



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

ESTUDIO DE ALTERNATIVAS NO ISOTÓPICAS PARA
SUBSTITUIR AL RADIOINMUNOANÁLISIS EN UN
LABORATORIO CLÍNICO DE ALTO VOLUMEN DE
TRABAJO.

T É S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

SILVIA VÁZQUEZ OLMEDO



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. CELSO MOSQUEIRA OSUNA

ASESOR DE TESIS:
Dr. RUBEN MARROQUIN SEGURA

MÉXICO, D.F.

2005.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA".

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
VOCAL	DR. CELSO MOSQUEIRA OSUNA
SECRETARIO	Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO
SUPLENTE	Q.F.B. ALICIA CABRERA AGUILAR
SUPLENTE	Q.F.B. LILIA TEQUIANES BRAVO

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

LABORATORIO DE ASESORÍA Y SERVICIO
REFERIDO S.A. DE C.V.

DIRECTOR DEL TEMA: DR. CELSO MOSQUEIRA OSUNA

ASESOR DEL TEMA: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

DEDICATORIA.

A mi mamá Ma. Eugenia:

Con amor, respeto, admiración y cariño por su apoyo comprensión y estímulo durante la carrera, y la gran ayuda para la conclusión de esta tesis.

A mi esposo Daniel:

Con gran amor, admiración y gratitud por su estímulo, apoyo constancia y guía durante la carrera y en el desarrollo de esta tesis.

A mi hijo Jeremy Daniel:

Por ser estímulo importante en la conclusión de este trabajo y algo muy maravilloso que Dios me ha dado en la vida.

A mi tía Adelaida:

Con amor, respeto , admiración y cariño por su estímulo y apoyo durante la carrera

A mis primos hermanos Ivonne, Karla, Oscar y Omar:

Con cariño, por sus palabras alentadoras durante la carrera.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al Dr en C. Celso Mosqueira Osuna.

Con respeto y admiración, su apoyo incondicional para llevar a cabo este trabajo en las instalaciones de Laser®, SA de CV y dirigirme en la misma.

A mis amigas y compañeras Elena, Elizabeth García, Elizabeth Campos, Gaby y Angeles por su apoyo para la realización de esta tesis y sus consejos alentadores.

TABLA DE CONTENIDO

	PAGINA
TABLA DE CONTENIDO	1
I. INTRODUCCION	2
II. MARCO TEORICO.....	3
1. RADIOINMUNOANALISIS.....	3
1.1 Procedimiento	4
1.2 Principios generales	7
1.3 Reactivos primarios.....	10
a) Composicion de los estandares.....	10
b) Tipo de antisuero.....	10
c) Calidad del trazador.....	11
1.4 Curva estándar.....	11
2. ELISA.....	15
2.1 ELISA homogéneo.....	15
2.2 ELISA heterogéneo.....	15
2.3 Principios.....	15
2.4 Procedimiento.....	16
2.5 Otras variantes.....	20
3. QUIMIOLUMINISCENCIA.....	21
Principio	21
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
IV. OBJETIVOS.....	25
V. HIPOTESIS.....	25
VI. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25
MATERIAL Y METODO	27
DIAGRAMA DE FLUJO	29
DISEÑO ESTADISTICO	30
VII. RESULTADOS OBTENIDOS.....	31
VIII. ANALISIS DE RESULTADOS.....	53
IX. CONCLUSIONES.....	55
XI. ANEXOS.....	57
X. BIBLIOGRAFIA.....	59

I. INTRODUCCIÓN

Es bien sabido que los laboratorios clínicos desde los años 70 empezaron a tratar de automatizar el mayor número posible de las determinaciones que realizaban. Una vez que fueron introducidos los analizadores automáticos para los inmunoanálisis se buscó mejoras en la sensibilidad.

Entre los años 60 y 70 se trató de automatizar el radioinmunoanálisis (RIA) a través de la adaptación de los analizadores automáticos de química clínica de flujo continuo y centrífugos, que en su momento existían en el mercado, pero se tuvo poco éxito.

A pesar de varios intentos, no se han desarrollado sistemas perdurables para la automatización del radioinmunoanálisis, al menos en la rutina clínica. Actualmente el RIA se hace de forma semiautomática. Se ha automatizado la preparación de las muestras utilizando robots, mientras que la separación de las fracciones ligada y libre suele realizarse con la intervención del operador. Una vez separadas, las fracciones se llevan a un contador de radiación.

El paso a las tecnologías alternativas al radioinmunoanálisis, con rapidez en la entrega de resultados y disminución de costos, está poco a poco propiciando la automatización de los laboratorios clínicos. Esto es un paso de fundamental importancia para el laboratorio Laser®, que actualmente enfrenta el problema de realizar una gran parte de los análisis con metodología radioisotópica y está efectuando la búsqueda de una alternativa no isotópica que sustituya al RIA. Esto, además de darle mayor seguridad al personal que lo trabaje, deberá ser también rentable, oportuno y confiable.

II . MARCO TEÓRICO

I. RADIOINMUNOANÁLISIS.

Con anterioridad a la década de los 60's , las determinaciones de laboratorio de parámetros tiroideos resultaban muy laboriosas, de escaso rendimiento, y de muy baja sensibilidad, exactitud y especificidad. En esa década, se combinaron conocimientos de Inmunología y Bioquímica en el Radioinmunoanálisis (RIA) que ayudaron a lograr la unión de un anticuerpo con el correspondiente antígeno que le dio origen, formando complejos antígeno-anticuerpo detectables y cuantificables mediante su acoplamiento a un marcaje radiactivo. De este modo, al revolucionar la metodología inmunoanalítica competitiva con el RIA, se obtuvo una alta sensibilidad que permitió la cuantificación de proteínas que circulan en el plasma sanguíneo en concentraciones del orden de nanogramo por mililitro de suero (10^{-9} ng/mL), rodeadas de miles de proteínas séricas con estructuras muy distintas, o por el contrario muy similares, como la simple diferencia de un ión hidroxilo (OH) , con lo que se muestra una superlativa especificidad de la metodología.¹

Otras características importantes son su gran exactitud y precisión.

El incesante progreso de la ciencia y la tecnología producen en la actualidad un conocimiento cada día más profundo y claro de las funciones vitales a un nivel bioquímico, y un mejoramiento continuo en aquellas metodologías tendientes a determinar en forma cuantitativa todos aquellos parámetros de utilidad clínica. Tal es el caso para las determinaciones efectuadas por Radioinmunoanálisis, técnica analítica importante desarrollada en 1959 por Solomon Berson y Rosalyn Yalow, que fue aplicada para detectar y cuantificar la insulina humana. El método utiliza anticuerpos humanos anti-insulina, y fue sin duda un descubrimiento muy importante. Como información colateral vale la pena comentar que, en forma prácticamente simultánea en Inglaterra, el investigador F. Ekins desarrolló un método de análisis para la determinación de tiroxina (T_4) , cuyo principio funcional competitivo era el mismo pero en ausencia de un sistema de reactivos inmunológicos, substituyendo los anticuerpos por globulinas plasmáticas transportadoras específicas para T_4 . Ambos métodos han coexistido muchos años siendo ampliamente utilizados.

Debido a las sobresalientes características del RIA, su gran exactitud, precisión y especificidad, es posible determinar en forma directa concentraciones muy bajas de sustancias tales como hormonas, anticuerpos, productos intermedios o finales de diferentes vías metabólicas, productos de células cancerosas, niveles séricos de algún medicamento, etc. Su aplicación como método altamente sensible y específico ha favorecido el avance tan importante que en las últimas décadas han tenido la endocrinología y la oncología.⁴

El radioinmunoanálisis consiste fundamentalmente en la utilización de la gran capacidad técnica que existe en la actualidad para medir con precisión cantidades minúsculas de radioactividad, combinada con la extraordinaria especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo.²

Mediante el empleo de anticuerpos específicos, marcados radioactivamente, dirigidos contra una determinada sustancia que desee determinarse cuantitativamente en el suero de un paciente, se puede evaluar la cantidad de anticuerpos que reaccionó en el sistema y en base a esto calcular la concentración de la sustancia problema. En forma semejante, se pueden emplear antígenos marcados radioactivamente, para determinar la presencia de anticuerpos específicos en el suero del paciente.

1.1 Procedimiento del RIA.

La serie de pasos a realizar se mencionan a continuación:

- I. Reacción de enlace de ligando.
- II. Partición y separación.
- III. Medición de la respuesta.
- IV. Creación de una curva de calibración.

I. Reacción de enlace de ligando.

Se establece un número de tubos de reacción conteniendo cada uno una concentración pequeña y preestablecida de ligador y una pequeña concentración fija de analito, marcado con radioisótopos. Se añaden entonces cantidades crecientes de calibrador a una serie de mezclas de anticuerpo marcado dándose la competencia entre el analito marcado y no marcado, por los sitios de enlace del anticuerpo.

II. Partición y separación.

Aquí ya las fracciones enlazada y libre se sujetan al paso de partición, después del cual se separan físicamente. Los métodos tradicionales de partición que secuestran el enlace y los complejos de enlace de ligando, incluyen extracción salina de proteína (con sulfato de amonio o de sodio), desnaturalización y precipitación de proteínas con solvente (metanol, etanol o acetona) y precipitación (con polietilenglicol o por un segundo anticuerpo dirigido contra el primero). Después de la partición, las fracciones unida y libre son sujetas a separación física por decantación, centrifugación o filtrado.^{2,3}

Sin embargo, en los últimos años los procedimientos de RIA utilizan cada vez más diversas variantes del método de fase sólida para separar los complejos antígeno-anticuerpo formados. Dicho método hace uso de la unión del ligador a una fase sólida, tal como la pared plástica del tubo de ensaye, de tal manera que al ocurrir el enlace químico con el analito, éste queda adherido a la fase sólida también, facilitando mucho la separación por simple decantación.

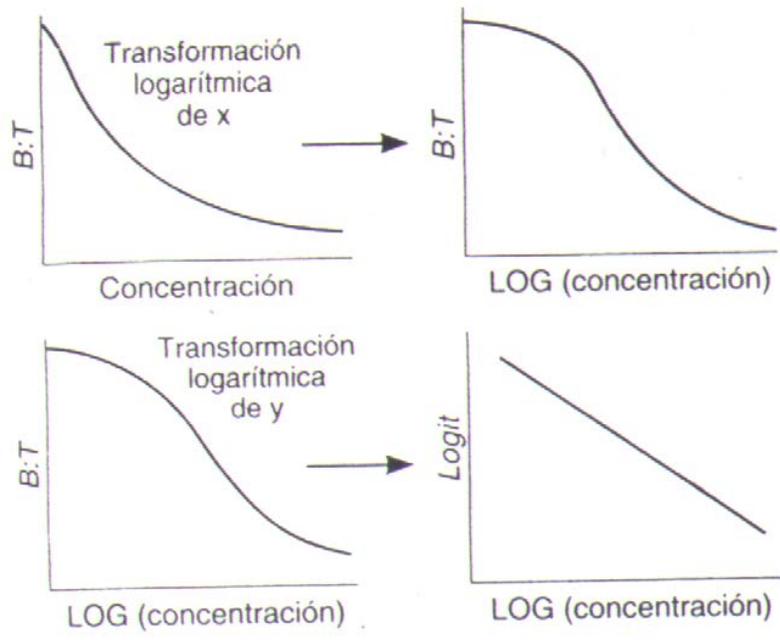
III. Medición de la respuesta.

Se realiza por la cuenta radiactiva y para ello se utiliza un contador de centelleo líquido para la detección de emisores alfa o beta y un contador gamma de cristal sólido para emisores gamma.

Un valor de empleo habitual es la relación del marcador enlazado con el marcador total o B/T.

IV. Creación de una curva de calibración.

La mayor parte de las relaciones que en la práctica se encuentran son curvas simétricas y más o menos sigmoides cuando se grafican mediante el uso de un eje logarítmico de concentración, como se muestra a continuación:

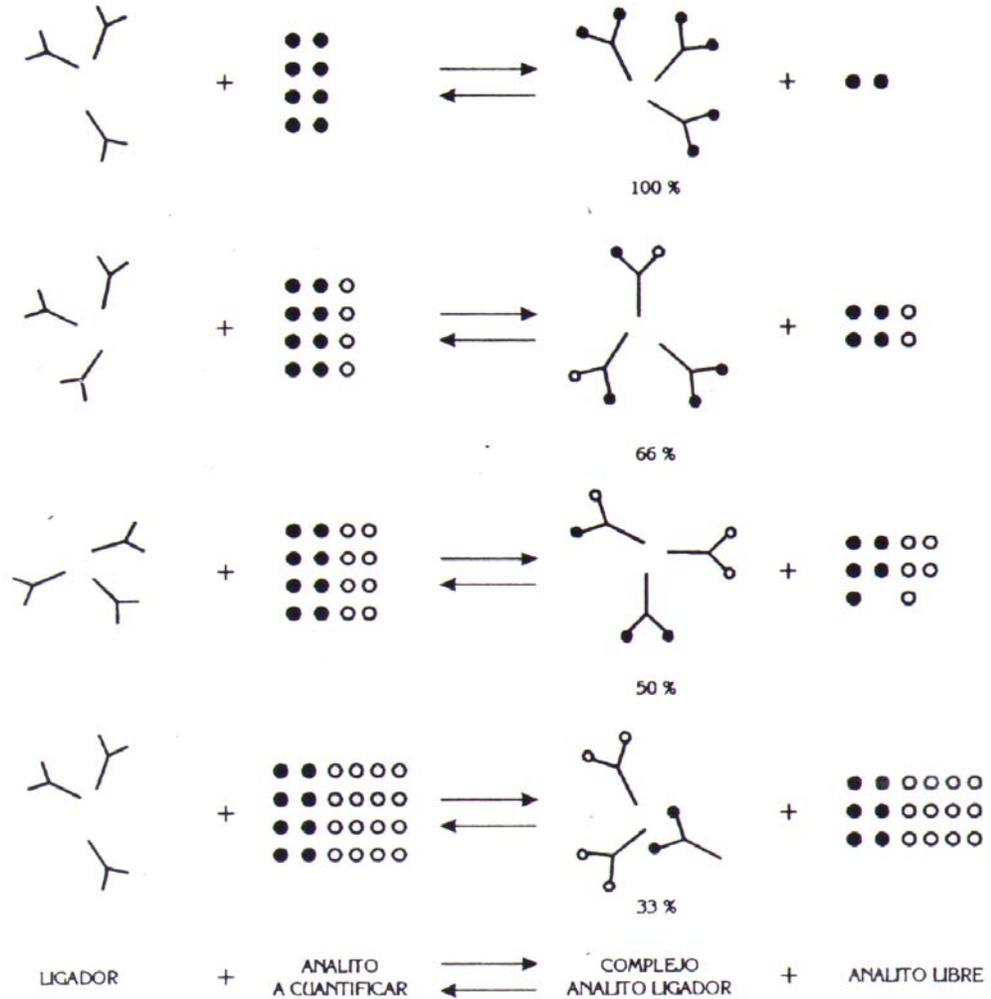


La gráfica muestra como se forma una curva de calibración

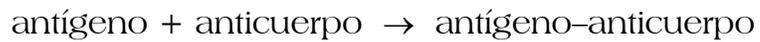
Dicho ligador debe encontrarse en cantidad limitada y debe ser generalmente menor que la cantidad del analito a cuantificar. Es bien sabido que en los llamados análisis por saturación, se emplea una cantidad limitada del reactivo específico o ligador, en presencia del ligando en exceso, presentándose saturación del ligador al final de la reacción. Además el enfoque que se emplea para conocer la concentración total del analito presente en los análisis por saturación, es el de incorporar trazadores, que revelan la proporción de la sustancia presente en cada una de las fracciones: libre y unida.

Abajo se muestra el esquema del análisis por enlace en el RIA.

ANALISIS POR ENLACE EN EL RIA



Reacción Antígeno – Anticuerpo.⁴
 En el siguiente planteamiento:



se representa una forma simple en la que se encuentra una relación igual a uno entre el número de moléculas de antígeno y los sitios de

unión en el anticuerpo y que favorece la formación de complejos antígeno-anticuerpo.

Para un antígeno y un anticuerpo establecido, el número de complejos resultantes por unidad de tiempo depende de la concentración de antígeno y anticuerpo presentes al inicio de la reacción. Cabe mencionar que así como se establece la formación de complejos Ag-Ac, se realiza la disociación de los mismos para reconstituir los reactivos originales:



El radioinmunoanálisis es una técnica basada en el hecho de que la conformación molecular del analito y las moléculas con estructuras parecidas pueden afectar los resultados. De ahí que sea necesario considerar los siguientes factores:

1.3 Reactivos Primarios:

- ◆ Composición de los estándares
- ◆ El tipo de antisuero
- ◆ La calidad del trazador

A continuación se analizará cada uno de ellos:

a) Composición de los estándares.

Aquí la sustancia a cuantificar debe ser semejante a la sustancia con la cual se compara. De ahí que los estándares deben cumplir con las siguientes características:

- a) Poseer un alto grado de pureza
 - b) Ser homogéneos
- b) El tipo de antisuero.

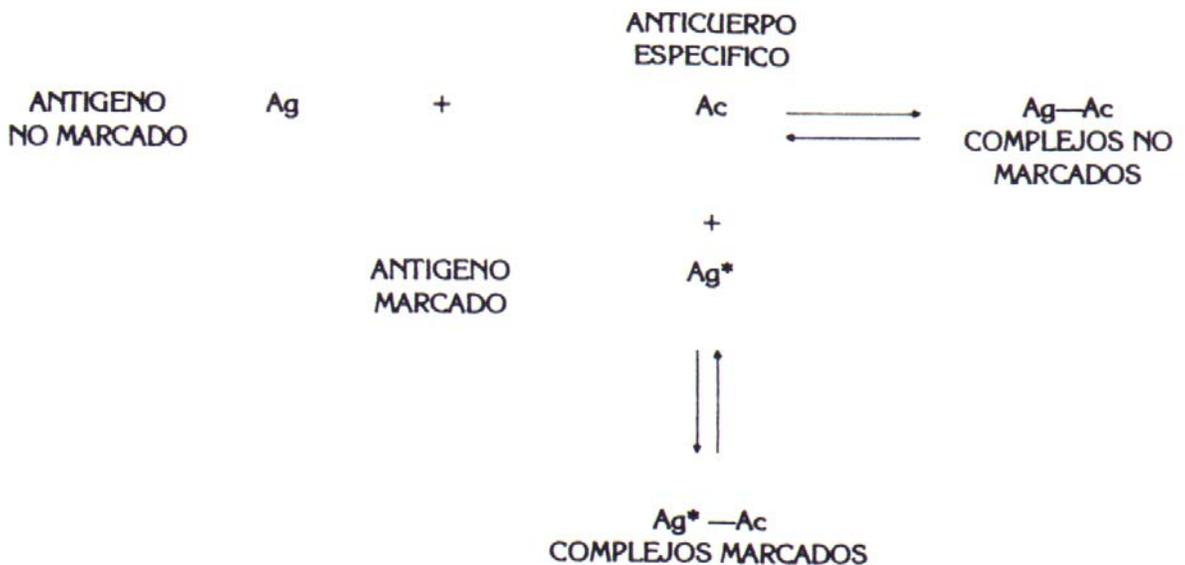
Su especificidad es un criterio principal para la buena calidad en el RIA. Entonces es necesario contar con inmunógenos libres de sustancias contaminantes para que se obtengan antisueros altamente específicos.

c) Calidad del trazador.

Con el trazador (Analito+radioisótopo) se permite la identificación y la cuantificación del analito en las fracciones libre o unida, por lo que deberá ser lo más semejante a la sustancia (analito) que se desea cuantificar. Es necesario además que las condiciones de almacenamiento del trazador sean adecuadas para que conserve sus propiedades; además deberá tomarse en cuenta la vida media del radioisótopo que se utilice.

1.4 CURVA ESTANDAR.

Cuando no existe analito en el sistema, las moléculas del trazador que están siempre en cantidad fija, lograrán la saturación del ligador, estableciéndose así que el 100 % de los sitios de unión del reactivo están siendo ocupados por el trazador. Con ello se demuestra que la distribución del trazador en las fracciones libre y unida está en función de la concentración del analito o del estándar presente, como se muestra en el siguiente esquema:



De ahí que pueda hablarse de:

LA DOSIS: corresponde a la cantidad de analito presente y tiene un intervalo que va desde un valor de cero hasta infinito.

LA RESPUESTA: forma de presentar la cuantificación del trazador en la fracción libre o unida, y que puede expresarse como el valor absoluto de la medición en cuentas por minuto, o como un porcentaje unido del total del trazador empleado.

Ejemplo:

Cantidad total del trazador presente:

Al inicio de la reacción: 10,000 cpm (cuentas por minuto)

Después de la separación:

En la fracción unida 6,000 cpm

En la fracción libre 4,000 cpm

Porcentaje de unión: 60 %

Donde el valor de 60 % representa la máxima unión del trazador al ligador específico en ausencia de analito y es llamado "U" o "B" ("Bound" en inglés)

Al graficar la respuesta en función de concentraciones conocidas de analito, se genera una curva dosis-respuesta, o curva de desplazamiento del trazador unido. Habitualmente queda definida como una curva estándar o curva de calibración. En esta curva, la variable conocida es la concentración del analito y la respuesta está en función de ella.

Cuando se introduce una muestra de concentración desconocida, la respuesta obtenida va a estar en función de la concentración y al conocer las respuestas para un intervalo determinado de concentraciones, el valor de la muestra problema se puede identificar.

Una vez generada la curva dosis-respuesta con la concentración de los estándares en las abscisas y el porcentaje de unión en las ordenadas, el valor exacto de la o las muestras problema se obtiene por interpolación y para ello se siguen los siguientes pasos:

1. Se localiza el valor de la respuesta de la muestra problema en el eje de las ordenadas (Y)
2. Se traza una línea paralela al eje de las abscisas (x) hasta tocar la curva estándar, y
3. De la curva estándar se proyecta una línea perpendicular al eje de las abscisas (x), en donde el punto de intersección corresponde a la concentración de la muestra problema.

Para evitar deducir las concentraciones de analito, cuando los porcentajes de unión son mayores o menores que el intervalo de respuestas de la curva estándar, hay que transformar matemáticamente, tanto la respuesta, como las concentraciones de los estándares, para obtener un trazo recto. (Frecuentemente a esta transformación se le denomina “linearizar”).

Las curvas obtenidas por transformación de la dosis y/o de la respuesta son:

Logaritmo de la dosis vs respuesta en escala aritmética (semilogarítmica)

Logaritmo de la dosis vs logit de la respuesta (log-logit).

INTERPOLACION DE RESULTADOS EN EL RIA



2. ELISA

En la década de los 60's algunos investigadores iniciaron el estudio de los principios aplicados en los sistemas de análisis inmunoenzimático. Debido al constante desarrollo de los inmunoanálisis en la búsqueda de nuevos trazadores de unión antígeno-anticuerpo, en los años 70 y 80 se intentó reemplazar el radioisótopo por enzimas como fosfatasa alcalina o peroxidasa dando origen a la metodología llamada Análisis inmunoenzimático (AIE) del cual existen 2 tipos: ^{6,7}

- a) Tipo homogéneo, denominado Enzyme multiplied immuno assay (EMIT)
- b) Tipo heterogéneo, denominado Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA)

De las dos modalidades se tiene lo siguiente:

2.1 EMIT homogéneo, en el que todo el proceso transcurre en el mismo tubo. La marca consiste en un ligando conjugado a una enzima que permanece activa. Luego, el enlace del anticuerpo al complejo enzima-ligando inactiva la enzima; la presencia de ligando libre (analito) compite con el complejo enzima-ligando por el anticuerpo e incrementa la actividad enzimática resultante y en un intervalo limitado, la actividad enzimática será aproximadamente proporcional a la concentración de analito.

2.2 ELISA heterogéneo, en el que la enzima conjugada al antígeno mantiene su actividad tanto cuando el antígeno permanece libre como cuando se une al anticuerpo, de tal suerte que se tiene que incorporar una etapa de separación.

Hace uso de una fase sólida a la cual habitualmente se fija un antígeno o un anticuerpo.

2.3 Principios. Los sistemas básicos de detección por ELISA consisten en anticuerpos que están unidos a enzimas que mantienen la capacidad de catalizar una reacción

cuyo producto final es detectable, ya sea de manera visual, colorimétrica o espectrofotométrica. Con la utilización del marcador

enzimático se logra medir la formación de complejos antígeno-anticuerpo.

2.4 Procedimiento. En el sistema ELISA la reacción se lleva a cabo de la siguiente forma:

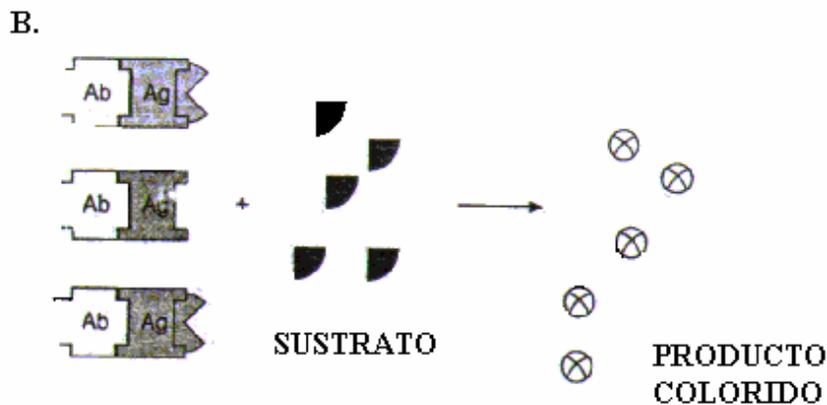
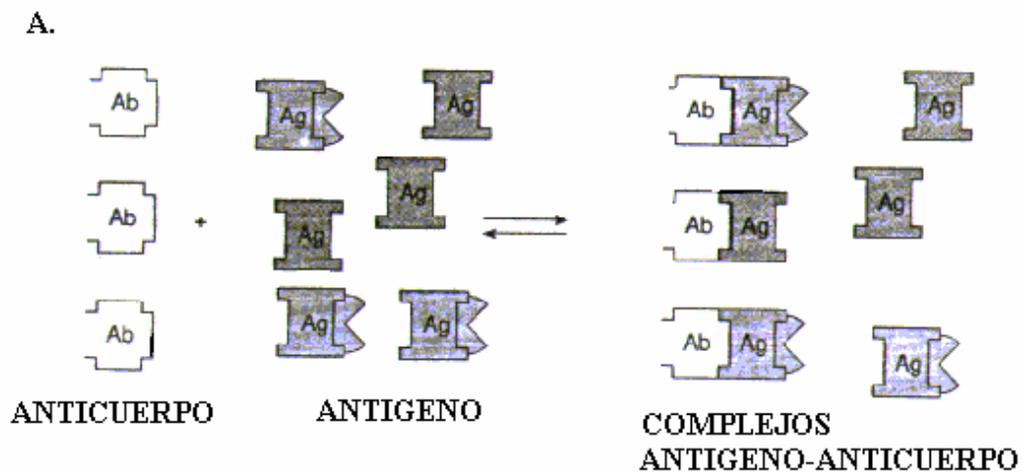
A) Se hace reaccionar un número limitado de moléculas de anticuerpo (Ab) que están unidas a placas de poliestireno (fase sólida), con antígeno (Ag) y antígeno conjugado con enzima.

B) Los antígenos compiten por el sitio de enlace y forman complejos.

C) Se lavan las perlas para retirar el antígeno no enlazado, así como los conjugados enzima-antígeno.

D) Se agrega el sustrato de la enzima.

E) El antígeno conjugado con enzima enlazado, transforma el sustrato en un producto colorido que es susceptible de medirse.



Existen también diversas variaciones del método ELISA, que se usan para detectar y cuantificar ligandos de alto peso molecular (>30 000 daltons) que están basados en principios originalmente descritos por Engvall y Perlmann, y Van Weemen y Schuurs en 1971. En estos análisis se emplea un marcador enzimático que se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario. Todas las pruebas ELISA son ensayos en fase sólida en los que se absorbe un antígeno o anticuerpo sobre un soporte sólido.⁶

Algunos protocolos se basan en reacciones de enlace competitivo y otros en reacciones de enlace no competitivo.

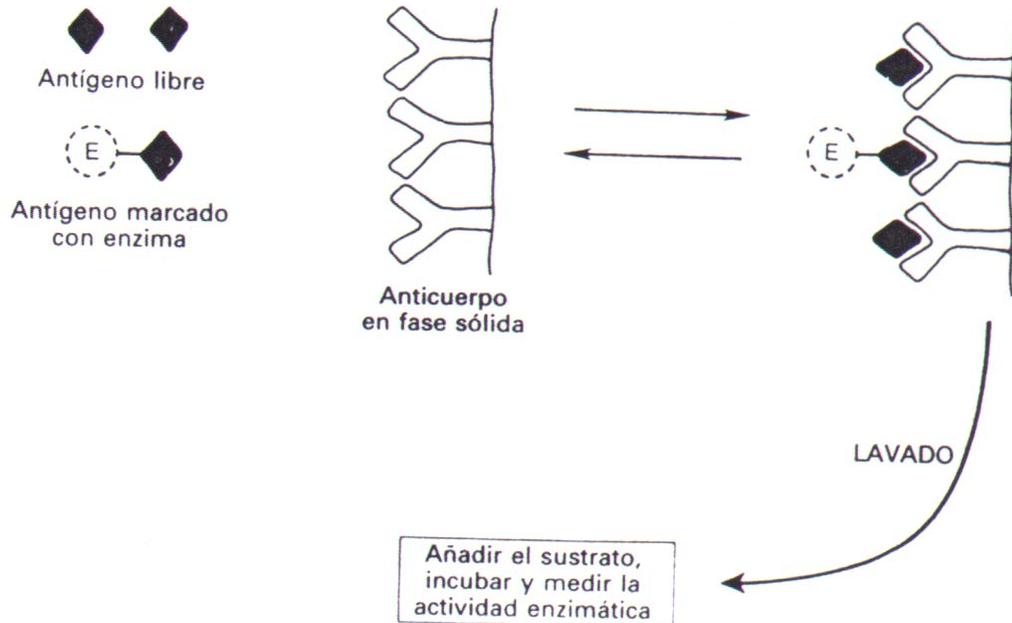
ELISA competitivo. ELISA competitivo con empleo de antígeno marcado por enzimas.

Es un método que se sirve de un antígeno marcado enzimáticamente, con el anticuerpo específico inmovilizado a una fase sólida y consta de los siguientes pasos:

1. El anticuerpo específico es adsorbido o se une de modo covalente a una matriz de fase sólida.
2. Se elimina por lavado el anticuerpo no unido.
3. Se incuba el antígeno marcado en presencia de antígeno estándar.
4. Una vez alcanzado el equilibrio de la reacción antígeno-anticuerpo, se realiza un lavado con buffer.
5. Se incuba el complejo antígeno-anticuerpo marcado enzimáticamente con la solución de sustrato enzimático.
6. Se detiene la reacción enzimática y se mide el producto de reacción del sustrato.

El siguiente esquema muestra un ELISA competitivo mediante conjugados de enzima-anticuerpo.

Aquí el antígeno está unido a una fase sólida. Los pasos de esta técnica son similares a los de ELISA competitivo con empleo de antígeno marcado enzimáticamente.



ELISA no competitivo. Es un ejemplo de análisis de tipo I (con exceso de anticuerpo). Es conocido como ensayos inmunoenzimáticos o técnica del emparedado. Aquí el antígeno reacciona con un exceso estequiométrico de anticuerpo, y el grado de reacción antígeno-anticuerpo se mide en un segundo paso.

Análisis ELISA tipo "sandwich" no competitivo. Se aplica a antígenos bivalentes o polivalentes.

1. El anticuerpo inmovilizado en fase sólida se incuba con los antígenos estándar o de prueba.
2. Luego del lavado, el complejo anticuerpo-antígeno inmovilizado se incuba con exceso de anticuerpo marcado enzimáticamente (que se fija a uno de los sitios antigénicos restantes).

3. Se lava nuevamente.
4. Se añade la solución de sustrato enzimático y se incuba.
5. Al final la reacción del producto de reacción enzimática es directamente proporcional a la concentración del antígeno estándar o analizado.

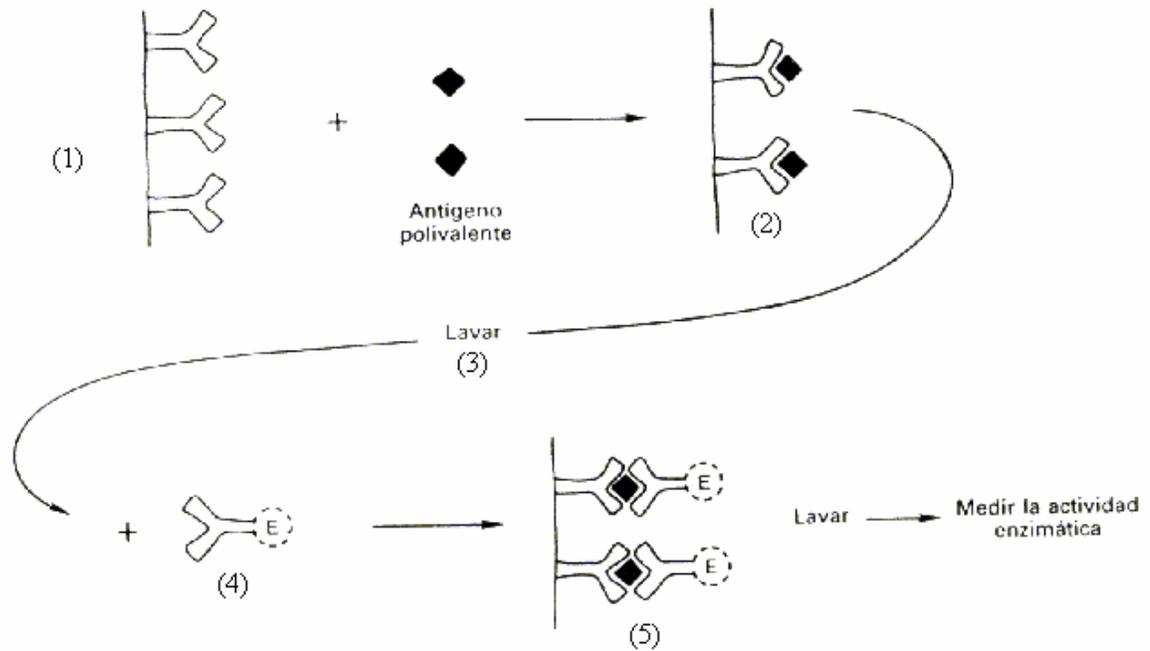


Figura en la que se muestra la reacción ELISA en "sandwich" no competitivo paso por paso.

2.5 Otra variedad de ELISA es el indirecto para medir el anticuerpo.

- 1) Se emplea antígeno inmovilizado, que reacciona con la muestra de anticuerpo.
- 2) Se realiza un lavado.
- 3) Hay una reacción posterior con anticuerpo específico, marcado enzimáticamente.

En forma general , los ELISA son componentes integrales de los laboratorios de inmunología clínica. Los reactivos son menos costosos que los materiales radiomarcados; por ello y por su gran sensibilidad se ha hecho un medio popular para la detección cualitativa y cuantitativa de antígenos y anticuerpos.

3. QUIMIOLUMINISCENCIA.

En los últimos doce años se han perfeccionado nuevos métodos inmunológicos, que utilizan marcadores fluorescentes o luminiscentes, solos o ligados a enzimas, como alternativa válida al RIA⁸; esto es posible gracias al desarrollo de métodos e instrumentación adecuados para la detección de la señal. Estas metodologías, fluorimetría y quimioluminiscencia, pertenecen a sistemas que utilizan energía de emisión. Empero sólo enfocaremos nuestra atención a la quimioluminiscencia que es el método a estudiar en este trabajo.

Los sistemas automatizados por quimioluminiscencia se han ido desarrollando y cada vez son más sencillas las determinaciones inmunológicas con esta tecnología de vanguardia. Es posible realizar una gran variedad de determinaciones de casi todas las áreas del laboratorio clínico tales como: Endocrinología, Inmunología, y Virología, teniendo también grandes aplicaciones como método de detección en inyección en flujo, cromatografía líquida y electroforesis capilar.⁹ Tales características hacen de la técnica un campo de investigación muy interesante en una amplia variedad de disciplinas que incluyen técnicas de separación en análisis químico, biológico, farmacéutico, biomédico y alimentario, control de calidad, etc.

El fenómeno de la quimioluminiscencia se conoce de tiempo atrás y un hecho sorprendente, que cabe mencionar, es que el potencial de aplicación analítica fue reconocido hasta 1947 cuando se aisló por vez primera la luciferasa de la luciérnaga.¹⁰ El desarrollo de las aplicaciones analíticas es relativamente reciente. Su alta sensibilidad y selectividad la hacen una técnica de gran utilidad. Esta metodología ha sido desarrollada con varios marcadores enzimáticos tales como fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, peroxidasa de rábano picante, y la xantina oxidasa,¹¹ y haciendo uso de moléculas quimioluminiscentes tales como el luminol y ciertos ésteres de acridina.

Principio. La quimioluminiscencia se define como la emisión de luz que se produce en algunas reacciones químicas de oxidación. La energía

química que se genera como resultado de la descomposición de un enlace débil produce intermediarios de estado excitado que vuelven a su estado basal emitiendo luz. Existen muchos tipos de moléculas con diversas características estructurales que producen quimioluminiscencia tales como: fosfato de adamantil dioxetano + fosfatasa alcalina, luminol + peroxidasa, ester de acridina + peroxidasa, ácido nítrico + ozono y otros más.⁵ Cuando la emisión proviene de organismos vivos o sistemas derivados de ellos, se le denomina bioluminiscencia. La intensidad de emisión es función de la concentración de las especies químicas implicadas en la reacción quimioluminiscente.

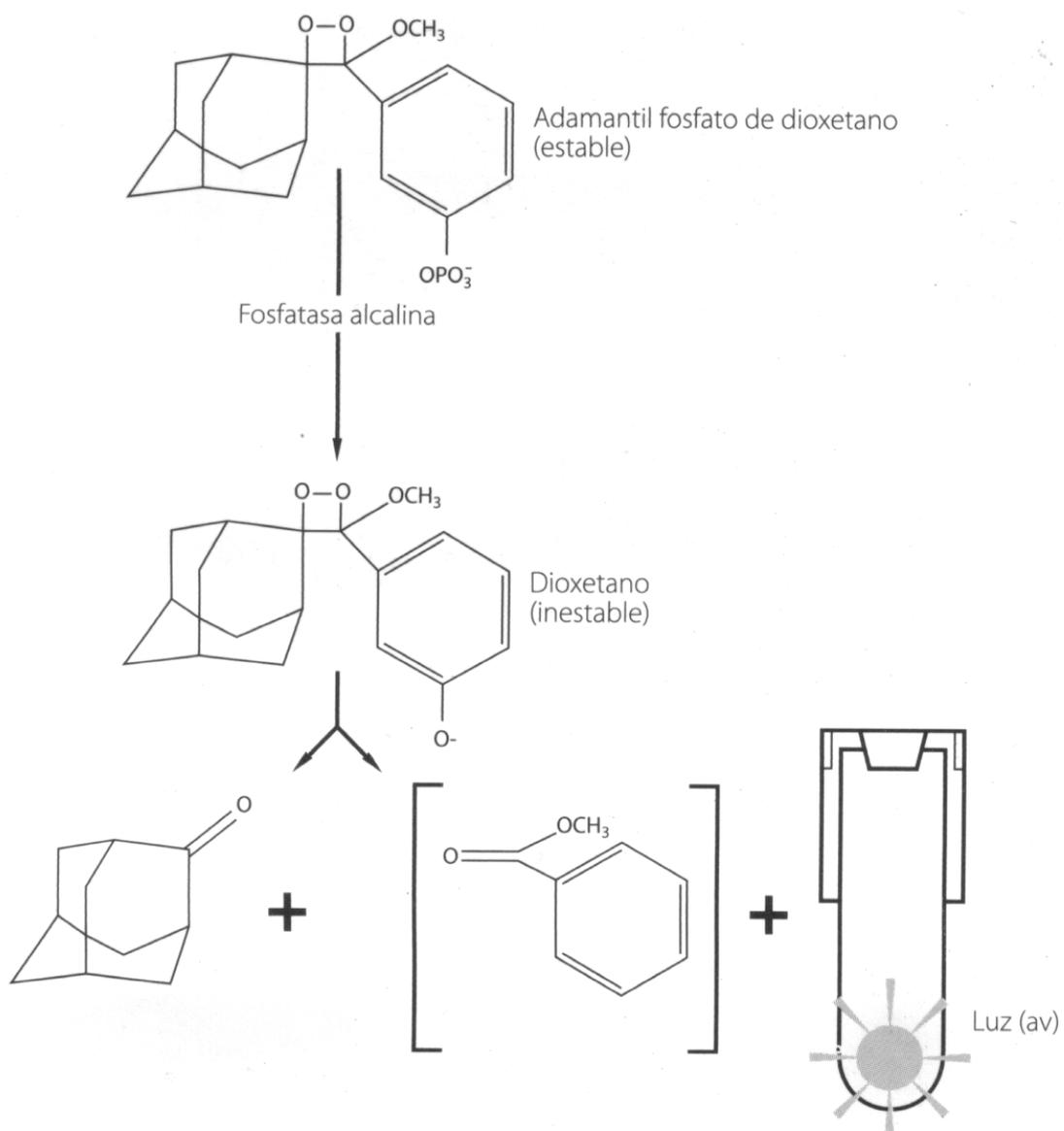
Hay dos variantes del método: Uno es el inmunométrico en fase sólida y el otro es el competitivo en fase sólida. En el primero la cantidad de luz producida es directamente proporcional y en el segundo inversamente proporcional a la concentración del analito en la muestra.^{12,13}

Una ventaja de las técnicas quimioluminiscentes es el empleo de una instrumentación básica bastante sencilla, ya que el sistema óptico no requiere fuente externa de excitación. Empero también hay que considerar algunas limitaciones en el análisis como la dependencia de la emisión quimioluminiscente de varios factores ambientales que se deben controlar, y el hecho de que la emisión quimioluminiscente no es constante puesto que varía con el tiempo (el flash de luz está compuesto de una señal que se produce tras la mezcla de los reactivos, alcanza un máximo y después cae hasta la línea de base), y así también que es una técnica más costosa que el RIA y el ELISA.

La reacción quimioluminiscente se lleva a cabo de la siguiente manera:

- a. El sustrato fosfato de adamantil dioxetano es desfosforilado en presencia de la fosfatasa alcalina.
- b. Se forma un anión intermediario emisor de fotones.
- c. La emisión de fotones se detecta por un luminómetro.

Figura que muestra paso a paso el mecanismo de desforilización del sustrato fosfato de adamantil dioxetano.



III. Planteamiento del Problema.

Laser es un laboratorio clínico de referencia en el que se procesan numerosas pruebas cuantitativas de hormonas, anticuerpos diversos, marcadores de infección, marcadores tumorales, etc., como parte de su servicio de maquila para otros laboratorios foráneos o clientes.

Como parte del proceso de cuantificación de hormonas y algunos anticuerpos diversos en el laboratorio Laser se hace uso de un proceso de cuantificación por **RIA**, el cual por las características del método se ha observado que ya no es adecuado para el proceso tan elevado de muestras por analizar.

Por ello el desarrollo del presente trabajo consistirá en estudiar algunas alternativas metodológicas diferentes al RIA que permitan sustituirlo, evaluando para ello versatilidad analítica, sensibilidad, productividad, interferencias así como costo por prueba y estabilidad de calibración y en almacén.

Las alternativas a estudiar son: ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), e Inmunoanálisis quimioluminiscente (IAQL); métodos de los que se dispondrán en este laboratorio como candidatos para ser comparados con el método de RIA.

IV. OBJETIVOS.

Objetivo general

Realizar la búsqueda y prueba de un método de Inmunoanálisis que emplee un trazador no radioactivo para substituir al RIA.

Objetivo particular:

Determinar que método no isotópico y automatizable pueda ser una alternativa eficiente que substituya al RIA con ventajas.

V. Hipótesis de trabajo:

La evaluación técnica, operativa y económica de los métodos inmunoanalíticos propuestos, nos permitirá determinar la mejor alternativa para substituir al RIA, en el entorno operacional de un laboratorio de alto volumen de trabajo.

VI. Diseño experimental.

Tipo de estudio a) Observacional
b) Transversal

Población de estudio: se analizarán muestras de pacientes y muestras control con los métodos en estudio para definir la mejor alternativa analítica.

Criterios de Inclusión:

La elección de un método analítico en este trabajo depende de los siguientes criterios:

- a) Facilidad de automatización.
- b) Sensibilidad.
- c) Especificidad.
- d) Estabilidad.

Criterios de Exclusión: Aquellos opuestos a los anotados en el punto anterior:

- a) No automatizable
- b) Menor sensibilidad
- c) Menor especificidad
- d) Menor estabilidad

Variables:

- a) Método analítico.
- b) Materiales de calibración.
- c) Materiales de control.
- d) Aparatos para detección y cuantificación de la señal.

MATERIAL Y MÉTODO.

- ✦ Tubos de ensayo de vidrio, policarbonato y polipropileno marca SYM
- ✦ Gradillas metálicas, de plástico y de hule espuma marca SYM
- ✦ Puntas de plástico de diferentes capacidades, para micropipetas automáticas marca Clinical Medical Device
- ✦ Vasos de precipitados marca Pyrex
- ✦ Pipetas volumétricas marca Pyrex
- ✦ Copas de plástico para carga de muestras en autoanalizador marca DPC
- ✦ Recipientes plásticos para desecho de material contaminado marca Biotec
- ✦ Micropipeta automática de volumen fijo 50 ul marca Finnipipette
- ✦ Micropipeta automática de volumen fijo 100 ul marca Finnipipette
- ✦ Micropipeta automática de volumen fijo 200 ul marca Finnipipette
- ✦ Micropipeta automática de volumen variable 10-20 ul marca Finnipipette
- ✦ Micropipeta automática de volumen variable 100-1000 ul marca Finnipipette
- ✦ Frascos pipetores marca Sofilab
- ✦ Cronómetros marca Dade Shack
- ✦ Agitador vortex marca Shelton Scientific
- ✦ Agitador rotatorio horizontal marca América Dade
- ✦ Baño maría a 37 °C marca Ríos Rocha
- ✦ Refrigeradores de 2 – 8 °C marca American
- ✦ Congelador a – 20 °C marca American

Aparatos.

- ✦ Lector espectrofotométrico de placas de microelisa LP400 Leader marca BIORAD.
- ✦ Pozo detector de radiación gamma marca DPC.
- ✦ Inmunoanalizador por quimioluminiscencia marca DPC.

Método.

Evaluación de los siguientes parámetros:

1. Versatilidad:

Realizar la búsqueda de analitos que se procesan en cada una de las metodologías a estudiar en referencias bibliográficas recientes.

Indagar con los proveedores de reactivo que otros analitos se pueden realizar.

2. Productividad:

Determinar el número aproximado de muestras que se pueden analizar en un intervalo de tiempo para cada metodología a estudiar.

3. Interferencias:

Recopilar información de los insertos del kit de reactivos de cada una de las metodologías a estudiar y de algunas referencias bibliográficas recientes.

4. Estabilidad de almacén:

Determinar el tiempo de vigencia desde que se fabrican los reactivos para algunas pruebas y el tiempo en que se reciben en el laboratorio.

5. Estabilidad de calibración:

Evaluar a través de las especificaciones dadas por el fabricante y en la práctica por corridas de controles de un nivel para pruebas de TSH y T4 total.

6. Sensibilidad.

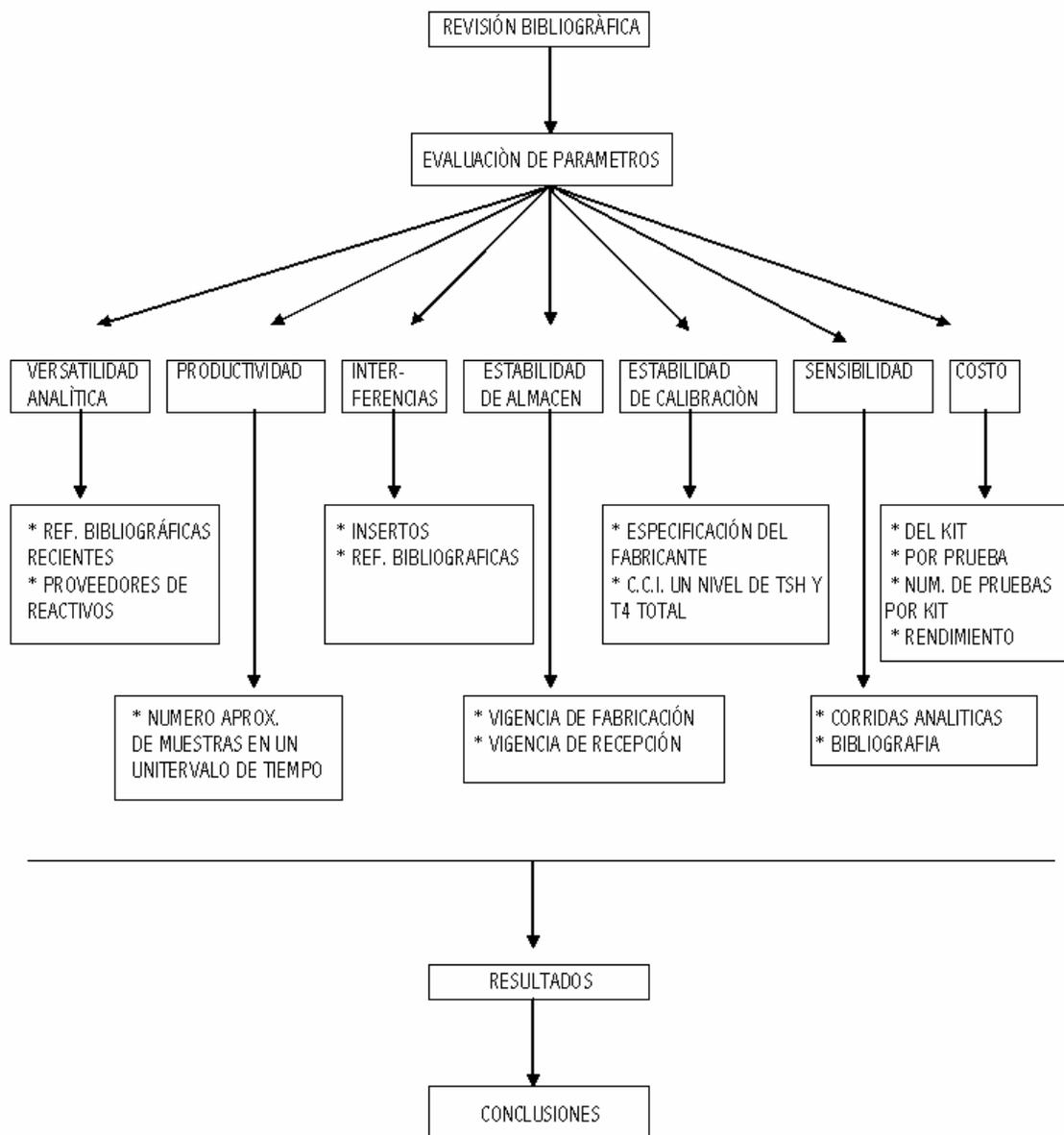
Revisar las corridas analíticas de cada una de las metodologías. Revisar la literatura especializada y la incluida por el fabricante en cada prueba.

7. Costo.

Realizar evaluación contable considerando lo siguiente:

- a) Costo del estuche
- b) Número de pruebas del estuche
- c) Costo por prueba
- d) Rendimientos de los kit de reactivos

DIAGRAMA DE FLUJO.



DISEÑO ESTADÍSTICO.

Consideramos que, dadas las características del trabajo propuesto, en el cual se utilizarán reactivos comerciales cuya sensibilidad y especificidad han sido ya determinadas por los fabricantes, sólo era necesario evaluar estadísticamente la exactitud y la precisión de los ensayos por cada método analítico en prueba. En cada caso, por lo tanto, aplicamos mediciones de desviación estándar, coeficiente de variación y elaboración de gráficas de Levey-Jennings para control y seguimiento.

VII. RESULTADOS OBTENIDOS:

1. Versatilidad analítica. Se exponen a continuación de cada metodología algunos analitos que se determinan.

METODOLOGÍA	ANALITOS
ELISA	Androstenediol glucurónido, Androstenediona, DHEA, DHEA-SO ₄ , Testosterona libre, Testosterona total, Estradiol, Estriol no conjugado ultrasensible, Estrona, Progesterona, Aldosterona, Cortisol (saliva), Cortisol (suero), T3 libre, T3 total, T4 libre, T4 total, Tiroglobulina, Corticosterona en rata, ACTH, TSH, LH, Prolactina, FSH, Proteína C reactiva, Proteína básica de mielina, Alfafetoproteína, CEA, PSA libre, PSA total, Calcitonina, Calcitonina salmón ultrasensible, Osteocalcina, Leptina humana, 17- α OHP ₄ , Beta HCG libre, HCG intacta, Inhibina A y B, Insulina, Péptido C, IGFBP-1 total, IGFBP-3, IGF-1, IGF-1 libre, IGF-2, IGF-2 libre, Subunidad Ácido Lábil Total (ALS), Hormona de crecimiento, CMV IgG, CMV IgM, anti HAV, HAV IgM, anti HBc, anti HBc IgM, anti HBe, anti HBs, anti HD, anti HD IgM, HBs Ag, HBs Ag prueba confirmatoria, HBsAg screening, HD Ag, HBe Ag, H.pylori Ac IgA, H.pylori IgG, Toxo Ac IgG, e IgM, Treponema Pallidum total, Varicela Zoster Ac IgG e IgM, Virus Epstein Barr Ag Primario IgG, EBNA IgG, VCA IgG e IgM, HSV I Ac IgG, HSV Total, HSV Ac IgG e IgM, HSV II, HSV Ac IgG, HSV II Total, GHBP, GH, Parotiditis Ac IgG e IgM, Sarampión Ac IgG e IgM, EBNA IgG, HSV total.
RIA	IgE, Androstenediona, DHEA, DHEA-SO ₄ , Testosterona, Testosterona libre, Factor intrínseco, Ferritina, Vitamina B12 y folatos, Albúmina, Insulina, Glucagón, Péptido C, Anfetaminas, Barbitúricos, Benzodiazepina, Buprenorfina, Canabinoides, Morfina, Cocaína, Fentanil, Nicotina, Opio, Fenciclidina, Digitoxina, Digoxina, Ciclosporina, GH, B2M, Estradiol, Gastrina, TSH, Lactógeno placentario, T3 canino, T4 canino, T4 libre, T3 libre, T4 Neonatal, TSH neonatal, PSA Total, PAP, Prolactina, LH, FSH, Estradiol, Estriol, Cortisol, Aldosterona, 17 α OHP ₄ , TSH neonatal, PSA total, calcitonina, PSA libre, CEA, CA 15-3, CA 19-9, CA 125, T4 neonatal, HCG, anti DNA.

METODOLOGÍA	ANALITOS
IAQL	IgE total, Ferritina, Eritropoyetina, Ácido fólico, Insulina, Ácido valproico, Carbamazepina, Digoxina, Difenilhidantoína, ACTH, FSH, LH, B2M, Osteocalcina, PTH intacta, PSA total, PSA libre, Fosfatasa ácida prostática, Prolactina, Calcitonina, CEA, CA 19-9, CA 125, CA 15-3, Alfafetoproteína, Troponina, Homocisteína, Mioglobina, Teofilina, Chagas IgG, HBs Ag confirmatoria, HBe Ag, CMV IgG, CK-MB, IGFBP-3, GH, IGF-1, Citoquinas IL-1 beta, IL-10, IL-2R, IL-6, IL-8, Nicotina, Canabinoides, Rubéola IgG e IgM, Panel alergias Ala TOP, Ppyrilinks-D, Somatomedina, T3 captación.

La versatilidad de cada método puede calificarse de manera estimativa de la siguiente forma:

ELISA	MUY AMPLIA	100 analitos
RIA	AMPLIA	65 analitos
QUIMIOLUMINISCENCIA	MUY AMPLIA	82 analitos

2. Productividad.

Los resultados que se exponen están basados en el tiempo que tarda cada metodología en arrojar el primer resultado y los resultados posteriores.

Para los métodos de ELISA y RIA se consideraron un número aproximado de 50 a 80 muestras. Del método de quimioluminiscencia fueron tomados en cuenta el tiempo de proceso en el equipo Immulite™ y el de otros equipos de quimioluminiscencia.

METODOLOGÍA	PRODUCTIVIDAD (número de muestras)			
	1 ^a hora	2 ^a hora	3 ^a hora	4 ^a hora
RIA	0	0	0	50 - 80
ELISA	0	0	0	50 - 80
QUIMIOLUMINISCENCIA	0	30 - 120	60 - 240	120 - 880

3. Interferencias.

En la tabla de abajo se citan algunas de las interferencias más comunes que se pueden presentar en los análisis procesados por Quimioluminiscencia.

PRUEBA	INTERFERENCIAS
PSA	Anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas de los componentes del ensayo.
PTH INTACTA	Presencia de bilirrubina conjugada y no conjugada en concentración de hasta 200 mg/L , hemólisis hasta 513 mg/dL y lipemia hasta 3000 mg/dL pueden causar disminución de los valores.
GH	Niveles de 200 mg/L de bilirrubina interfieren con el ensayo, causando una ligera disminución de los resultados.
INSULINA	Una ictericia grave (hasta 200 mg/L de bilirrubina) puede provocar un descenso en los valores.
Anticuerpos contra H.pylori	Anticuerpos heterofílicos.

En esta tabla se exponen las interferencias de algunas de las pruebas procesadas por ELISA.

PRUEBA	INTERFERENCIAS
Ac. anti Rubéola IgM	IgG específica y factor reumatoide en algunos especímenes.
H.pylori IgM	Interferencias analíticas: presencia de anticuerpos heterofílicos.
Ac. anti salmonella	Falsos positivos en enfermos con alteraciones hepáticas, paludismo, artritis reumatoide. Ciertas reacciones cruzadas con otras bacterias entéricas y del género Salmonella.
HAV	La contaminación bacteriana de las muestras o las repetidas congelaciones/descongelaciones pueden modificar los valores de absorbancia.
Ac. anti HIV-1	Falsos positivos: en sujetos con trastornos inmunológicos o que han recibido múltiples transfusiones.

En esta tabla se muestran las interferencias para alguna de las pruebas procesadas por RIA.

PRUEBA	INTERFERENCIAS
T4 total	Analíticas: administración de radioisótopos, precipitación de proteínas.
FSH	Baja reacción cruzada con hormonas glicoprotéicas como HCG, LH Y TSH.
T3 total	Analíticas: administración de materiales radioactivos.

4. Estabilidad de almacén.

Se presentan algunas pruebas como ejemplo, para cada metodología.

A) En Radioinmunoanálisis.

Prueba	Tiempo de vigencia	Temperatura de almacenamiento.
FSH CORTISOL PROGESTERONA ESTRADIOL LH TESTOSTERONA LIBRE TESTOSTERONA TOTAL T4 TOTAL TSH	60 días desde su fabricación. 30 días desde su recepción en promedio.	2 a 8 °C

B) En Quimioluminiscencia.

Prueba	Tiempo de vigencia	Temperatura de almacenamiento
ACTH PTH H.pylori IgE DHS CA 125 VAL PSA GH	1 año desde su fabricación. 8 meses desde su recepción.	2 a 8 °C

C) En ELISA

Prueba	Tiempo de vigencia	Temperatura de almacenamiento
HSV2 IgM H.pylori IgM Rubéola IgG CMV IgG Toxo IgG Toxo IgM	1 año desde su fabricación. 8 meses desde su recepción.	2 a 8 °C

5. Estabilidad de calibración.

En la revisión de este parámetro para las pruebas presentadas en el punto anterior, el fabricante recomienda lo siguiente:

- ◆ En ELISA, debe realizarse diariamente la calibración para cada analito a determinar.
- ◆ En QUIMIOLUMINISCENCIA, la calibración se hace cada 2 a 4 semanas dependiendo del analito a determinar.
- ◆ En RIA, debe realizarse la calibración diariamente para cada analito a determinar.

Los datos obtenidos se resumen de la siguiente manera:

<i>Método</i>	<i>Intervalo de Calibración</i>
ELISA	Una vez al día
QUIMIOLUMINISCENCIA	Una vez cada 15 a 30 días
RIA	Una vez cada semana

Como podrá observarse, sólo para la prueba de RIA, cambió la especificación debido a un estudio interno en el laboratorio sobre validación de la calibración para dicha metodología, por lo que se calibra una vez a la semana.

6. Sensibilidad.

En este apartado se expone la sensibilidad general de cada metodología que se obtuvo en la literatura especializada (13 , 22)

Método	Sensibilidad
ELISA	$\mu\text{g/dL}$
RIA	pg/mL
QUIMIOLUMINISCENCIA	fg/mL

7. Costo.

A modo de ejemplo se exponen los precios promedio de reactivo de algunas pruebas (Costo reactivo por análisis):

RIA.	ELISA.	QUIMIOLUMINISCENCIA.
a) DHEA \$29.38	a) Ac. Smith \$44.03	a) CA 125 \$45.41
b) FSH \$15.19	b) SSA \$68.52	b) CA 15-3 \$58.31
c) TSH \$11.91	c) SSB \$55.86	c) CEA \$29.39

Encontramos así que:

Método	Estimación de costo	Costo promedio (México 2003, Pesos)
ELISA	MUY COSTOSO	\$ 37.9
RIA	DE MENOR COSTO QUE ELISA Y QUIMIOLUMINISCENCIA	\$ 11.9
QUIMIOLUMINISCENCIA	COSTO INTERMEDIO	\$ 17.2

En esta tabla se expone el rendimiento del kits de reactivos en porcentaje, que depende del número promedio de muestras que se procesan por corrida:

MÉTODO	RENDIMIENTO
RIA	75 - 85 %
QUIMIOLUMINISCENCIA	80 %
ELISA	45 %

Las mediciones de la composición de muestras obtenidas de pacientes se ven afectadas por muchas fuentes de variación, lo cual fue reconocido desde 1931 por Shewart quien en ese año publicó el primer libro de Control de Calidad Interno para Laboratorios Farmacéuticos, y fue hasta 1950 cuando Levey y Jennings lo introdujeron a los laboratorios clínicos de Estados Unidos.

El control de Calidad Interno se basa en el empleo de muestras control cuyas valoraciones se registran en las denominadas gráficas de Levey-Jennings y mediante la aplicación de las reglas de control de Westgard, se observa si la determinación está o no fuera de control. Se citan a continuación las reglas y sus condiciones:

<i>REGLA</i>	<i>CONDICIÓN</i>
1-2s	Un valor entre + 2s-3s.
1-3s	Un valor fuera de + 3s.
2-2s	Dos valores consecutivos del mismo lado y entre + 2s y dos 3s.
-4s	Un intervalo de diferencia entre dos valores consecutivos, que excede de 4s.
4-1s	Cuatro valores consecutivos del mismo lado y entre + 1s- 2s.
10x	Diez valores consecutivos del mismo lado entre la media y 1s.
2 de 3-2s	Dos de tres datos, del mismo lado del promedio y entre + 2s-3s.

Los datos de valores individuales de control de calidad de cada una de las metodologías se exponen en tablas y a continuación los gráficos correspondientes a cada una:

Tabla I. Informe de Valores Individuales de T4 total por RIA.
 Laboratorio 821392
 LAB. DE ASESORIA Y SERVICIO REFERIDO
 Control CON 6 DPC Coat-A-Count $\mu\text{g/dL}$
 Lote 19 m-12

Fecha Agosto 2003	Acción ó Comentario	Nivel 1 Valor
Día 1		
2		12.32
3	Sin proceso	
4	Sin proceso	
5		12.4
6		11.93
7		11.42
8		12.09
9		11.22
10	Sin proceso	
11	Sin proceso	
12	Sin proceso	
13		12.0
14		12.30
15		12.19
16		11.39
17	Sin proceso	
18	Sin proceso	
19	Sin proceso	
20		12.1
21		12.38
22		11.99
23		11.61
24	Sin proceso	
25	Sin proceso	
26		14.0
27		11.73
28		11.68
29		11.36
30		11.73
		X=11.99 SD=0.6092 C.V.=5.08

Nota: sin proceso significa que no se corrieron muestras.

Gráfico de Levey-Jennings de T4 total por RIA

Control DPC Coat-A-Count $\mu\text{g}/\text{dL}$

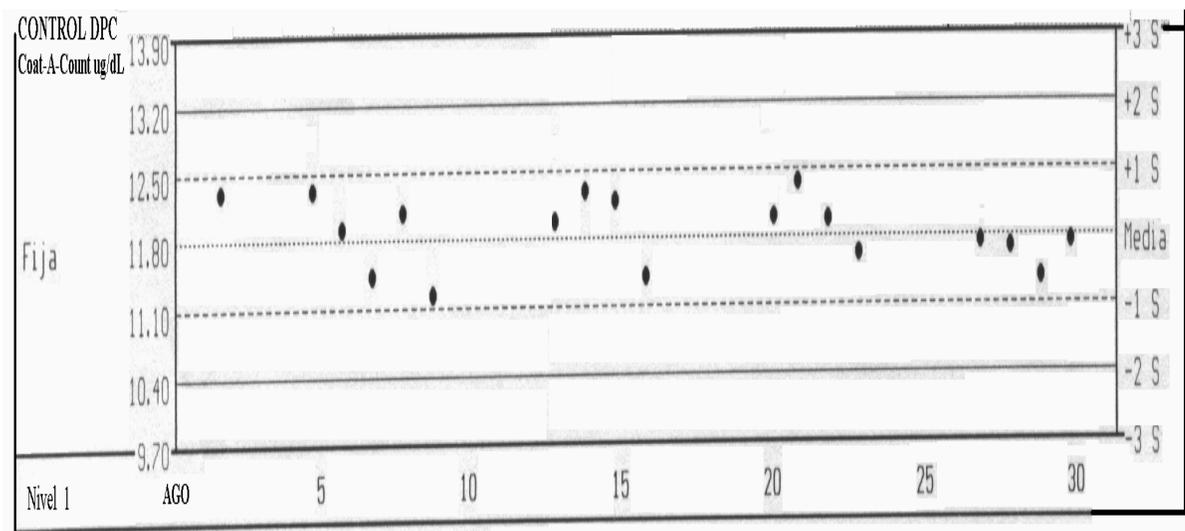


Tabla II. Informe de Valores Individuales de TSH por RIA
 Laboratorio 821392
 LAB. DE ASESORIA Y SERVICIO REFERIDO
 Control CON 6 DPC Coat-A-Count $\mu\text{UI}/\text{mL}$
 Lote 19 m-12

Fecha Agosto 2003	Acción ó Comentario	Nivel 1 Valor
Día 1		16.30
2		17.02
3		16.72
4		16.55
5		18.43
6	Recalibración	16.04
7		17.43
8		16.02
9		17.14
10		14.77
11		15.90
12	Recalibración	17.09
13		17.07
14		17.23
15		16.66
16		17.28
17		17.02
18		15.75
19		17.47
20		14.21
21		17.65
22		16.59
23		16.00
24		16.80
25		16.21
26		17.10
27		17.00
28		16.70
29		17.62
30		17.28
31		16.54
		X=16.69 SD=0.8383 C.V.=5.02

Gráfico de Levey-Jennings de TSH total por RIA

Control DPC Coat-A-Count $\mu\text{UI/mL}$

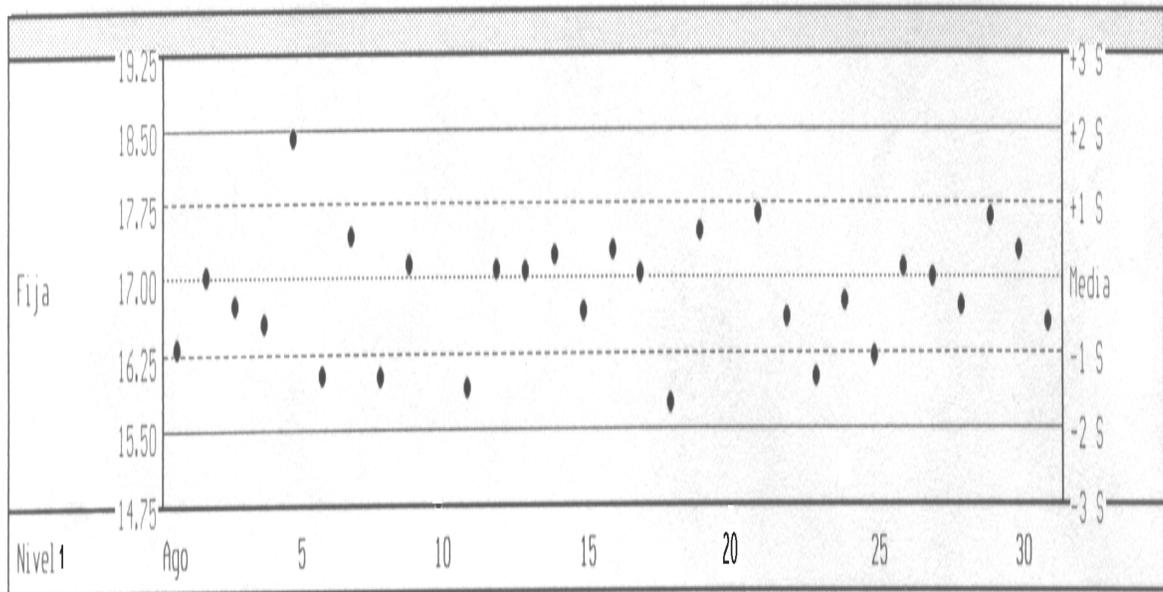


Tabla III. Informe de Valores Individuales de TSH por QUIMIOLUMINISCENCIA.

Laboratorio 821392

LAB. DE ASESORIA Y SERVICIO REFERIDO

Control CON6 DPC $\mu\text{UI/mL}$

Lote 18 m-5

Fecha Agosto 2003	Acción ó Comentario	Nivel 1 Valor
Día 1	Sin proceso	
2		17.9
3	Sin proceso	
4	Sin proceso	
5		18.0
6		18.8
7		18.3
8	recalibración	18.6
9		18.8
10	Sin proceso	
11	Sin proceso	
12	Sin proceso	
13		18.6
14		19.1
15		18.8
16		18.1
17	Sin proceso	
18	Sin proceso	
19	Sin proceso	
20		18.4
21		18.7
22		18.2
23		18.5
24	Sin proceso	
25		18.1
26		18.7
27		18.6
28		18.6
29		18.4
30		18.1
31		
		X = 18.46 SD = 0.3216 CV = 1.74

Gráfico de Levey-Jennings de TSH por QUIMIOLUMINISCENCIA.

Control DPC $\mu\text{UI/mL}$

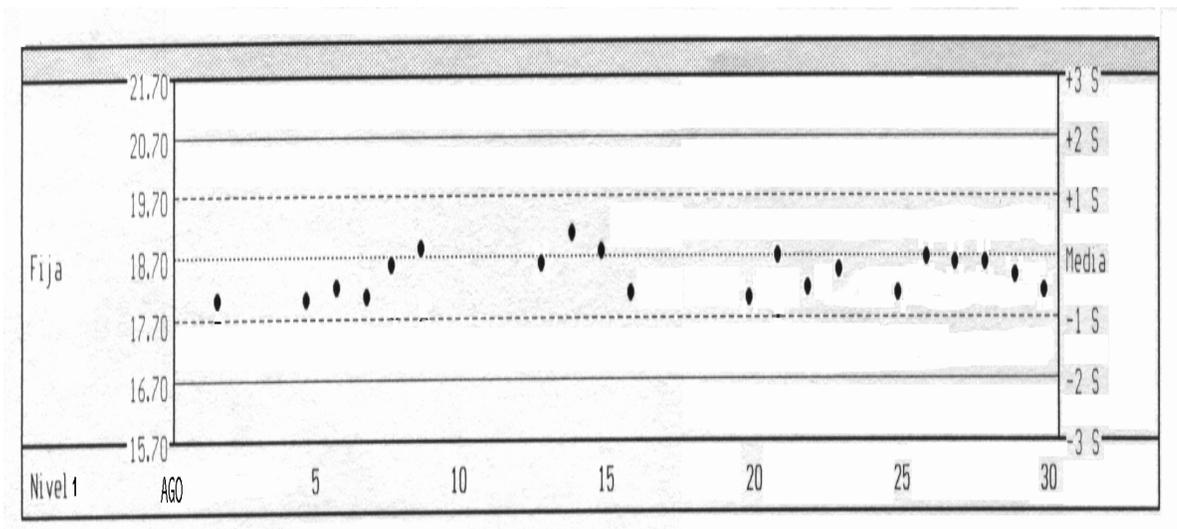


Tabla IV. Informe de Valores Individuales de T4 total por QUIMIOLUMINISCENCIA.

Laboratorio 821392

LAB. DE ASESORIA Y SERVICIO REFERIDO

Control CON6 DPC $\mu\text{g/dL}$

Lote 18 m-5

Fecha	Acción Comentario	Nivel 1 Valor
Agosto 2003		
Día 1	Sin proceso	
2		2.01
3	Sin proceso	
4	Sin proceso	
5		2.36
6		2.01
7		2.27
8		2.40
9		2.33
10	Sin proceso	
11	Sin proceso	
12	Sin proceso	
13		2.25
14		2.25
15		2.30
16		2.29
17	Sin proceso	
18	Sin proceso	
19	Sin proceso	
20		2.29
21		2.38
22		2.42
23		2.35
24	Sin proceso	
25		2.07
26		2.32
27		2.18
28		2.41
29		2.16
30		
31		
		X = 2.26 SD = 0.1267 CV = 5.59

Gráfico de Levey-Jennings de T4 total por QUIMIOLUMINISCENCIA.

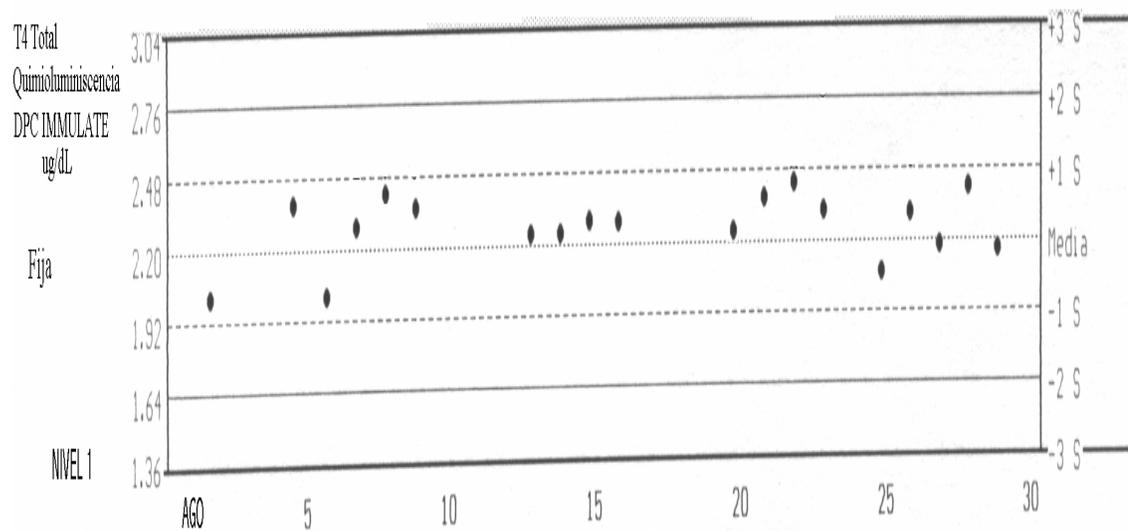


Tabla V. Informe de valores individuales de TSH por ELISA

Control interno TSH 0.4 - 3.0
0.18
1.2
1.2
1.2
1.1
1.2
1.2
1.2
1.6
1.2
1.1
1.0
1.2
X=1.2
SD=0.13
CV=10.83

Gráfico de Levey-Jennings de TSH por ELISA

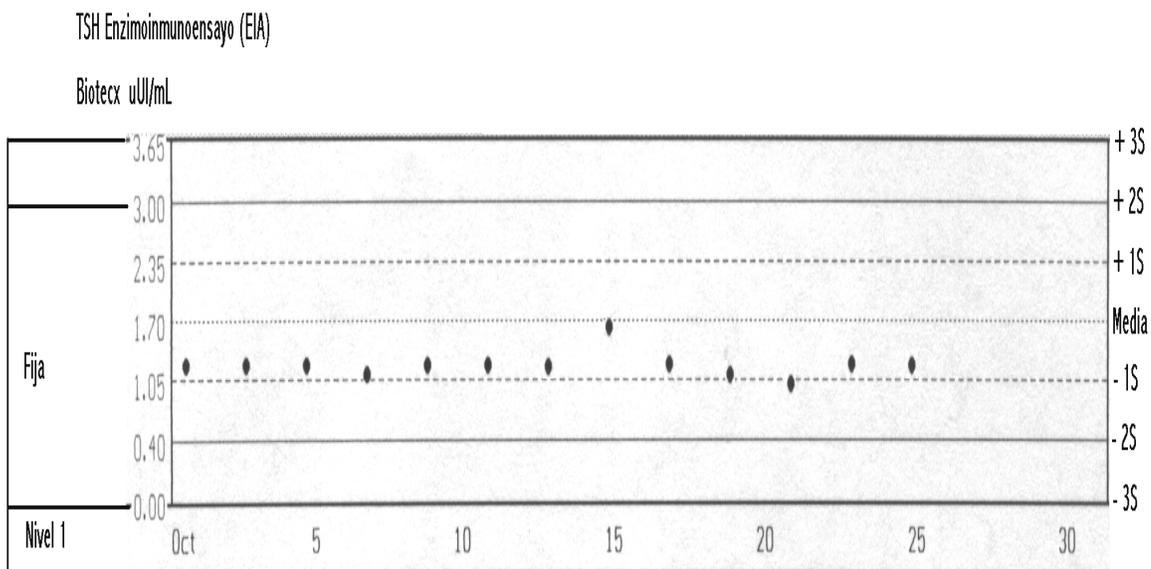


Tabla VI. Informe de valores individuales de T4 por ELISA

Control interno T4 5.5 - 11.5
1.7
8.6
7.6
9.0
9.0
7.0
9.4
9.6
8.4
10.2
9.0
8.6
8.0
X=8.13
SD=2.12
CV=26.0

Gráfico de Levey-Jennings de T4 por ELISA

T4 Total Enzimoinmunoensayo (EIA)

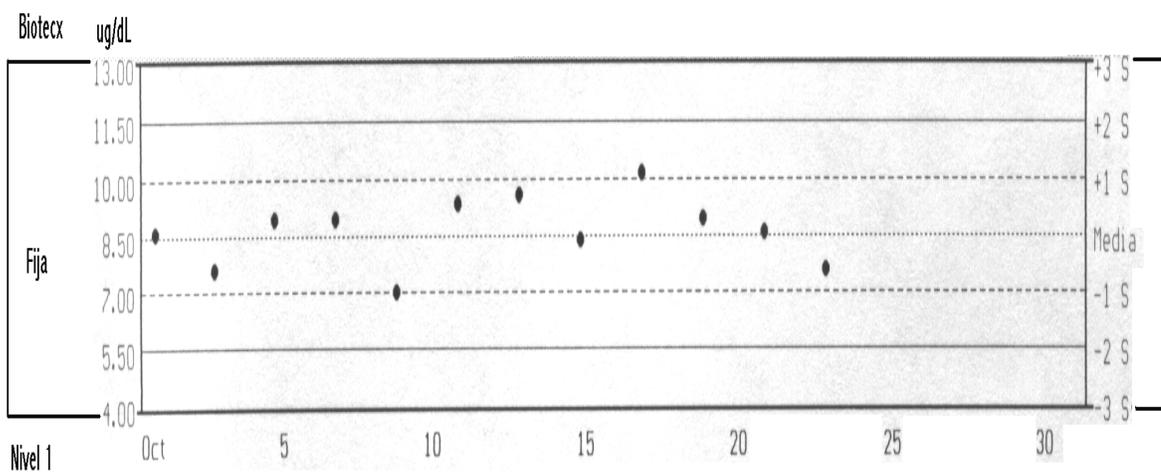


Tabla VII. Resultados de TSH total de pacientes, obtenidos por RIA y ELISA.

TSH RIA (μ UI/mL)	ELISA (μ UI/mL)	Diferencia en %
5.8	5.7	1.72
3.0	2.8	6.66
23.0	24.1	4.7
2.5	2.6	4.0
4.2	3.5	16.66
3.1	2.6	16.13
3.1	2.8	9.67
1.6	1.39	13.12
2.6	2.2	15.38
3.9	3.5	10.25
3.6	3.8	5.55
1.0	0.87	13.0
4.6	4.4	4.34
1.1	1.2	9.09
3.8	3.9	2.63
1.1	1.0	9.09
2.6	2.3	11.53

Tabla VIII. Resultados de TSH total de pacientes, obtenidos por RIA y QUIMIOLUMINISCENCIA.

TSH RIA (μ UI/mL)	QUIMIOLUMINISCENCIA (μ UI/mL)	Diferencia en %
5.8	5.6	3.57
3.0	2.9	3.44
23.0	23.5	2.17
2.5	2.4	4.16
4.2	4.1	2.43
3.1	3.0	3.33
3.1	3.0	3.33
1.6	1.7	5.88
2.6	2.7	3.70
3.9	3.8	2.63
3.6	3.7	2.70
1.0	0.9	11.11
4.6	4.6	0.0
1.1	1.2	8.33
3.8	3.7	2.70
1.1	1.0	10.0
2.6	2.4	8.33

Tabla IX. Resultados de T4 total de pacientes, obtenidos por RIA y ELISA.

T4 RIA (ug/dL)	ELISA (ug/dL)	Diferencia en %
7.1	6.0	15.5
8.4	8.6	2.3
6.4	6.6	3.12
9.0	8.4	6.66
8.6	8.0	6.9
8.87	9.0	1.46
7.94	7.4	6.8
7.5	7.0	6.66
9.1	9.6	5.5
5.2	5.8	11.5
7.8	8.0	2.5
9.8	8.8	10.2
11.5	11.0	4.3
8.8	8.7	1.13
7.9	7.0	11.3
7.9	7.4	6.3
8.8	7.2	18.1
9.0	8.2	8.88
7.8	7.0	10.2
4.5	4.8	6.66
7.5	6.4	14.66

Tabla X. Resultados de T4 total de pacientes, obtenidos por RIA y Quimioluminiscencia.

T4 RIA (ug/dL)	QUIMIOLUMINISCENCIA (ug/dL)	Diferencia en %
7.1	6.9	
8.4	8.6	2.3
6.4	6.6	3.12
9.0	8.4	6.66
8.6	8.0	6.9
8.87	9.0	1.46
7.94	7.4	6.8
7.5	7.0	6.66
9.1	9.6	5.5
5.2	5.8	11.5
7.8	8.0	2.5
9.8	8.8	10.2
11.5	11.0	4.3
8.8	8.7	1.13
7.9	7.0	11.3
7.9	7.4	6.3
8.8	7.2	18.1
9.0	8.2	8.88
7.8	7.0	10.2
4.5	4.8	6.66
7.5	6.4	14.66

Cuadro comparativo de Coeficientes de Variación de las metodologías en estudio.

TSH

CV % INTRAENSAYO	ELISA	RIA	QUIMIOLUMINISCENCIA
	9.03	N1 5.0	N1 1.74

CV % INTERENSAYO	ELISA	RIA	QUIMIOLUMINISCENCIA
	10.83	N1 1.8	N1 1.7

T4 TOTAL

CV % INTRAENSAYO	ELISA	RIA	QUIMIOLUMINISCENCIA
	7.07	N1 5.0	N1 5.5

	ELISA	RIA	QUIMIOLUMINISCENCIA
CV % INTERENSAYO	26.0	N1 3.1	N1 4.5

N1 = Nivel 1 de suero control con valores de 16.7 a 20.7 μ UI/mL por quimioluminiscencia para TSH.

N1 = Nivel 1 de suero control con valores de 1.64 a 2.76 ug/dL por quimioluminiscencia para T4 total

N1 = Nivel 1 de suero control con valores de 15.5 a 18.5 μ UI/mL por RIA para TSH.

N1 = Nivel 1 de suero control con valores de 10.4 a 13.2 ug/dL por RIA para T4 total.

N1 = Nivel 1 de suero control con valor de 0.40 a 3.0 μ UI/mL por ELISA para TSH.

N1 = Nivel 1 de suero control con valor de 5.5 a 11.5 ug/dL por ELISA para T4 total.

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

A partir de los resultados obtenidos al realizar corridas y comparaciones de los métodos aquí estudiados se realiza el siguiente análisis:

Se eligieron los parámetros evaluados porque se consideraron suficientes para establecer una comparación de otros métodos diferentes al RIA y encontrar el más apropiado para resolver la problemática planteada en el laboratorio Laser®.

Versatilidad analítica:

Existen pruebas que es posible realizar por las tres técnicas.

El resultado obtenido indica que el método de Quimioluminiscencia es de más amplia versatilidad que el método de RIA.

El método de ELISA es de muy elevada versatilidad que el método de Quimioluminiscencia y RIA.

Productividad:

El resultado obtenido nos indica que el método de mayor productividad es el de Quimioluminiscencia por el gran número de muestras que se pueden procesar en menor tiempo que los métodos de ELISA y RIA.

Interferencias:

Estas fueron comparadas con base en referencias bibliográficas recientes, así como de la opinión derivada de personal químico analista de laboratorio Laser®.

El resultado encontrado nos indica que el método con menor número de interferencias es el RIA en comparación con ELISA y Quimioluminiscencia.

Estabilidad de almacén:

El resultado obtenido muestra que los reactivos de Quimioluminiscencia y ELISA son mucho más estables que los de RIA, en función de su corta caducidad del marcaje radioisotópico.

Pero el de mayor estabilidad de almacén es el de Quimioluminiscencia en comparación con ELISA y RIA.

Estabilidad de calibración:

Por el contrario en el caso de la Quimioluminiscencia se encontró que la estabilidad de las curvas de calibración puede prolongarse hasta 2-4 semanas dependiendo del analito en comparación con ELISA y RIA.

El método de RIA es más estable en su calibración que el de ELISA, ya que la estabilidad de este último está sujeta a la labilidad de enzimas y sustratos.

Sensibilidad:

Los resultados obtenidos nos muestran que el método de Quimioluminiscencia es de mayor sensibilidad que RIA y ELISA.

También se encontró que el método de RIA es más sensible que el de ELISA.

Costo:

El resultado obtenido nos indica que el método de RIA presenta el menor costo reactivo por prueba de las metodologías estudiadas.

Sin embargo, la imposibilidad de automatizar el RIA da lugar en un laboratorio de alto volumen a mayores costos por mano de obra y fallas operativas.

En consecuencia el método que resulta de menor costo, integralmente, es la Quimioluminiscencia.

IX. CONCLUSIONES.

1. El método de quimioluminiscencia (IAQL) reporta menor CV tanto intraensayo como interensayo para el analito TSH que los métodos de ELISA Y RIA.
2. El método de quimioluminiscencia (IAQL) reporta menor CV tanto intraensayo como interensayo para el analito T4 que el ELISA
3. El método RIA reporta menor CV tanto intraensayo como interensayo para T4 que quimioluminiscencia (IAQL) y ELISA.
4. El hecho de que el método de quimioluminiscencia (IAQL) sea automatizado le permite contar con un menor número de pasos en su procedimiento, lo cual minimiza la probabilidad de error.
5. La posibilidad de automatizar los ensayos mediante el método de quimioluminiscencia (IAQL) permite analizar altos volúmenes de muestras manteniendo bajos CV.
6. La automatización que el método de quimioluminiscencia (IAQL) incorpora, permite disminuir la fatiga del operador, contribuyendo a disminuir la probabilidad de error humano.
7. Para un laboratorio de volumen de trabajo bajo o medio, el mayor tiempo de vigencia de los reactivos de quimioluminiscencia (IAQL) o ELISA constituye una ventaja substancial ya que le permite seguir usando los reactivos durante varios meses, con el consiguiente mejor aprovechamiento de los mismos.
8. Para el caso de laboratorios de alto volumen de trabajo, el mayor tiempo de vigencia de los reactivos frecuentemente no constituye una ventaja ya que se consumen en pocos días, sin embargo si aporta una mayor garantía de estabilidad de los mismos.
9. El hecho de que la quimioluminiscencia (IAQL) requiera calibraciones menos frecuentes constituye una ventaja ya que disminuye trabajo y costo.
10. La quimioluminiscencia (IAQL) cuenta con la ventaja de una mayor sensibilidad, permitiendo una gran versatilidad analítica.
11. El método de RIA tiene la ventaja de presentar menos interferencias que la quimioluminiscencia (IAQL) y el ELISA.

12. En un principio se había propuesto analizar 4 metodologías diferentes. De ellas solamente 3 fueron las investigadas, debido a que el método de electroquimioluminiscencia es significativamente más costoso.

13. En base a todos los hallazgos encontrados en la evaluación de las metodologías, encontramos finalmente que resulta más viable incorporar el método automatizado de quimioluminiscencia (IAQL), en sustitución parcial o total de las pruebas que hasta el momento se han resuelto mediante RIA, resolviéndose con ello la problemática planteada en el diseño original del presente trabajo.

XI. ANEXO

A través de la metodología del RIA se obtienen determinaciones reproducibles de las concentraciones de muestras y las características de sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión son excelentes, sin embargo existen ciertas desventajas tales como:

Desventajas del Radioinmunoanálisis.

- a) Radiación a personal expuesto.
- b) Método manual (no automatizable).
- c) Es susceptible al error humano.
- d) Requerimiento de licencia especial.
- e) Inestabilidad y vigencia corta de reactivos.

Se expone a continuación una tabla comparativa de las metodologías en estudio y se incluye el método de electroquimioluminiscencia como dato adicional.

TABLA I. Comparación de características en general de los métodos en estudio.^{8,15}

CARACTERISTICA	RIA	ELISA	IAQL	IAEQL
Sensibilidad	Elevada (pg)	Moderada (ng)	Muy elevada (fg)	Muy elevada (fg)
Especificidad	Muy alta para la mayor parte de los analitos.	Muy alta para la mayor parte de los analitos.	Muy alta	Muy alta
Versatilidad	Amplia	Muy amplia	Amplia, mayor que la de RIA.	Amplia
Facilidad de automatización	No automatizable	Moderadamente automatizable	100 %	100 %
Interferencias	Otras fuentes de radiación	Hemólisis	Anticuerpos heterofilicos. Moléculas apagadoras de luz.	Moléculas apagadoras de luz.
Estabilidad de calibración	1 semana	Estabilidad sujeta a labilidad de enzimas y substratos. (1 - 15 días)	De 15 días a 1 mes.	De 15 días a 1 mes.
Estabilidad en almacén	7 semanas	4 - 8 meses	6 - 12 meses	6 - 12 meses
Costo	Menor costo por prueba para la mayor parte de los analitos.	Intermedio para la mayor parte de los analitos.	Prueba más costosa que el RIA y el ELISA	Prueba más costosa que el RIA y el ELISA

X. BIBLIOGRAFÍA.

1. http://fmed2.uncu.edu.ar/biblioteca/ebooks/patología_tiroidea/ca_p5.htm
2. Garza J, Díaz V, Vázquez S, Brandeis A, Romero C. El radioinmunoanálisis y su control de calidad. México: ININ, 1996: 1-85.
3. Rose NR. "Manual of clinical laboratory immunology". American society for microbiology. Washington DC, 1997.
4. Van Regenmortel MHV. The antigen-antibody reaction. En: Principles and practice of immunoassay. Price CP, Newman DJ (eds). Macmillan 1997: 13-34.
5. González de Buitrago JM, Rodríguez A. Fundamentos de los Inmunoanálisis. España: DPC DIPESA, S.A., 2000.
6. Nakamura R, Tucker E, Carlson I. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. México: McGraw-Hill, 1991: 873-907.
7. Christopoulos TK, Diamandis EP. Theory of immunoassays. En: Immunoassay. Diamandis EP, Christopoulos TK (eds). Academic Press 1996: 25-50.
8. Schall RF, Tenoso JH. "Alternatives to radioimmunoassay labels and methods". Clin.Chem, 1981; 27: 157.
9. García-Campaña AM, Baeyens WRG, Zhang X, Alés F, Gámiz L. Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo. Ars Farmacéutica, 2001:81-107.
10. Kricka U. Chemiluminiscent and bioluminescent techniques. Clin.Chem 1991;37:1472-1481.
11. Weeks I. Chemiluminescence immunoassay. En: Principles and Practice of immunoassay. 2a. ed. Price CP, Newman DJ. Stockton Press, 1997: 425-442.
12. Kricka L.J. Chemiluminescence immunoassay. Academic Press, San Diego, California, 1997: 337-353.
13. Kricka L.J. Chemiluminescence and bioluminescence. Anal. Chem 1999;71: 305R-308R.
14. Leland JK, Powell MJ. Electrogenerated Chemiluminescence: An Oxidative-Reducción Type ECL Reaction/Sequence Using Tripropyl amine. J. Electrochem. Soc, 137(1990) 3127-3131
15. Kenten JH, Casadei J, Link J. Rapid Electrochemiluminescence Assay of Polymerase Chain Reaction Products. Clinical Chemistry, 37(1991) 1626-1632.
16. Hoyle NR, The application of Electro chemiluminescence to Immunoassay based Analyte Measurement. University of Cambridge, England, September 5-8, 1994.

17. Rodgers RPC: "Data analysis and quality control of assays: A practical primer ". In: Practical Immunoassay: The State of the Art. Butt WR (editor). Dekker, 1984: 71-101.
18. Gottfried EL, Gerard S. "Selection and interpretation of laboratory tests and diagnostics procedures". In: Textbook of Clinical Diagnostics in Medicine. Samly AH et al. (editors). Lea and Febiger, 1987: 19-38.
19. Shepherd P, Dean C. "Monoclonal antibodies". The Practical Approach Series. Oxford University Press INC., New York, 2000.
20. Johnstone AP, Turner MW. "Immunochemistry 1": A practical approach. Oxford University Press. Oxford England, 1997.
21. Johnstone AP, Thorpe R. "Immunochemistry in Practice", 3a.ed. Blackwell Science Ltd Oxford England, 1966.
22. Santoscoy F, Santoscoy J. Catálogo de pruebas de UPC , 6ª.ed. Guadalajara, 1997.
23. Inserto del fabricante, IMMULITE PILKAP-4. Los Angeles, CA 2002. Inserto del fabricante, IMMULITE PYLKAP-7. Los Angeles , CA 2002.
24. Inserto del fabricante, IMMULITE PIKFS-1. Los Angeles, CA 2002. Harris EN, Gharavi AE, Hughes GRV. Anticardiolipin antibody testing: the need for standarization Arth, Rheum, 1987; 30: 835-837.
25. Matheson BA, Chisholm SM, Ho-Yen DO. J.Clin. Pathol. Assessment of rapid ELISA test for detection of Epstein Barr virus infection.43:691-693.
26. Diagnostic Automation, ANA Screen ELISA. U.S.A.
27. Manual Operativo Immulite. (DPC) 600032, Revisión F, Versión 3, XX. Marzo 1, 1998.
28. Jacobs DS, et al. 1994. Laboratory Test Handbook. Ed. Lexi-comp Inc.3a.ed. Kansas USA.
29. Diagnostic Products Corporation TSH . Los Angeles, CA 90045-5597. October 6 1999:1-8
30. Diagnostic Products Corporation T4T. Los Angeles, CA 90045-5597. October 6 1999:1-6
31. Van Regenmortel MHV. The antigen-antibody reaction. En: Principles and practice of immunoassay. Price CP, Newman DJ (eds). Macmillan 1997: 13-34.
32. Raggat PR. Data manipulation. En : Principles and Practice of Immunoassay. Price CP, Newman DJ(eds). Macmillan 1997: 269-98.
33. Stenman U-H. Standardisation of Immunoassays. En: Principles and Practice of Immunoassay. Price CP, Newman DJ(eds). Macmillan 1997: 245-268.

34. Sutherland R, Simpson B, Allman B. Surface effect immunoassay. En: principles and Practice of immunoassays. CP Price, DJ Newman, eds. Stockton Press, New York, 1991: 515-542.
35. Carter JH. Enzyme immunoassays: practical aspects of their methodology. J. Clin. Immunoassay 1994;7: 64-72.
36. Chan DW, Sokoll L.J. Immunoassay automation at the millennium. J. Clin. Ligand Assay 1999;22: 10-24.
37. Hage DS. Immunoassays. Anal. Chem 1999; 71: 294R-304R.
38. Kricka L.J. Principles of immunochemical techniques. The W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pa., 1999: 205-225.
39. Malvano R.A, Boniolo D, Zannino M. ELISA for antibody measurement: aspects related to data expresión. J. Immunol. Meth 1992;48: 51-60.
40. Miller J, Levinson S. Interferences in immunoassay. Immunoassay. Academic Press, San Diego, Calif. 1996: 165-190.
41. Nakamura R, Dito WR, Tucker ES. Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980s. Laboratory and Research Methods in Biology and Medicine, vol.4. Alan R. Liss, Inc, New York, N.Y. 1980.