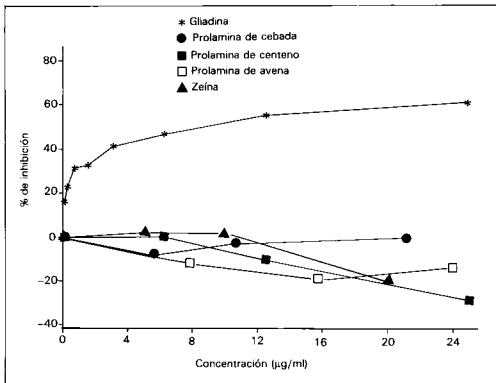


Fig. 1. Detección de prolaminas de TACC por ELISA-inhibición utilizando gliadina inmovilizada. En ordenadas se observa la inhibición de la reacción de un antisuero antigliadina con gliadina inmovilizada, usando en cada caso soluciones de gliadina, prolaminas de ACC y zeína en las concentraciones indicadas en abscisas. Las diferentes curvas representan las diferentes prolaminas en solución.

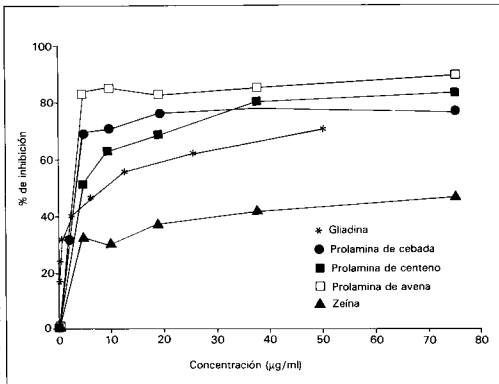


Fig. 2. Detección de gliadina utilizando prolaminas de TACC immobilizadas. En ordenadas se observa la inhibición de la reacción de un antisuero anti-gliadina con gliadina, prolaminas de ACC y zeína immobilizadas, utilizando soluciones de gliadina en las concentraciones indicadas en abscisas. Las diferentes curvas representan los resultados obtenidos utilizando las diferentes prolaminas immobilizadas.

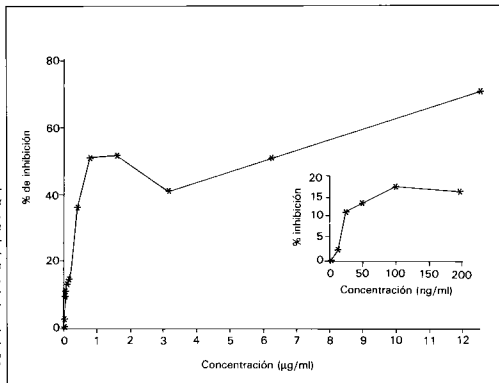


Fig. 3. Detección de gliadina utilizando prolamina de avena immobilizada. En ordenadas se observa la inhibición de la reacción de un antisuero anti-gliadina con la prolamina de avena immobilizada, usando soluciones de gliadina en las concentraciones indicadas en abscisas. En el recuadro inferior izquierdo se observa el gráfico ampliado para 0-20% de inhibición y 0-200 ng/ml de inhibidor.

inyectó 1 ml de la misma por vía subcutánea, en varios puntos a lo largo del flanco derecho de la columna, el día 21 se realizó la misma operación sobre el flanco izquierdo y, finalmente, el día 28 se inyectó 1 ml intramuscular en cada muslo. A los 64 días se realizó la extracción de sangre.

**ELISA**

La titulación de este suero se realizó por ELISA<sup>11</sup>. Brevemente, sobre placas de microtitulación (NUNC, Dinamarca), sensibilizadas incubando 100 µl de solución de gliadina

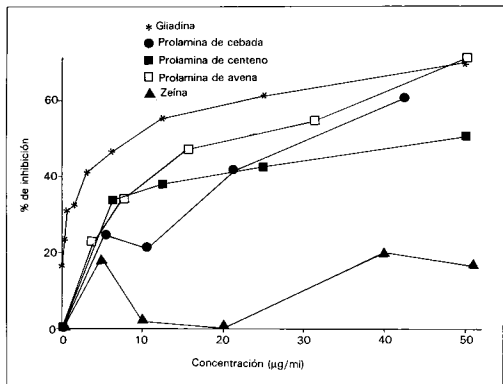


Fig. 4. Detección de prolaminas de TACC utilizando la proteína homóloga inmovilizada. En ordenadas se observa la inhibición de la reacción de un antisuero antigliadina con gliadina, prolaminas de ACC y zeína inmovilizadas, con soluciones de gliadina, prolaminas de ACC y zeína, respectivamente, en las concentraciones indicadas en abscisas. Las diferentes curvas representan las inhibiciones homólogas para cada prolamina.

(70 µg/ml)<sup>12</sup> durante 12 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda, se incubaron diferentes diluciones en PBS-T-BSA del suero a titular (3 horas, 37 °C, cámara húmeda), luego se incubaron (12 horas, 4 °C, cámara húmeda) 100 µl/pocillo de una dilución adecuada de antiinmunoglobulinas de conejo conjugadas a PO y se reveló la reacción enzimática con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, DMAB, MBTH<sup>13</sup>.

Este suero fue así mismo titulado contra la zeína y las prolaminas de ACC, por la técnica anteriormente descrita, inmovilizando por adsorción en las mismas condiciones la zeína y las prolaminas de ACC a una concentración de 70 µg/ml.

**ELISA-inhibición**

La titulación de prolaminas se realizó por ELISA, utilizando diferentes diluciones de cada prolamina (con unos límites de 3 ng/ml a 1,6 mg/ml) para inhibir la reacción del antisuero con la prolamina inmovilizada.

*Detección de las prolaminas de TACC utilizando gliadina en fase sólida*

Se sensibilizaron placas con gliadina como se describió previamente y se incubaron en cada pocillo 50 µl de soluciones de diferente concentración de gliadina a los que en todos los casos se añadieron 50 µl de una dilución del antisuero cuya concentración era el doble de la que genera una DO 1,0 en ELISA. El resto del procedimiento es igual a la determinación del título de Ac por ELISA.

De manera análoga, se inhibió la reacción del antisuero a la gliadina inmovilizada utilizando soluciones de diferente concentración de zeína y de las prolaminas de avena, cebada y centeno.

*Detección de gliadina utilizando prolaminas de avena, cebada y centeno en fase sólida*

Se sensibilizaron placas con 70 µg/ml de cada una de las siguientes proteínas: zeína y prolaminas de ACC. Luego se inhibió la reacción del antisuero con las diferentes proteínas inmovilizadas usando soluciones de gliadina de diferente concentración, de acuerdo con la metodología ya descrita.

*Detección de prolaminas de avena, cebada y centeno utilizando la proteína homóloga en fase sólida*

Sobre placas sensibilizadas con 70 µg/ml de cada una de las diferentes prolaminas de ACC o de zeína se inhibió la reacción del antisuero, por el mismo procedimiento descrito anteriormente, utilizando soluciones de diferente concentración de la proteína homóloga a la inmovilizada. La reacción del antisuero con cada proteína en fase sólida se inhibió con soluciones de diferente concentración de todas las proteínas en estudio.

**RESULTADOS**

**Detección de prolaminas de TACC por ELISA-inhibición utilizando gliadina inmovilizada**

El 50 % de inhibición de la reacción del antisuero con gliadina inmovilizada se observó con una solución de 8,5 µg/ml de gliadina (fig. 1), mientras que cuando se inhibió esa reacción usando soluciones de zeína o de las prolaminas de ACC no se logró el 50 % de inhibición en ninguno de los casos. Se utilizaron soluciones de estas

TABLA I. Concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) de las soluciones de las diferentes prolaminas que inhiben el 50 % de la reacción de un antisuero antigliadina frente a las diferentes prolaminas en fase sólida

Proteína en fase sólida	Proteína en solución				
	Gliadina	Prolamina de cebada	Prolamina de centeno	Prolamina de avena	Zeína
Gliadina	8,5	-	-	-	-
Prolamina de cebada	< 4	32	54	100	-
Prolamina de centeno	< 4	-	48	-	-
Prolamina de avena	0,78	100	-	24	-
Zeína	-	-	-	-	-

proteínas de concentración menor o igual a 160  $\mu\text{g/ml}$ , aunque en la figura 1 sólo se exponen los resultados hasta 24  $\mu\text{g/ml}$ .

Estos resultados plantean la necesidad de incrementar la sensibilidad del análisis tanto para gliadina como para las prolaminas de ACC.

#### Aumento de la sensibilidad del análisis de gliadina usando prolaminas heterólogas inmovilizadas

Es probable que el antisuero contra gliadina tenga mayor avidez por la gliadina que por las otras prolaminas alimentarias. Por esta razón, se inmovilizaron cada una de las prolaminas de avena, cebada y centeno en fase sólida para ensayar la detección de gliadina. Los resultados de este experimento están resumidos en la figura 2. Se observó que el 50 % de inhibición de la reacción con prolaminas de ACC inmovilizadas se obtuvo utilizando concentraciones de gliadina inferiores a las que se usaron al inmovilizar gliadina. Cuando se inmovilizó la prolamina de avena, cebada o centeno, el 50 % de inhibición de la reacción se observó en todos los casos con concentraciones de gliadina en solución menores de 4  $\mu\text{g/ml}$  (fig. 2), mientras que cuando se inmovilizó gliadina el 50 % de inhibición se observó con una solución de 8,5  $\mu\text{g/ml}$  de gliadina. La sensibilidad mayor se observó inmovilizando la prolamina de avena, en cuyo caso el 50 % de inhibición se logró con 780  $\text{ng/ml}$  de gliadina. En este caso además se logró una inhibición del 10 % de la reacción (mínima lectura significativa) con una solución de gliadina de 24  $\text{ng/ml}$  (fig. 3).

#### Determinación de cada una de las prolaminas de ACC usando las prolaminas homólogas inmovilizadas

Si el antisuero antigliadina tiene una avidez mayor por la gliadina que por las prolaminas de ACC, sería posible aumentar la sensibilidad en la detección de estas prolaminas inmovilizando la homóloga en lugar de gliadina. De acuerdo con esta hipótesis se inmovili-

zaron cada una de las prolaminas de ACC y se inhibieron sus reacciones con el antisuero utilizando en cada caso soluciones de la prolamina homóloga y comparando esta inhibición con la observada utilizando soluciones de las otras prolaminas. Los resultados se resumen en la figura 4 y en la tabla I. En los casos en que se inmovilizaron las prolaminas de avena, cebada y centeno y se utilizó la prolamina homóloga como inhibidora, el 50 % de inhibición se observó con concentraciones de 24  $\mu\text{g/ml}$ , 32  $\mu\text{g/ml}$  y 40  $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente (fig. 4, tabla I). En los casos de inhibición cruzada (p. ej., prolamina de avena en fase sólida y prolamina de cebada en solución) se necesitó una concentración de inhibidor superior a la correspondiente a la prolamina homóloga para inhibir el 50 % de la reacción. En algunos casos no se logró esa inhibición, incluso utilizando concentraciones de hasta 160  $\mu\text{g/ml}$  (tabla I).

#### DISCUSIÓN

En este artículo se describe una modificación del ELISA-inhibición, que es una metodología ya utilizada para la detección de gliadina<sup>1</sup>. Se trata de un nuevo diseño que permite aumentar significativamente la sensibilidad del análisis y, además, identificar y calcular los títulos de la prolamina del cereal contaminante en una muestra de alimento. Este diseño implica inhibir la reacción de un antisuero policlonal antigliadina con las prolaminas de los diferentes cereales en fase sólida, utilizando soluciones de diferentes concentraciones de las prolaminas tanto homólogas como heterólogas.

En la figura 1 quedan reflejadas las limitaciones del método cuando se utiliza únicamente gliadina en fase sólida. En primer lugar, la sensibilidad obtenida con esta técnica para detectar gliadina es baja, ya que el 50 % de inhibición de la reacción del antisuero antigliadina a la gliadina inmovilizada se logra con 8,5  $\mu\text{g/ml}$  de gliadina. En segundo lugar, este análisis no permite detectar las prolaminas de avena, cebada y centeno, que también son tóxicas para los enfermos celíacos. Se observa que con soluciones de 24  $\mu\text{g/ml}$  de estas prolaminas no es posible apreciar una inhibición significativa de la reacción, que sólo se logra con concentraciones

muy altas, no llegándose en ninguno de los casos a inhibir el 50 % de la reacción.

En este experimento se utilizó un antisuero antigliadina y los resultados obtenidos sugieren que la avidez de este suero por la gliadina es mayor que por las otras proteínas alimentarias. Esto muestra que la sensibilidad del análisis para la gliadina aumentaría si se utilizaran las prolaminas de avena, cebada o centeno inmovilizadas y se inhibiera con soluciones de gliadina su reacción con los anticuerpos antigliadina. Ejecutando ese experimento, sus resultados (fig. 2) muestran que utilizando gliadina para inhibir la reacción de los Ac antigliadina con las prolaminas de ACC inmovilizadas se tuvieron que utilizar soluciones de gliadina de concentración menor de 4 µg/ml para inhibir el 50 % de la misma y, en cambio, usando gliadina en fase sólida el 50 % de inhibición se logró con 8,5 µg/ml. Utilizando la prolamina de avena inmovilizada, el 50 % de inhibición se observó con 780 ng/ml de gliadina (fig. 3), lo que indica una sensibilidad 10 veces mayor que al utilizar gliadina inmovilizada. Este límite de detección está condicionado por la calidad del antisuero, ya que Troncone et al<sup>1</sup>, utilizando gliadina inmovilizada, obtienen un 50 % de inhibición con 312 ng/ml, en lugar de con 8,5 µg/ml como en nuestro laboratorio, por lo que cabría esperar que con un mejor antisuero y con avena en fase sólida la sensibilidad fuese aún mayor.

Es de destacar así mismo, que el perfil de inhibición observado en la figura 3 podría sugerir dos poblaciones de anticuerpos dirigidos contra determinantes antigénicos diferentes. Este hecho, sumado a las probables diferencias de avidez relativa de los anticuerpos frente a la gliadina y a la prolamina de avena, sugiere que la purificación del Ac podría permitir el aumento de la sensibilidad del análisis. Otra alternativa sería usar Ac monoclonales contra la correspondiente fracción antigénica.

La otra limitación del ELISA-inhibición (fig. 1) es que usando gliadina inmovilizada no es posible detectar las prolaminas de ACC. A partir de la hipótesis de que el suero antigliadina tendría una avidez mayor por la gliadina que por las prolaminas de ACC, sería posible detectar cada una de estas prolaminas inmovilizando la prolamina homóloga en vez de gliadina. Por ello se llevó a cabo el análisis ELISA-inhibición con cada una de las prolaminas de ACC inmovilizadas e inhibiendo su reacción con el antisuero por medio de soluciones de la prolamina homóloga. Al comparar esta inhibición con la observada utilizando soluciones de las otras prolaminas se observó que (fig. 4, tabla I) la sensibilidad en la detección de estas prolaminas es superior cuando la prolamina inmovilizada es la misma que en solución. Nótese que el 50 % de inhibición se observó con 24, 32 y 40 µg/ml de las prolaminas de avena, cebada y centeno, respectivamente (tabla I). En el caso de usar gliadina inmovilizada no se logró este nivel de inhibición ni con soluciones de concentración del orden de 160 µg/ml. Mediante esta metodología es posible determinar cuál es el cereal contaminante en una posible muestra de alimento comparando los niveles de inhibi-

ción observados con las diferentes prolaminas inmovilizadas (tabla I). Es de destacar, además, que la sensibilidad para las prolaminas tóxicas distintas de la gliadina podría incrementarse utilizando anticuerpos frente a éstas y no frente a la gliadina.

Finalmente (resultados no mostrados) se observó que concentraciones de hasta un 35 % de alcohol no afectan la unión del Ac a las prolaminas inmovilizadas; sin embargo, al aumentar la relación extracto alcoholíco/PBS-T-BSA no aumenta la inhibición a la fase sólida, como podría esperarse, probablemente por la pérdida de epítopos conformacionales de gliadina en solución con concentraciones más elevadas de alcohol.

En síntesis, se describe un nuevo diseño experimental para la detección de prolaminas que permite aumentar la sensibilidad y especificidad del análisis al valerse de las diferencias de avidez relativa de los Ac antigliadina frente a las diferentes prolaminas en TACC.

### Bibliografía

1. Troncone R, Vitale M, Donatiello A, Farris E, Rossi G, Auricchio S. A sandwich enzyme immunoassay for wheat gliadin. *J Immunol Methods* 1986; 92:21-23.
2. Cooke WT, Holmes GK. Coeliac disease, inflammatory bowel disease, and food intolerance. En: Lessof M, ed. *Clinical reactions to food*. Londres, John Wiley and Sons, 1983; 181-205.
3. Freedman A, Giovani G, Gal E, Ellis J, Ciclitira P. Detection of wheat gliadin contamination of gluten free foods by a monoclonal antibody dot immunobinding assay. *Clin Chim Acta* 1987; 166:323-328.
4. Ciclitira PJ, Fagg NIK, Evans DJ, Lennox ES, Dowling RH. Clinical testing of gliadin fractions in coeliac patients. *Clin Sci* 1984; 66:357.
5. Kagnoff MF. Celiac disease: A model of an immunologically mediated intestinal disease. *Immunology and allergy of North America* 1988; 8 (3):505-520.
6. Logan RFA, Rikkind EA, Turner ID, Ferguson A. Mortality in celiac disease. *Gastroenterology* 1989; 97:265-271.
7. FAO/OMS. Programa conjunto sobre normas alimentarias. Comité del Codex sobre nutrición y alimentos para regímenes especiales. 17.ª reunión, septiembre-octubre, 1988.
8. Freedman AR, Galfre G, Gal E, Ellis HJ, Ciclitira PJ. Monoclonal antibody ELISA to quantitative wheat gliadin contamination of gluten-free foods. *J Immunol Methods* 1987; 98:123-127.
9. Ciclitira PJ, Evans DJ, Fagg NIK, Lennox ES. A radioimmunoassay for wheat gliadins to assess the suitability of gluten-free foods for patients with coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 1985; 59:703.
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
11. Molina MC, Salinas G, Nieto A. Título y avidez de los anticuerpos antigliadina en la enfermedad celíaca. *Inmunología* 1989; 8:102-106.
12. Nieto A, Gaya A, Moreno C, Vives J. Nuevo método para determinar la adsorción de proteínas a las placas de poliestireno usadas en ELISA. *Inmunología* 1984; 3:25-28.
13. Ngo TT, Lenhoff H. A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. *Analyt Biochem* 1980; 105:389-397.