



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“ANÁLISIS COMPARATIVO DE MÉTODOS INMUNOLÓGICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE INSULINA HUMANA EN SUERO”

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA
ESPECIALIZACIÓN EN BIOQUÍMICA CLÍNICA

P R E S E N T A :

Q. F. B. MIRIAM ENRIQUEZ PIMENTEL

Directora de Tesina:
Dra. Marta A. Menjívar Iraheta

Ciudad Universitaria, septiembre de 2007.



Especialización en Bioquímica Clínica) asignado:



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.

Presidente: Dra. Guadalupe Ortíz López
Vocal: M. en C. Ma. de los Ángeles Granados Silvestre
Secretario: E.B.C. Lina Teresa Romero Guzmán
Primer suplente: Dr. José Pedraza Chavarri
Segundo suplente: Dr. José Pérez Jáuregui

El trabajo experimental de esta tesina fue realizado en el Laboratorio de Endocrinología Molecular del Hospital Juárez de México; en el Laboratorio de Endocrinología del Instituto Nacional de Pediatría y en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo del Instituto de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán.

Asesora: Dra. Marta A. Menjívar Iraheta

Sustentante: Q.F.B. Miriam Enriquez Pimentel

DEDICATORIAS

A Dios, gracias por todas las bendiciones que he recibido.

A mis padres Alicia y Alfredo, con todo mi amor y agradecimiento.

A mis hermanas Ericka y Alicia, que Dios las bendiga.

A David, con todo mi amor, gracias por tu apoyo y comprensión.

Al angelito que viene en camino... te amo bebe.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marta Menjívar Iraheta, gracias por su apoyo constante y por compartir su experiencia y conocimientos para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado y revisores de esta tesina: Dra. Guadalupe Ortiz López, M. en C. Ma. de los Ángeles Granados Silvestre, E.B.C. Lina Teresa Romero Guzmán, Dr. José Pedraza Chavarri y al Dr. José Pérez Jáuregui, gracias por las sugerencias sobre el presente trabajo.

Al personal de las instituciones en donde se realizó la presente tesina, gracias por su asesoría y valiosos consejos.

ÍNDICE GENERAL

	PÁG.
1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. Insulina.....	5
2.1.1. Biosíntesis.....	5
2.1.2. Liberación.....	7
2.1.3. Receptor de insulina.....	9
2.1.4. Efectos de la insulina.....	12
2.1.5. Degradación de insulina.....	13
2.1.6. Alteraciones metabólicas relacionadas con la insulina.....	14
2.2. Métodos para la determinación de insulina.....	19
2.2.1. Inmunovaloraciones.....	19
2.2.2. Radioinmunoanálisis.....	21
2.2.3. Enzimoinmunoanálisis de micropartícula.....	22
2.2.4. Enzimoinmunoensayo acoplado a quimioluminiscencia.....	24
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. OBJETIVO GENERAL.....	28
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
5.1. Controles comerciales DPC.....	29
5.2. Controles internos caseros.....	29
5.3. Muestras de suero.....	31
5.4. Métodos a evaluar.....	32

5.4.1. Radioinmunoanálisis.....	32
5.4.2. Enzimoinmunoensayo de micropartícula.....	35
5.4.3. Enzimoinmunoensayo acoplado a quimioluminiscencia.....	39
6. RESULTADOS.....	43
6.1. Controles internos comerciales.....	43
6.2. Controles internos caseros.....	52
6.3. Muestras de suero humano.....	61
6.4. Sensibilidad.....	70
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	72
8. CONCLUSIONES.....	79
9. BIBLIOGRAFÍA.....	80

ABREVIATURAS Y SIGLAS

α	Alfa
a.a.	Aminoácido
AGL	Ácidos grasos libres
Arg	Arginina
ATP	Adenosina Trifosfato
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Grado centígrado
C.C.I.	Control de Calidad Interno
CO_2	Dióxido de carbono
D	Daltons
DM	Diabetes mellitus
DPC	Diagnostic Products Corporation
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EIA	Enzimoimmunoanálisis
Glut-2	Transportador de glucosa 2
Grb	Proteína adaptadora
GTP	Guanosina trifosfato
H^+	Hidrógeno
H_2O	Agua
I^{125}	Yodo 125
IDE	Enzimas de degradación de insulina
IR	Receptor de insulina
IRS	Sustrato del receptor de insulina
IQMA	Inmunoensayo acoplado a quimioluminiscencia
K^+	Ión potasio
kD	Kilodalton
L	Litro
Lis	Lisina
MAPK	Proteína cinasa adaptadora de mitogénesis
MEIA	Enzimoimmunoanálisis de micropartícula
MEK	Cinasa de la cinasa MAP
mL	Mililitro
mm	Milimetro
μm	Micrometros
μU	Microunidades
mU	Miliunidades
Na^+	Ión de sodio
nm	Nanometros
P	Significancia estadística
p	Promedio
PI3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PkB/Akt	Serina/Treonina cinasa
PMP	Partículas paramagnéticas
PMT	Fotomultiplicador
r	Correlación
RAF	Serina/Treonina cinasa citosólica
RIA	Radioimmunoanálisis
TK	Tirosina cinasa
U	Unidades
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
vs	Versus
Zn^{2+}	Ión de zinc

1. RESUMEN

A partir del empleo del método de RIA para la determinación de hormonas en 1959, se han desarrollado otros inmunoensayos, como el de MEIA y el IQMA, estos tres métodos se consideran como de primera elección para la cuantificación de hormonas en suero por su alta sensibilidad. En estos métodos, se lleva a cabo una reacción antígeno-anticuerpo en la que el anticuerpo está marcado con una sustancia radiactiva para el caso del RIA, fluorescente en el caso del MEIA y quimioluminiscente para el caso del IQMA .

En el presente trabajo se cuantificó la concentración de insulina en controles internos comerciales de la marca DPC, controles internos caseros y muestras de suero humano por el método de RIA en forma manual, y por las técnicas de MEIA e IQMA en los equipos automatizados IMx e Immulite 2000 respectivamente, con el objetivo de determinar si existía o no correlación y concordancia entre éstos.

Como resultado, se obtuvo que la reproducibilidad, precisión y sensibilidad de cada método por separado es aceptable; sin embargo, las técnicas evaluadas no presentan una correlación entre sí, por lo que se concluye que los métodos empleados comúnmente para la determinación de insulina en suero humano no son comparables entre diferentes laboratorios.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 INSULINA

2.1.1. Biosíntesis

El gen de la insulina humana se localiza en el brazo corto del cromosoma 11. Una molécula precursora, la preproinsulina, es un péptido de cadena larga de peso molecular de 11,500 D que se produce en las células β del páncreas. La preproinsulina tiene un péptido señal de 23 aminoácidos que se elimina cuando entra al retículo endoplásmico. La acción de las enzimas microsomales desdoblan la molécula y se escinde el péptido señal, el resto de la molécula se pliega y se forman los enlaces disulfuro para constituir la proinsulina (con un peso molecular cercano a 9000 D), que consiste en una sola cadena de 86 a.a. que incluye las cadenas A y B de la molécula de insulina, unidos por un segmento de 35 a.a. llamado péptido conector o péptido C (1).

Después de su síntesis, la proinsulina se transporta al aparato de Golgi donde tiene lugar su empacamiento en gránulos secretores recubiertos de clatrina. La maduración del gránulo secretor se relaciona con la pérdida de la cubierta de clatrina y la conversión de la proinsulina en insulina y péptido C (2).

La proinsulina se escinde en insulina y péptido C por un proceso enzimático; dos endopeptidasas, PC2 y PC3 dividen la molécula de proinsulina en dos sitios marcados por pares de aminoácidos dibásicos. La tipo 1 (PC3) rompe en la posición Arg³¹-Arg³² y la PC2 rompe en la posición Lis⁶⁴-Arg⁶⁵, cuando se completa la división en ambos sitios, se obtienen el péptido C y la insulina (3). Después de la acción proteolítica, el resultado es una molécula

de insulina de 51 aminoácidos y un residuo de 35 aminoácidos llamado péptido C o péptido conector (2). La siguiente figura muestra la biosíntesis de insulina a partir de preproinsulina.

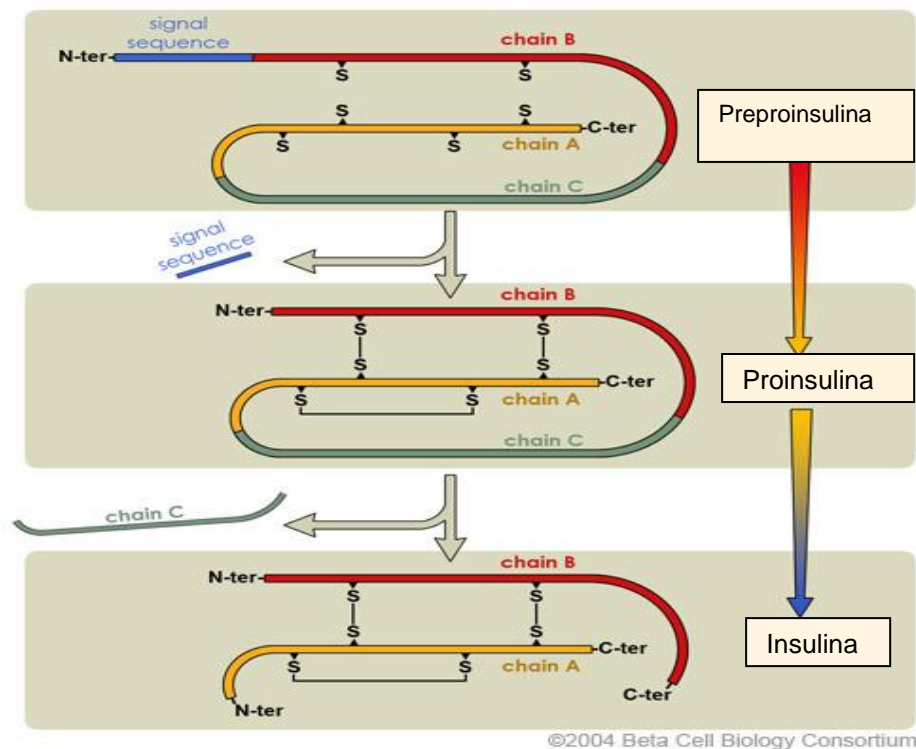


Figura 1. Síntesis de insulina.

Una pequeña cantidad de la proinsulina producida por el páncreas no se desdobra y se secreta intacta hacia el flujo sanguíneo junto con la insulina y el péptido C. La proinsulina tiene una vida media 3 a 4 veces mayor a la de la insulina, esto permite que la proinsulina se acumule en sangre, donde es responsable de 12 a 20% de la insulina inmunoreactiva en el estado basal humano. La proinsulina humana tiene alrededor de 7 a 8% de la actividad biológica de la insulina y el riñón es el principal sitio de su degradación (2).

El péptido C es un residuo de 31 a.a. (PM 300 kD) y muestra una heterogeneidad en suero que puede deberse al metabolismo y/o catabolismo del mismo. Últimamente se ha planteado que el péptido C tenga una actividad biológica, aunque ésta no está aún bien determinada. El péptido C se libera de las células β en cantidades equimolares a la insulina. No se elimina por

el hígado sino que se degrada o excreta principalmente por el riñón y tiene una vida media 3 o 4 veces mayor que la insulina (2).

Cuando el péptido C se separa enzimáticamente de la proinsulina, se forma finalmente la molécula de insulina, que es una proteína que consiste en 51 a.a. contenidos dentro de dos cadenas polipeptídicas, una cadena A, con 21 a.a. y una cadena B, con 30 a.a. Las cadenas están conectadas por dos puentes disulfuro. El peso molecular de la insulina humana es de 5808 D (2). Cambios muy pequeños en la estructura de la insulina dan lugar a una pérdida parcial o completa de su actividad biológica; el rompimiento de los puentes disulfuro, los cambios alrededor de las dos moléculas de histidina y la pérdida de ocho aminoácidos C-terminales de la cadena B conducen a una pérdida completa de su actividad biológica (4).

La insulina endógena tiene una vida media en circulación de 3 a 5 minutos. Se cataboliza principalmente por IDE en hígado, riñón y placenta. Cerca de 50% de la insulina se elimina por un solo paso a través del hígado (2).

A continuación se muestra la estructura de la proinsulina, formada por las cadenas A, B y C o péptido conector (Figura 2).

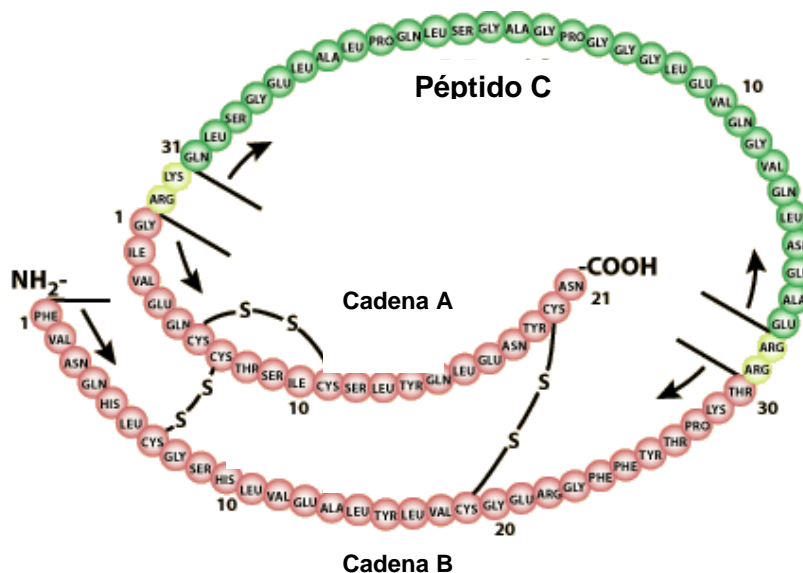


Figura 2. Estructura de la proinsulina.

2.1.2. Liberación

El páncreas humano secreta alrededor de 40 a 50 U de insulina/día en adultos normales. La concentración basal de insulina sanguínea en ayuno tiene como promedio 10 $\mu\text{U/mL}$. Fisiológicamente, la célula β es una célula secretora que responde a la concentración de glucosa como el mecanismo regulador más importante para la secreción de insulina (4).

Al igual que otras hormonas, la insulina se libera de manera pulsátil con una frecuencia de 7-8 minutos aproximadamente. En estado de hiperglicemia la frecuencia de los pulsos se acortan a 4-5 minutos, hasta que se alcanzan niveles normales de glucosa. La liberación pulsátil de la insulina requiere de la sincronía de casi la totalidad de las células β pancreáticas, en las que la secreción debe ser simultánea, siendo este proceso el responsable de la concentración basal de insulina en estado de ayuno (5). Se ha demostrado que la acción de la insulina mejora en los órganos blanco cuando su liberación se presenta de manera pulsátil, por ejemplo, en hígado la concentración de glucosa es un 25-30% mayor cuando concentraciones iguales de insulina se administran de manera constante que cuando se administra por pulsos (27).

Después de la ingesta de alimentos la liberación de la insulina presenta dos fases. En la primera se observa un aumento en la concentración de insulina periférica que se inicia de 8 a 10 minutos después del estímulo, la cual llega a un máximo en sangre periférica en un rango 30 a 45 minutos (segunda fase); seguido de una declinación rápida hasta alcanzar niveles de glucosa plasmática normales, en 90 a 120 minutos (2). La figura 3 muestra la primera y segunda fase de la liberación de insulina.

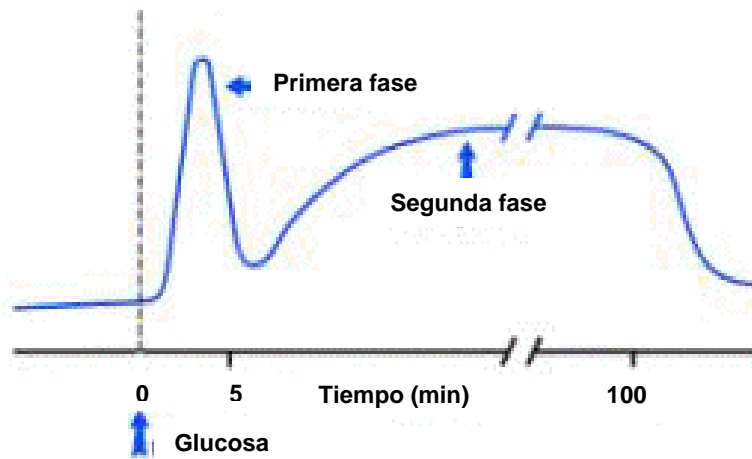


Figura 3. Liberación bifásica de la insulina.

El hecho de que en etapas tempranas de la DM 2 la primera fase de liberación de insulina sea particularmente menor y retardada, indica que la liberación bifásica de la insulina es una característica de la célula β pancreática y que los defectos en su liberación son consecuencia de desordenes metabólicos o de una disfunción en las células β pancreáticas como consecuencia de un defecto genético. Estas alteraciones provocan un esfuerzo extra de las mismas para poder mantener los niveles de glucosa dentro del intervalo normal (5), de manera que el monitoreo del comportamiento en la liberación de insulina en personas que tienen factores de riesgo puede ser un marcador temprano para el diagnóstico de la diabetes DM 2 (27).

Cuando los niveles de glucosa se elevan después de la ingesta de alimentos, la glucosa penetra a la célula β pancreática mediante difusión pasiva, facilitada por una proteína de membrana llamada Glut-2 (7). La glucosa se fosforila mediante la enzima glucocinasa, generando glucosa-6-fosfato para activar la vía glucolítica y en consecuencia la producción de ATP. El aumento de ATP intracelular ocasiona que los canales de K^+ dependientes de voltaje se cierran. Al disminuir la permeabilidad de la membrana al K^+ , el catión deja de salir y se acumula dentro de la célula, se reduce la negatividad interior y origina una despolarización de

la membrana celular. Esta despolarización abre los canales de calcio dependientes de voltaje y el aumento de calcio intracelular provoca la migración del gránulo de insulina hacia el interior de la célula β pancreática (4).

2.1.3. Receptor de insulina

Una vez que se libera la insulina, la acción hormonal se inicia con su unión al receptor en la superficie de la membrana de la célula blanco. Muchas células del cuerpo parecen tener receptores específicos de superficie para insulina, incluyendo el tejido adiposo, el hígado y las células musculares. La concentración de este receptor en humanos puede variar desde aproximadamente 40 receptores/célula en los eritrocitos, a aproximadamente 150 000 receptores/célula en adipocitos (26).

La acción de la insulina a nivel celular puede clasificarse en tres etapas: la 1era. incluye al receptor en sí mismo, el IRS-1 y las moléculas que interaccionan con éste. La 2da. Etapa incluye una cascada de fosforilaciones y desfosforilaciones y por último, la 3era. etapa concierne a los efectos biológicos (8).

El receptor se sintetiza por un solo gen localizado en el brazo corto del cromosoma 19 como un polipéptido precursor de 1343 a 1355 a.a. Durante el trayecto a la membrana celular, un residuo de 27 a.a. se separa, y se lleva a cabo la glucosilación (8).

El receptor para insulina es una glucoproteína que pertenece a la superfamilia de receptores transmembranales tirosina cinasa (TK's). La subunidad α (135kD) del receptor es extracelular, mientras que la subunidad β (95kD) contiene una porción intracelular, una secuencia transmembranal y un dominio TK intracelular (9), las unidades α y β se encuentran unidas por puentes disulfuro. La unión de la insulina a su receptor ocasiona un cambio conformacional que permite la unión del ATP (que actúa como donador del fosfato) al dominio intracelular o subunidad β , lo que provoca la autofosforilación. La fosforilación ocurre exclusivamente en los

residuos de tirosina. El receptor de insulina cuenta con numerosos sitios de autofosforilación, la fosforilación en el “loop” activo es esencial para promover la actividad cinasa, la fosforilación del extremo carboxilo terminal juega un papel en la actividad mitogénica y por último, la autofosforilación yuxtamembranal participa en la interacción receptor-sustrato e incrementa la estabilidad del complejo insulina-IR (10).

Una vez que la insulina se une a su receptor, este se activa mediante la autofosforilación en los residuos de tirosina y fosforila a IRS-1, IRS-2 e IRS-3, que son proteínas citoplasmáticas que contienen muchos sitios de fosforilación en serinas y en sitios de unión para ATP y GTP, siendo la principal característica de IRS la fosforilación de tirosinas por estimulación de insulina (8). Se conocen 4 miembros de esta familia (IRS-1 al 4), que difieren en cuanto a su distribución en los tejidos, localización intracelular, unión al IR e interacción con el dominio SH2 de las proteínas. Se sabe que IRS-1 e IRS-2 no son funcionalmente intercambiables en tejidos que son responsables de la producción de glucosa (hígado), almacenamiento de glucosa (músculo y tejido adiposo) y producción de insulina. El IRS-1 parece tener una mayor importancia en músculo mientras que IRS-2 parece regular la acción de la insulina en hígado. Defectos en la función de IRS-1 están relacionados con obesidad y DM 2 (11).

La fosforilación de IRS-1 permite la asociación de éste con la subunidad que regula la activación del PI3K (12). La enzima PI3 cinasa es importante para la acción de la insulina, su carencia está asociada con la inhibición del almacenamiento de glucosa, la síntesis de glucógeno, lípidos y proteínas y la modulación de la expresión genética (10).

El PI3K activa a PKB/Akt, una serina cinasa. La PKB desactiva a la glucógeno sintasa cinasa, permitiendo la activación de la glucógeno sintasa y por lo tanto la síntesis de glucógeno. La activación del PKB también promueve la translocación de las vesículas del Glut-4 del citoplasma a la membrana plasmática, permitiendo la entrada de la glucosa a la célula (12). La Akt es una proteína cinasa C que se localiza cerca de la membrana celular,

donde se fosforila. Una vez activada se transloca al núcleo donde fosforila proteínas que regulan la síntesis de lípidos, glucógeno y proteínas (10).

Otras moléculas que interactúan con IRS incluyen la GRB2 y SHP2, una proteína que contiene un dominio SH. La proteína GRB2 contiene un dominio SH3, que promueve la asociación con SOS, que forma parte de la cascada RAS, RAF y MEK, lo que permite la activación de MAPK. SHC es otro sustrato del receptor de insulina, cuando está fosforilado se asocia con GRB2 y puede activarse la vía RAS/MAPK, independientemente del IRS-1 (26).

El IR no sólo está activo en la membrana celular, el complejo insulina-IR se internaliza a los endosomas, proceso que también depende de una autofosforilación. La acidificación del lumen endosomal por la bomba de protones promueve la disociación de la insulina y el IR. La vida media del receptor para insulina es cercana a 7 horas (4).

2.1.4. Efectos de la insulina

La acción de la insulina sobre la glucógeno sintasa promueve el almacenamiento de glucógeno y las acciones sobre las enzimas glucolíticas favorecen el metabolismo de la glucosa hacia fragmentos de dos carbonos con la promoción resultante de la lipogénesis. Por otro lado, la estimulación de la síntesis proteica a partir de los a.a. que entran a la célula y la inhibición de la degradación de proteínas favorece el crecimiento. La función principal de la insulina es promover el almacenamiento de los nutrientes ingeridos (1).

El primer órgano que es alcanzado por la insulina a través del flujo sanguíneo es el hígado. La insulina ejerce su acción promoviendo la síntesis y almacenamiento de glucógeno, al mismo tiempo que inhibe su degradación. Aumenta la síntesis de proteínas, triglicéridos, y la formación de VLDL. También inhibe la gluconeogénesis y promueve la glucólisis a través de sus efectos sobre las enzimas de la vía glucolítica.

En músculo esquelético la insulina promueve la síntesis de proteínas al aumentar la entrada de aminoácidos a la célula y estimula la síntesis de glucógeno para reemplazar el utilizado por la actividad muscular.

En el tejido adiposo la insulina promueve el almacenamiento de triglicéridos en los adipocitos mediante diversos mecanismos: induce la producción de lipoproteína lipasa, lo cual lleva a la hidrólisis de triglicéridos de las lipoproteínas circulantes; al aumentar el transporte de glucosa hacia los adipocitos la insulina incrementa la disponibilidad de α -glicerolfosfato para la esterificación de ácidos grasos libres a triglicéridos y por último inhibe la lipólisis intracelular (2).

La insulina activa tanto la oxidación de glucosa-6-fosfato a piruvato a través de la glucólisis, como la oxidación del piruvato a acetil-CoA. El acetil-CoA no oxidado para producción de energía se utiliza para la síntesis de ácidos grasos en el hígado, que salen como triglicéridos que componen las lipoproteínas plasmáticas (VLDL) que llegan al tejido adiposo. La insulina estimula la síntesis de triglicéridos en los adipocitos utilizando ácidos grasos que se liberan de las VLDL. Estos ácidos grasos provienen del exceso de glucosa circulante captada por el hígado. En resumen, el efecto de la insulina consiste en potenciar la transformación del exceso de glucosa en sangre en dos formas de almacenamiento: glucógeno en hígado y músculo, y triglicéridos, en el tejido adiposo (13).

2.1.5. Degradación de insulina

El primer paso para la degradación de la insulina es la entrada de esta a la célula. La mayor parte de la insulina entra en forma de complejo Insulina-IR, pero también puede entrar por pinocitosis cuando la concentración de insulina es alta (14).

Una vez que se internaliza el complejo insulina-IR, esta puede salir de la célula intacta, o puede iniciarse su degradación en los endosomas (15). La insulina intracelular puede encontrarse en el citosol, núcleo, aparato de Golgi, o puede liberarse en los lisosomas antes de que comience su degradación. También puede regresar a la circulación intacta o parcialmente degradada (14).

El mecanismo más importante para la degradación de la insulina se lleva a cabo por la acción de metaloendopeptidasas que requieren de Zn^{2+} para su acción proteolítica (14). Las IDE, rompen enlaces específicos en la molécula de insulina, las restricciones para su acción depende más de la estructura tridimensional de la molécula que de aminoácidos específicos (15). Una vez que la insulina entra en el endosoma, las IDE cortan en dos sitios o más de la cadena B; después se rompe un puente disulfuro produciendo la cadena A intacta y varios fragmentos de la cadena B, los cuales son rápidamente fragmentados por otros sistemas proteolíticos, incluyendo los lisosomas (14).

Todos los tejidos sensibles a la insulina tienen la capacidad de degradarla. El riñón el principal sitio de excreción para la insulina que se encuentra en circulación sistémica, también se elimina en este sitio el 50% de proinsulina y el 70% del péptido C por filtración glomerular (15).

2.1.6. Alteraciones metabólicas relacionadas con la insulina

Diabetes mellitus

La DM es el desorden endocrino más común, actualmente afecta a más de 170 millones de personas en el mundo y se espera que para el año 2030 sean 365 millones de diabéticos. Además de la falla en la célula β , el principal evento fisiopatológico que contribuye al desarrollo de diabetes es la resistencia del tejido blanco a la insulina. La insulina baja los

niveles de glucosa sanguíneos facilitando la entrada de esta principalmente a músculo y tejido adiposo, y actúa en hígado inhibiendo su producción. En estado de insulinoresistencia, el organismo no responde normalmente a la insulina, causando así hiperglucemia y un incremento en la secreción de insulina por la célula β pancreática. Estos niveles elevados de insulina pueden compensar la escasa respuesta a la insulina sólo por un tiempo, hasta que este frágil equilibrio resulta en una manifestación clínica, la DM tipo 2. La diabetes es una enfermedad crónico-degenerativa, que se caracteriza por un déficit en la secreción de insulina o en su mecanismo de acción, lo que conduce a hiperglicemia crónica (16).

Como se muestra en la figura 4, la diabetes se caracteriza por poliuria, polidipsia y polifagia. Existen muchas anormalidades bioquímicas, aunque los defectos fundamentales por medio de los cuales puede rastrearse la mayoría de estas anormalidades son: disminución en la entrada de glucosa a varios tejidos periféricos y aumento en la liberación de glucosa hacia la circulación a partir del hígado. Por tanto, se registra un exceso de glucosa extracelular y, en muchas células una deficiencia intracelular, situación conocida como “inanición en medio de la abundancia”. También disminuye la entrada de aminoácidos al músculo y aumenta la lipólisis (25).

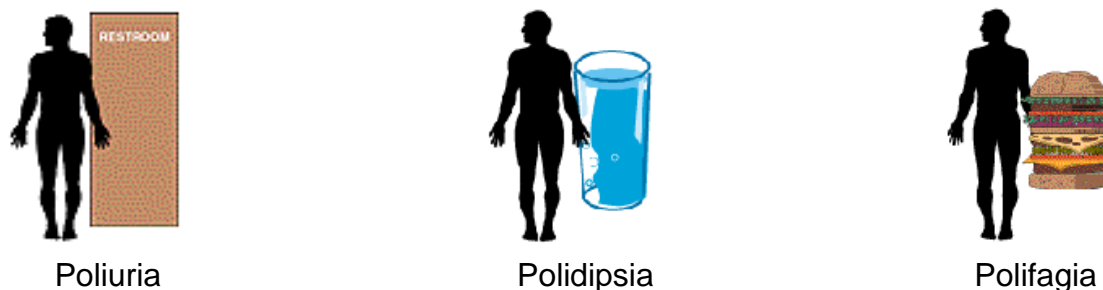


Figura 4. Síntomas de la diabetes mellitus.

La glucosuria se presenta porque se rebasa la capacidad renal para reabsorber glucosa. La excreción de las moléculas de glucosa que tienen actividad osmótica implica la pérdida de grandes cantidades de agua. La deshidratación resultante activa los mecanismos que regulan la ingesta de agua, lo cual origina la polidipsia (25).

El aumento de la gluconeogénesis tiene muchas causas. El glucagon estimula la gluconeogénesis y en la diabetes generalmente se presenta hiperglucagonemia. El suministro de aminoácidos para la gluconeogénesis aumenta porque en ausencia de insulina se sintetiza menos proteína en el músculo y se elevan las concentraciones sanguíneas de aminoácidos (25).

Las principales anomalías en el metabolismo de grasas en la diabetes son aceleración en el catabolismo de los lípidos con aumento en la formación de cuerpos cetónicos y disminución en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos (4).

Insulinodeficiencia e insulinorresistencia

La insulinorresistencia es un estado metabólico en el cual las concentraciones fisiológicas de insulina producen una respuesta biológica anormal. En relación al metabolismo de la glucosa, esto se traduce en concentraciones plasmáticas de insulina más elevadas que las de una población control, para mantener niveles normales de glucosa sanguínea (24).

La mayor parte de las fisiopatologías estudiadas en relación con la alteración del número y/o afinidad de los receptores de insulina y alteraciones en la actividad biológica de esta hormona son situaciones de "resistencia a la insulina". Se dice que hay resistencia a la insulina cuando concentraciones normales de insulina producen una respuesta biológica menor de la normal. Otra definición sería, cuando es necesaria una cantidad mayor de insulina circulante para alcanzar valores normales de glucosa sanguínea (24).

En la síntesis y secreción de insulina se han descrito algunas anomalías que dan lugar a insulina defectuosa desde el punto de vista biológico por (24):

- Posible mutación en el gen estructural de insulina, dando lugar a una insulina con actividad biológica defectuosa.
- Conversión incompleta de proinsulina a insulina, produciendo secreción de altas cantidades de proinsulina, la cual es biológicamente menos activa que la insulina.
- Destrucción de las células β del páncreas por virus, autoanticuerpos anti-insulina y diversos agentes tóxicos.

Los trastornos de resistencia a la insulina pueden clasificarse en tres grandes grupos:

- Genéticos: Síndrome de tipo A y síndrome de Werner (disminución en el número de receptores). Leprechaunismo y distrofia miotónica (disminución en el número y afinidad del receptor de insulina). Diabetes lipoatrófica (disminución en el número de receptores y en la autofosforilación).
- Inmunológicos: Anticuerpos anti-insulina. Síndrome de tipo B (anticuerpos anti-receptor de insulina), generalmente los anticuerpos anti-receptor de insulina bloquean la acción de esta hormona, pero en ocasiones pueden potenciar su acción produciendo un cuadro de hipoglucemia. Ciertos anticuerpos pueden estimular a la tirosina cinasa del receptor de insulina, mientras otros pueden bloquear su activación.

2. 2. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE INSULINA

2. 2. 1. INMUNOVALORACIONES

En 1959, Yalow y Berson emplearon por primera vez los isótopos radiactivos como marcadores con el desarrollo de la técnica de RIA (Método de 1era. generación).

Posteriormente, algunas desventajas de la técnica de RIA como el uso de material radiactivo y la vida media corta de los mismos llevó a la búsqueda de otro tipo de marcadores. A principios de los años 70 se describieron inmunoanálisis que utilizaban enzimas, apareciendo los enzimoimmunoanálisis (EIA), técnicas de amplia aceptación. A finales de los años 70 y principio de los 80 comenzaron a emplearse los compuestos fluorescentes como marcadores de los inmunoanálisis. En 1976 se describió por primera vez el empleo de la quimioluminiscencia en un inmunoanálisis utilizando isoluminol (17). Los métodos de MEIA e IQMA, por ser enzimoimmunoensayos son considerados como métodos de 2da. generación.

Con el desarrollo de anticuerpos monoclonales a finales de los 80, se implementaron ensayos con dos sitios de unión, los cuales presentan mayor sensibilidad y especificidad que el RIA. El límite de detección de estos ensayos es menor a 1 mU/L, a comparación del RIA que detecta ≈ 2 mU/L (18).

La inmuovaloración de las hormonas emplea anticuerpos monoclonales o policlonales con gran afinidad por la hormona, los cuales se obtienen de animales. El empleo de anticuerpos monoclonales aumenta la especificidad del ensayo, por lo que suelen obtenerse concentraciones más bajas que las obtenidas cuando se realizan técnicas que emplean anticuerpos policlonales como el RIA. Los anticuerpos policlonales tienen menos especificidad, por lo que durante la reacción antígeno-anticuerpo puede haber uniones inespecíficas con precursores o moléculas de degradación de la insulina (19).

En la práctica, las mediciones de las concentraciones de hormonas mediante inmuovaloración implica la incubación de la muestra más el antisuero y, en seguida, la medición de las concentraciones del complejo antígeno-anticuerpo mediante el método de elección. Las inmuovaloraciones clásicas utilizan anticuerpos de afinidad muy grande (en escasas concentraciones para permitir la máxima sensibilidad) inmovilizados sobre la

superficie del tubo de ensayo, un lecho de poliestireno o una partícula paramagnética. Se incuba la muestra problema y el anticuerpo, en tanto que el antígeno marcado se agrega ya sea en el momento cero de la reacción o después (2).

Una modificación reciente de las inmunovaloraciones es la técnica del emparedado o “sandwich”, que utiliza dos anticuerpos monoclonales diferentes, cada uno de los cuales reconoce epitopos distintos de la hormona. Este aspecto limita la técnica, ya que su uso resulta difícil en moléculas pequeñas para las cuales no se pueden obtener dominios reactivos separables. La valoración se practica mediante el empleo del primer anticuerpo adherido a una matriz sólida de soporte para adsorber la hormona que se analiza. Después de la eliminación del suero o plasma mediante el lavado, se incuban el segundo anticuerpo marcado y el complejo hormona-primer anticuerpo. La cantidad de enlace del segundo anticuerpo es proporcional a la concentración de la hormona en la muestra. El uso de los dos anticuerpos eleva de manera notable la especificidad y en gran medida, reduce las interferencias de fondo, por lo cual mejora la sensibilidad y especificidad de la valoración (23).

Actualmente existen en el mercado inmunoensayos que emplean dos anticuerpos monoclonales que tienen especificidad por dos diferentes epitopos de la molécula de insulina, pero que difieren de los anteriores en que requieren sólo una incubación, por lo que las muestras pueden ser analizadas en cuestión de minutos, manteniendo la misma sensibilidad que los inmunoensayos que requieren de dos incubaciones (20).

Los inmunoensayos deben reunir las siguientes características (21):

- Especificidad: se refiere a la cualidad del anticuerpo para reconocer únicamente a la sustancia que se desea cuantificar.

- Sensibilidad: su expresión se refiere a la concentración mínima detectable y puede ser de picogramos/mL.
- Linealidad: La concentración observada debe de estar entre $\pm 15\%$ del valor esperado(10).
- Precisión: El coeficiente de variación no debe ser mayor a 15% (3).

2.2.2. RADIOINMUNOANÁLISIS

El método de RIA presenta una elevada sensibilidad mediante el empleo de indicadores radioisótopos en la reacción antígeno-anticuerpo, en donde el antígeno marcado tiene una relación cuantitativa con la cantidad de insulina (antígeno no marcado en la muestra) cuando la concentración de anticuerpo y antígeno marcado en el sistema se mantiene constante. Esto forma la base de la teoría de enlace competitivo empleada en la mayoría de las pruebas de RIA, cuya técnica fué inmediatamente aplicable para la cuantificación de hormonas peptídicas y no peptídicas, existiendo una elevada sensibilidad y resultados reproducibles. Actualmente, el RIA es aplicado ampliamente en el campo de la endocrinología clínica para medir las hormonas con mucha precisión (22).

El RIA es una técnica de análisis en la que una pequeña cantidad de sustancia marcada radiactivamente es desplazada de su unión específica por otra similar no marcada que va a competir con la sustancia marcada radiactivamente (22). Los radioinmunoanálisis emplean isótopos radiactivos como marcadores de los antígenos o los anticuerpos en el sistema de inmunoanálisis. Los isótopos inestables experimentan una desintegración espontánea a isótopos estables mediante un proceso denominado desintegración radiactiva, que va acompañada de forma característica por la emisión de energía en forma de radiación. En el

caso del I^{125} , se alcanza la estabilidad nuclear por emisión de radiaciones electromagnéticas, es decir, emisión de partículas gamma (17).

Al sistema de fijación elegido se le agrega una cantidad de antígeno marcado, posteriormente se agrega una cantidad de antígeno sin marcar (suero problema o control), así se establece la competencia por los sitios de unión del anticuerpo, sigue la incubación a 37°C , en el que se promueve la formación del complejo antígeno-anticuerpo (22).

Una vez que la reacción antígeno-anticuerpo alcanza el equilibrio, se separan las denominadas fracciones libres, constituidas por el antígeno, antígeno marcado y anticuerpo que no se unieron a la fase sólida de las fracciones ligadas, formadas por complejos antígeno-anticuerpo y antígeno marcado-anticuerpo. En las técnicas más utilizadas, el anticuerpo se liga a la pared del tubo (que es la fase sólida) en el que se lleva a cabo la reacción, en este caso basta con la decantación del tubo de reacción para separar las fracciones. Una vez separadas las fases libre y ligada se emplea un contador gamma para leer la radiactividad del tubo que contiene la fase ligada (22).

La técnica se realiza paralelamente al suero problema con una serie de estándares de concentración conocida, que constituyen la llamada curva estándar, lo que nos permite determinar la concentración del suero problema interpolando el resultado de la medida de señal en dicha curva (22).

El isótopo más utilizado para marcar hormonas es el I^{125} , su vida media es de 60 días. Las técnicas de RIA son de desplazamiento, es decir, si la cantidad de antígeno de la muestra es pequeña, con el anticuerpo reaccionará una mayor cantidad de antígeno marcado, con lo que el conteo será mayor que en caso de mayores concentraciones de antígeno de la muestra (22).

2.2.3. ENZIMOINMUNOANÁLISIS DE MICROPARTÍCULA

A finales de los 70, y comienzos de los 80 se desarrollaron varios inmunoanálisis con marcaje fluorescente. Se denomina fluorescencia al fenómeno de emisión de luz por electrones excitados que previamente han absorbido luz y que, de esta forma vuelven a su estado basal. La fluorescencia se emite por los compuestos en todas las direcciones. Las medidas de fluorescencia se realizan con aparatos denominados fluorómetros que constan de una fuente de luz de excitación, un filtro monocromador primario, para seleccionar la longitud de onda de excitación, una celda de reacción, un filtro monocromador secundario para seleccionar la longitud de onda de emisión y un detector (28).

La luz procedente de la lámpara de excitación se hace pasar por el filtro o monocromador primario que selecciona la longitud de onda adecuada y que incide sobre la cubeta que contiene la muestra. Parte de la luz es absorbida y, como consecuencia del proceso de fluorescencia, se emite luz de mayor longitud de onda. Esta luz pasa por un segundo filtro o monocromador colocado perpendicularmente al primero para evitar interferencias de la luz de excitación. Finalmente, la luz llega al detector. Las principales fuentes de luz de excitación de los fluorómetros son las lámparas de descarga de xenón que proporcionan un espectro continuo de luz entre 200 y 800 nm (28).

El fluoroinmunoanálisis heterogéneo requiere la separación de las fracciones ligada y libre de la reacción inmunológica antes de la medida de la fluorescencia. Se ha propuesto un gran número de fluoroinmunoanálisis heterogéneos para la determinación de muchas sustancias que utilizan diversos soportes sólidos para la separación.

Las principales características que deben poseer los compuestos fluorescentes para su uso en los fluoroinmunoanálisis son:

1. Poseer una intensidad de fluorescencia elevada.

2. Que sea posible diferenciar su fluorescencia de la de fondo que producen las muestras biológicas.
3. Que su unión al antígeno o al anticuerpo no afecte de forma adversa sus propiedades.

El MEIA es una técnica en la que los anticuerpos se encuentran recubriendo micropartículas de látex (0.47 μm de diámetro), lo que acelera la unión del antígeno (29). La separación del antígeno libre y el unido se produce en una matriz de fibra de vidrio que retiene el antígeno unido. Las micropartículas se adhieren a la fibra de vidrio irreversiblemente, mientras que el material no unido se elimina mediante lavado. Para las pruebas no competitivas y competitivas se emplean anticuerpos de detección marcados con fosfatasa alcalina y la sustancia marcada con la enzima, respectivamente. En ambos casos se emplea como sustrato de la enzima la 4-metilumbeliferona que produce fluorescencia (17).

2.2.4. ENZIMOINMUNOENSAYO ACOPLADO A QUIMIOLUMINISCENCIA

El fenómeno de emisión de luz por moléculas orgánicas se conoce desde 1877, año en el que Radzis y Zenski descubrieron compuestos luminiscentes. En 1928 Albrech descubrió las propiedades de un compuesto emisor de luz conocido como luminol, que al ser oxidado con peróxido de hidrógeno en un medio alcalino y en presencia de un catalizador, emite luz individualmente como fotones.

La quimioluminiscencia se produce cuando una sustancia quimioluminiscente alcanza un estado de excitación electrónica a partir de su propia oxidación, y al volver los electrones a su estado basal que es de menor energía, emiten esta diferencia en forma de energía luminosa. Los productos luminiscentes, a diferencia de lo que ocurre en los fluorescentes, son alterados en el proceso. Como sustancia luminiscente, se utiliza principalmente el luminol, siendo el

agente oxidante el peróxido de hidrógeno, en presencia de una peroxidasa como catalizador (22).

La quimioluminiscencia se ha aplicado en los enzimoimmunoanálisis para medir la actividad enzimática de la reacción indicadora. Los enzimoimmunoanálisis que emplean este tipo de detección son mucho más sensibles que los sistemas colorimétricos o fluorimétricos. Se han presentado métodos para la detección de fosfatasa alcalina. Para esta enzima, se han utilizado sustratos derivados del dioxetano. La fosfatasa alcalina desfosforila a estos sustratos y produce un intermediario fenóxido que se descompone emitiendo luz a 470 nm. Los sustratos de dioxetano se emplean en varios sistemas comerciales automatizados para enzimoimmunoanálisis con quimioluminiscencia, como el Immulite (DPC) (17).

En 1976 se describió una tecnología semiautomatizada para inmunoensayos utilizando la tecnología de quimioluminiscencia, empleando isoluminol como indicador, con el requerimiento de la adición de un catalizador para que la emisión de luz ocurra. En dicha tecnología, la oxidación del éster de acridina ocurre rápidamente, con un pico de emisión de luz en un segundo. En los últimos años se introdujeron al mercado inmunoensayos que consisten de una fase sólida como método de separación. Este grupo de ensayos usan PMP como fase sólida. La separación se hace más eficiente al colocar las celdas de reacción en una banda magnética. Ambas fracciones ligadas se agregan en el área magnética y la fracción libre es decantada, eliminando así la necesidad de centrifugación (22).

Las ventajas del uso de la quimioluminiscencia en el laboratorio clínico incluyen sensibilidad (límites de detección de moles, nanogramos, picogramos) y velocidad, ya que la señal se genera en pocos segundos y en algunos casos estable por varias horas, no se generan residuos peligrosos y su procedimiento es simple (22).

Hoy en día, los sistemas que llevan a cabo esta reacción fueron especialmente diseñados para realizar inmunoensayos y están totalmente automatizados. La quimilumiscencia es uno de los métodos de lectura con mayor sensibilidad en la actualidad. El empleo de dos anticuerpos monoclonales que reconocen dos epitopos distintos de la molécula de insulina permite la reacción inmunológica en dos sitios diferentes, amplificando la señal y por lo tanto la sensibilidad del método (20).

El inmunoensayo que realizan estos equipos automatizados es de tipo “sándwich”, en el cual el antígeno de la muestra del paciente queda en medio del anticuerpo covalentemente unido a las partículas paramagnéticas y al anticuerpo marcado con el éster de acridina. Una relación directa existe entre la concentración de antígeno en el muestra del paciente y la cantidad de luz emitida durante la oxidación de el éster de acridina en la celda de reacción (29).

Para leer la señal quimioluminiscente, el equipo tiene un fotomultiplicador (PMT), que es un fotodetector que recibe la señal en forma de fotones y los convierte en pulsos eléctricos. El detector debe ser capaz de detectar una señal luminosa de varios órdenes de magnitud de intensidad, desde unos pocos fotones por segundo a decenas de millones por segundo y debe ser sensible al menos en la región espectral de 400-600nm, idealmente en la región completa del visible (380-750 nm) (30).

El sistema cuenta estos pulsos eléctricos y calcula el resultado comparando la cuenta de pulsos eléctricos obtenido con una curva maestra definida para cada ensayo y específico de la casa comercial, calculando así la concentración (29). La señal registrada por el detector debe estar relacionada directamente con la intensidad de luz que ha llegado a él, idealmente directamente proporcional en todo el intervalo de sensibilidad requerido. La señal producida por el detector debe ser fácilmente leída, registrada y analizada (30).

Los métodos de MEIA e IQMA se realizaron en equipos totalmente automatizados. A continuación se mencionan algunas de las ventajas y desventajas que representa el empleo de los mismos:

Ventajas:

- ♣ Se elimina la generación de desechos radiactivos.
- ♣ Se minimizan los tiempos de proceso de la muestra.
- ♣ Cuenta con lector de código de barras para identificar muestras y reactivos permitiendo un mejor control de los mismos evitando confusiones y disminuyendo el tiempo de programación.
- ♣ Cuentan con acceso continuo de muestras y reactivos necesarios en forma constante sin necesidad de interrumpir el trabajo que se está realizando y así, disminuye y optimiza el tiempo de trabajo de rutina.

Desventajas:

- ♣ Costo del equipo y reactivos.
- ♣ La compra de reactivos debe hacerse sólo con la casa comercial del equipo, ya que los reactivos son específicos para cada equipo.

3. JUSTIFICACIÓN

La insulina es una hormona que está implicada en enfermedades metabólicas como DM y resistencia a la insulina, padecimientos que tienen alta prevalencia en México y que representan un gran impacto en el sector salud. Actualmente, las cuantificaciones de insulina en suero humano no son confiables debido a la poca reproducibilidad en los resultados de laboratorio, aún empleando la misma técnica y equipo, por lo que su determinación se considera de poca relevancia para el diagnóstico, tratamiento, y seguimiento de las patologías relacionadas con dicha hormona.

El propósito de este trabajo es documentar la evaluación y correlación que existe entre tres métodos comerciales para la determinación de insulina en suero; dicha comparación puede emplearse como una herramienta útil para mejorar la reproducibilidad y en consecuencia aumentar la confiabilidad de esta determinación, dada la importancia de las patologías a las que esta hormona está asociada.

4.1. OBJETIVO GENERAL

Comparar los métodos de RIA, MEIA e IQMA, empleados comercialmente para la determinación de insulina en suero humano.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la reproducibilidad, precisión y sensibilidad de los métodos de RIA, MEIA e IQMA para la determinación de insulina en controles caseros internos, controles internos comerciales y muestras de suero humano.
- Determinar si los métodos de RIA, MEIA e IQMA presentan correlación o no para la cuantificación de insulina en suero humano.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la evaluación del RIA, MEIA e IQMA se determinó la concentración de insulina en controles comerciales, controles internos caseros y suero humano.

5.1. Controles comerciales DPC

Se emplearon controles comerciales DPC-4 (bajo), DPC-5 (medio) y DPC-6 (alto), que se utilizan para realizar el Control de Calidad interno del ensayo de RIA para la cuantificación de insulina con el estuche comercial Coat-A-Count Insulin. Lote:020, con fecha de caducidad de mayo de 2007. Los valores de insulina para cada uno se muestran en la tabla siguiente:

CONTROL	MEDIA ($\mu\text{U/mL}$)	RANGO ($\mu\text{U/mL}$)
DPC-4	7.5	6.0-9.0
DPC-5	32	27.0-37.0
DPC-6	104	86.0-122.0

5.2. Controles internos caseros

Los controles internos se prepararon a partir de una solución inyectable de Insulina Humulin^R R de acción rápida. Humulin^R R, (insulina humana, origen: ADN recombinante, Lilly), que se sintetiza en una cepa no patógena de Escherichia coli, que ha sido modificada genéticamente mediante la adición de un gen humano para producción de insulina, siendo estructuralmente idéntica a la insulina producida por el páncreas. Esta solución es de uso terapéutico y está compuesta por cristales de insulina-zinc disueltos en una matriz transparente. Como aditivos contiene glicerina, m-cresol como conservador e hidróxido de sodio y/o HCl para ajustar el pH.

Preparación de Controles Internos Caseros

Para preparar los controles internos caseros se emplearon los siguientes materiales y reactivos: Solución inyectable de 100 UI/mL de insulina Humulin^R R para realizar las primeras diluciones. Como matriz se empleo suero humano, que se preparó a partir de un “pool” de suero (500 mL aproximadamente) más azida de sodio como conservador, manteniéndose en agitación durante una hora.

Se realizaron las siguientes diluciones:

Solución 1: 100 μ L de insulina Humulin^R R + 9.9 mL de suero. Dilución 1:100.

Solución 2: 100 μ L de la solución 1 + 9.9 mL de suero. Dilución 1:100 (Control alto).

Solución 3: 100 μ L de la solución 2 + 9.9 mL de suero. Dilución 1:100 (Control medio).

Solución 4: 100 μ L de la solución 3 + 9.9 mL de suero. Dilución 1:100 (Control bajo).

Se determino la concentración de insulina por la técnica de RIA de las soluciones 2, 3 y 4.

Las concentraciones obtenidas se muestran en la siguiente tabla:

SOLUCIÓN	Concentración de insulina (μ U/mL)
2	680
3	650
4	622

Como se observa, las concentraciones obtenidas fueron muy similares, por lo que nuevamente se realizaron diluciones, en este caso únicamente de la solución 4. La dilución que se realizó y la concentración de insulina que se obtuvo por RIA se muestra en la siguiente tabla:

DILUCIÓN (Sol. 4)	Concentración de insulina ($\mu\text{U/mL}$)
1 a 100	311
1 a 50	510
1 a 10	571

Posteriormente se diluyó la dilución de insulina que tenía una concentración de 311 $\mu\text{U/mL}$ como sigue:

DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN DE INSULINA ($\mu\text{U/mL}$)
1 a 20	180.5
1 a 50	13.1

Finalmente se realizaron 10 repeticiones de la dilución de la Sol. 4, así como de sus diluciones 1:20 y 1:50 por RIA, se obtuvo una precisión aceptable, estableciéndose así los valores para cada control, que se muestran en la siguiente tabla:

CONTROL CASERO	CONCENTRACIÓN DE INSULINA ($\mu\text{U/mL}$)
Alto	311
Medio	180.5
Bajo	13.1

Los controles se guardaron en alicuotas para posteriores ensayos y se almacenaron a una temperatura de -40°C .

5.3. Muestras de suero

Se procesaron 55 muestras de alumnos de la Facultad de Química de la UNAM; entre 18 y 25 años de edad. Previamente a la toma de muestra el alumno (a) firmó una carta de consentimiento y contestó un cuestionario de datos generales, medidas antropométricas, antecedentes heredofamiliares y factores de riesgo para DM.

Obtención, recolección y tratamiento de la muestra:

- En ayuno.
- Aproximadamente 5 mL de sangre por venopunción en tubo sin anticoagulante.

- Después de 10 minutos de refrigeración (para promover la retracción del coágulo), se centrifugaron durante 15 minutos a 3500 rpm.
- Una vez separado el suero se hicieron cuatro alícuotas para determinaciones posteriores, conservándose a -40°C.

5.4. MÉTODOS A EVALUAR

Los métodos a evaluar, la casa comercial, el lote y la fecha de caducidad se enlistan en la siguiente tabla:

MÉTODO	CASA COMERCIAL	KIT	EQUIPO	LOTE
RIA	DPC	Coat-A-Count Insulin	Téc. Manual	929
MEIA	ABBOTT	Insulin	IMx	87
IQMA	DPC	Insulin	Immulite 2000	220

5.4.1. RADIOINMUNOANÁLISIS

I. Utilidad de la prueba

La técnica de insulina Coat-A-Count es un radioinmunoensayo (empleando como marcador I¹²⁵), diseñado para la medición cuantitativa de la insulina en suero. Está diseñado estrictamente para uso diagnóstico *in vitro* como auxiliar en el diagnóstico clínico.

II. Principio del ensayo

El ensayo se lleva a cabo en fase sólida, donde insulina marcada con I¹²⁵ compete durante un tiempo fijo con la insulina de la muestra del paciente por sitios de unión al anticuerpo específico para la insulina (policlonal de ratón).

Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno, la simple decantación del sobrenadante es suficiente para terminar la reacción de competencia y aislar la fracción de anticuerpo unido de la insulina marcada con el isótopo. La lectura del tubo en un contador gamma, proporciona entonces un número de cuentas que se convierte por medio de una curva de calibración en la concentración de insulina presente en la muestra del paciente y controles.

III. Reactivos y equipo

El estuche para determinar insulina por el método de RIA contiene tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos anti-insulina (TIN1), en donde se lleva a cabo la reacción. Un vial de un concentrado de insulina iodada I^{125} Insulina (TIN2), que es la insulina marcada. Calibradores de Insulina (INC3-9), que consta de un juego de 7 viales marcados de la A a la G, en una matriz de suero humano liofilizada. Los calibradores reconstituidos contienen aproximadamente: 0, 5, 15, 50, 100, 200 y 350 μ UI/mL de insulina, el estándar empleado es el WHO1st IRP66/304; y por último controles-DPC.

Para realizar la determinación de radiactividad se requiere de un contador gamma. Aparte de lo que incluye el kit, se requieren tubos de ensayo de polipropileno de 12X75 mm para usar como tubos de contaje total, así como las pipetas y gradillas necesarias para el ensayo.

IV. Muestra

Se recomienda emplear suero, el volumen requerido es de 200 μ L. Si la determinación no se lleva a cabo de inmediato deberá almacenarse a una temperatura de 2 a 8°C durante 7 días, o hasta 3 meses congeladas a -20°C.

V. Procedimiento

Antes del ensayo, los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente. Una vez que se rotulan los tubos para su identificación, se agregan 200 µL de calibrador, control y muestra del paciente, pipeteando directamente en el fondo del tubo. Posteriormente se agrega 1.0 mL de Insulina marcada con I¹²⁵ a cada tubo y se homogeniza la muestra en vórtex. No deben pasar más de cuarenta minutos entre los dos últimos pasos.

Se incuba de 18-24 horas a temperatura ambiente (15-28°C), después de este tiempo se decanta el sobrenadante y se procede a la lectura en el contador gamma (durante un minuto).

VI. Valores esperados

El inserto menciona que un estudio de 103 sueros de voluntarios adultos con niveles de glucosa menores o iguales a 110 mg/dL, el ensayo de Insulina Coat-A-Count proporcionó una mediana de 8.3 µUI/mL. Cada laboratorio deberá establecer su intervalo de referencia.

VII. Características analíticas

Intervalo de Calibración según el inserto: 5-350 µUI/mL (WHO 1st IRP 66/304). Los calibradores son específicos para cada lote.

Sensibilidad analítica según el inserto: 1.2 µUI/mL.

Precisión (Reportada en el inserto)

R I A			
Precisión intraensayo ($\mu\text{UI/mL}$)			
	Promedio	DE	CV (%)
1	17	1.6	9.3
2	39	2	5.1
3	80	2.8	3.5
4	117	3.6	3.1
5	278	14	5
Precisión interensayo ($\mu\text{UI/mL}$)			
1	16	1.6	10
2	35	2.5	7.1
3	76	5.5	7.2
4	95	4.7	4.9

Especificidad

El antisuero de insulina Coat-A-Count es altamente específico para insulina, con una reactividad cruzada particularmente baja con otros compuestos (que no sean insulina y proinsulina) que puedan estar presentes en las muestra del paciente.

Analito	Cantidad añadida (ng/mL)	Reactividad cruzada (%)
Proinsulina	5	32
Péptido C	1000	No detectable
Glucagon	1000	No detectable

Interferencia

Una ictericia severa, hasta 20 mg/dL de bilirrubina puede ser causa de incremento falso en los valores de insulina. La presencia de eritrocitos en concentraciones de hasta 30 $\mu\text{L/mL}$ puede generar resultados falsamente bajos. La lipemia no interfiere con el ensayo.

VIII. CONTROL DE CALIDAD

Los controles o "pools" de suero con al menos dos niveles de concentración de insulina (bajo y alto) deberán ensayarse rutinariamente como muestras.

5.4.2. ENZIMOINMUNOENSAYO DE MICROPARTÍCULA

I. Utilidad de la prueba

El equipo empleado para evaluar este método fue el sistema IMx de la casa comercial Abbott. El ensayo de Abbott IMx Insulin es un MEIA para la determinación cuantitativa de la insulina humana en suero y plasma humano.

II. Principio del análisis

El sistema IMx se diseñó para realizar enzimoinmunoensayos de partícula (MEIA), usando sustratos fluorogénicos. La técnica de MEIA emplea:

- Micropartículas cubiertas con una molécula de captura (antígeno o anticuerpo).
- Conjugado (fosfatasa alcalina-anticuerpo específico).
- Sustrato fluorogénico, 4-metilumbeliferil fosfato, (MUP).
- Celda de reacción, que contiene una matriz de fibra de vidrio a la cual se une el complejo.

El equipo IMx transfiere la muestra y las micropartículas cubiertas con anticuerpo anti-insulina (moléculas de captura) al pozo de reacción. Durante el periodo de incubación, la insulina se une a las micropartículas, formando el complejo antígeno-anticuerpo.

Después del periodo de incubación, el equipo transfiere la cantidad del complejo formado a una matriz inerte de fibra de vidrio. El complejo formado se va a unir irreversiblemente a la matriz, y lo que no se unió se elimina mediante un lavado.

Una vez que se elimina lo que no se unió, el equipo añade a la matriz de fibra de vidrio el conjugado Fosfatasa alcalina-anticuerpo. Este conjugado se une al complejo antígeno-anticuerpo formado previamente, completando así el “sándwich” anticuerpo-analito-conjugado. El equipo lava nuevamente la matriz para eliminar el conjugado que no se unió.

El sistema óptico del equipo mide la velocidad a la cual MU, (producto fluorescente) se genera en la celda de reacción. La velocidad a la que se forma el MU es proporcional a la concentración de insulina en la muestra.

III. Reactivos

Se emplean micropartículas recubiertas de anticuerpo monoclonal de ratón contra insulina humana como fase sólida. Conjugado de anticuerpo monoclonal de ratón contra insulina + fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo. Sustrato enzimático 4-metilumbeliferil fosfato. Calibrador IMx Insulin MODE 1 en concentración de 30 $\mu\text{U}/\text{mL}$ de insulina humana y calibradores IMx Insulin.

Los calibradores IMx Insulin contienen insulina humana derivada de porcino, en las siguientes concentraciones:

CALIBRADOR	Concentración de insulina ($\mu\text{U}/\text{mL}$)
CAL A	0
CAL B	3
CAL C	10
CAL D	30
CAL E	100
CAL F	300

Los calibradores se correlacionan con el primer preparado de referencia internacional de insulina de la Organización Mundial de la Salud (OMS) a un 92.5% de la concentración de la OMS.

Los controles de IMx insulin contienen insulina humana derivada de porcino, preparada en tampón para dar los siguientes intervalos de concentración:

Control	Insulina ($\mu\text{U}/\text{mL}$)	Intervalo ($\mu\text{U}/\text{mL}$)
Bajo	8	6 a 10
Medio	40	32 a 48
Alto	120	96 a 144

IV. Muestra

Puede emplearse plasma (empleando como anticoagulante EDTA o heparina) o suero, el volumen muestra que se requiere para realizar el ensayo es de 150 μL . Si el análisis se realiza dentro de las 24 horas siguientes a la obtención de la muestra, debe almacenarse entre 2-8°C. Si el análisis se realiza a más de 24 horas las muestras deben congelarse.

V. Procedimiento

Los reactivos IMx Insulin y la muestra se dispensan en la celdilla de reacción en el siguiente orden:

- El equipo dispensa la muestra y las micropartículas en el pocillo de incubación de la celdilla de reacción, formándose un complejo anticuerpo-insulina.
- Una alícuota de la mezcla de reacción que contiene insulina unida a las micropartículas recubiertas de anticuerpos frente a la insulina se transfiere a la matriz de fibra de vidrio. Se realiza un lavado para eliminar lo que no se unió.

- El conjugado de anticuerpos frente a la insulina+fosfatasa alcalina se dispensa en la matriz y se une al complejo anticuerpo-antígeno. La matriz se lava para eliminar el conjugado que no se unió.
- Se añade el sustrato, 4-metilumbeliferil fosfato a la matriz y el sistema óptico MEIA mide la tasa de formación del producto fluorescente (MU).

VI. Valores esperados

El inserto menciona que se analizaron con el ensayo IMx Insulin 148 muestras de personas sanas tomadas en ayunas y provenientes de una población estadounidense representativa. La concentración media fue de 7.1 $\mu\text{U}/\text{mL}$ con una DE de ± 3 de 15.6 $\mu\text{U}/\text{mL}$.

VII. Características analíticas

Intervalo de calibración según el inserto: 300 $\mu\text{UI}/\text{mL}$.

Sensibilidad según el inserto: 1.0 $\mu\text{UI}/\text{mL}$.

Especificidad: La adición de 1000 ng/mL en muestras de suero con concentraciones bajas de insulina, se encontró un 0.005% de reactividad cruzada. No se observó reactividad cruzada detectable con péptido-C (1,000 ng/mL), ni con glucagon (1,000,000 pg/mL).

Interferencias: Se estudió la interferencia producida por triglicéridos en concentraciones de hasta 1600 mg/dL y bilirrubina (hasta 20 mg/dL). A estas concentraciones no se observó ningún efecto sobre la determinación de la concentración de insulina.

5.4.3. ENZIMOINMUNOENSAYO ACOPLADO A QUIMIOLUMINISCENCIA

I. Utilidad de la prueba

La evaluación del método se realizó en el equipo automatizado Immulite 2000, de la casa comercial DPC, para la medición cuantitativa de insulina en suero o plasma heparinizado.

II. Principio del análisis

Immulite 2000 Insulina es un ensayo inmunométrico con dos sitios de unión quimioluminiscente en fase sólida. Con un tiempo de incubación de 60 minutos.

III. Reactivos

Se emplea un cartucho de perlas de insulina recubiertas de anticuerpos monoclonales murinos anti-insulina como fase sólida; un vial de reactivo de insulina que contiene fosfatasa alcalina conjugada con anticuerpos policlonales de oveja anti-insulina y fosfatasa alcalina conjugada con anticuerpo monoclonal de ratón anti-insulina como segundo anticuerpo; los ajustadores del ensayo constan de dos viales (niveles bajo y alto) de insulina liofilizada en una matriz sérica no humana. El ajuste o calibración deberá realizarse cada dos semanas y por último los controles de insulina (LINC1, LINC2) que son dos viales de insulina liofilizada en una matriz sérica no humana. Los controles deben procesarse en cada corrida del equipo.

Los controles deben analizarse como muestras desconocidas, de la misma forma en que se analizan las muestras de los pacientes, en un programa interno de control de calidad. En la siguiente tabla se muestran los rangos de los controles empleados que corresponden al estuche que se empleó.

Controles para Immulite 2000 Insulin		
NIVEL	MEDIA ($\mu\text{U/mL}$)	SD ($\mu\text{U/mL}$)
LINC10111	9.8	0.72
LINC20111	47	3.3

IV. Muestra

La muestra se recolecta en un tubo sin anticoagulante o con heparina. La cantidad de muestra requerida para el ensayo es de 100 μL de suero o plasma heparinizado. La muestra puede almacenarse 7 días a una temperatura de 2 a 8°C o tres meses a -20°C.

V. Procedimiento

El sistema Immulite 2000 es un equipo totalmente automatizado que emplea perlas de poliestireno recubiertas de anticuerpos contra insulina como fase sólida. El sistema dispensa una perla en una copa específicamente diseñada, que sirve como celda de reacción para los procesos posteriores y dispensa la muestra, el conjugado formado por el anticuerpo + fosfatasa alcalina y agua. La copa de reacción es trasladada al área de incubación, donde se incuba a 37°C durante 60 minutos para que se lleve a cabo la reacción antígeno-anticuerpo.

Tras incubar la muestra con los anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina, la mezcla de reacción se separa de la perla centrifugando la copa de reacción. Posteriormente, el sistema realiza cuatro lavados, permitiendo que la copa de reacción se procese secuencialmente, dejando la perla sin marcaje residual.

A continuación el equipo añade el sustrato luminogénico Lumigen (fosfato de adamantil dioxetano). El Lumigen se desfosforila en un anión intermedio inestable por la fosfatasa alcalina unido a la perla. El anión intermedio inestable emite un fotón al estabilizarse y la cantidad de luz emitida es directamente proporcional a la cantidad de fosfatasa alcalina ligada.

El tubo PTM detecta y mide la cantidad de luz generada, calcula la concentración a partir de la curva patrón e imprime el resultado.

VI. Valores esperados

El inserto menciona que un estudio llevado a cabo con 83 voluntarios aparentemente sanos y en ayunas, dio una media de 9.3 $\mu\text{UI/mL}$ y un intervalo de referencia inferior al 95% de los sujetos, hasta 29.1 $\mu\text{UI/mL}$.

VII. Características analíticas

Rango de calibración indicado en el inserto: Hasta 300 $\mu\text{UI/mL}$.

Sensibilidad según el inserto: 2 $\mu\text{UI/mL}$ (WHO NIBSC 1st IRP 66/304).

Precisión: Las muestras fueron procesadas por duplicado durante 20 días, en dos corridas de trabajo por día, para un total de 40 corridas y 80 replicados.

Precisión ($\mu\text{UI/mL}$)			
Muestra	Promedio	DE	CV (%)
1	7.67	0.42	5.5
2	12.5	0.5	4
3	17.2	0.57	3.3
4	26.4	1.04	3.9
5	100	3.75	3.8
6	291	10.8	3.7

Especificidad:

ANALITO	Cantidad agregada (ng/mL)	Reactividad cruzada (%)
Péptido-C	1 000	No detectable
Glucagon	1 000	No detectable
Proinsulina	10	8%

Interferencias: Niveles de bilirrubina a una concentración mayor de 20 mg/dL puede causar disminución de los valores. La lipemia puede causar disminución en la concentración de insulina.

La siguiente tabla menciona algunas características de los métodos a evaluar:

	RIA	MEIA	IQMA
Generación	1era.	2da.	2da.
Sistema	Heterogéneo	Heterogéneo	Heterogéneo
Reacción	Competitiva	ELISA "sandwich"	ELISA "sandwich"
Contenedor	Tubo de polipropileno	Celdilla de reacción	Copa de reacción
Fase sólida	Tubo de polipropileno	Micropartícula	Perla
Marcador	Radiactivo (I^{125})	Fluorescente (4-metilumbeliferil fosfato)	Quimioluminiscente (fosfato de adamantil dioxetano)
Anticuerpo	Policlonal de ratón	Fase sólida: Monoclonal de ratón Conjugado: Monoclonal de ratón	Fase sólida: Monoclonal de murino Conjugado: Policlonal de oveja y monoclonal de ratón
Estándar	WHO 1st IRP66/304	WHO IS 83/500	WHO NIBSC 1st IRP 66/304
Muestra	Suero	Suero o plasma	Suero o plasma
Volumen de mta.	200 μ L	150 μ L	100 μ L
Intervalo de calibración	350 μ U/mL	300 μ U/mL	300 μ U/mL
Sensibilidad	1.2 μ U/mL	1.0 μ U/mL	2 μ U/mL

6. RESULTADOS

Para evaluar cada uno de los métodos se determinó la concentración de insulina en controles internos comerciales, controles internos caseros y suero humano. El método de RIA se realizó de manera manual, empleando reactivos de la casa comercial DPC; el método de MEIA se evaluó en el equipo IMx de la casa comercial Abbott, y el método de IQMA se evaluó en el equipo Immulite 2000, de la casa comercial DPC.

6.1. CONTROLES INTERNOS COMERCIALES

En la siguiente tabla (Tabla 1) se muestran los valores obtenidos de los controles internos comerciales de la marca DPC. En todos los métodos se realizaron dos ensayos, en cada ensayo se determinó por triplicado cada control.

Tabla 1. Determinación de insulina en controles internos comerciales.

INSULINA ($\mu\text{U}/\text{mL}$)			
CONTROL COMERCIAL	M É T O D O		
	RIA	MEIA	IQMA
DPC-4	5.1	16.8	7.9
	5	16.5	6.8
	5.6	15.3	7.2
	7.4	14.2	8.3
	6.2	14	8.1
	5	14.9	7.7
Promedio	5.7	15.3	7.7
Desviación estándar	0.9	1.1	0.6
CV (%)	15.8	7.1	7.8

Valor esperado: Media=7.5, Rango=6.0-9.0 $\mu\text{U}/\text{mL}$.

INSULINA ($\mu\text{U/mL}$)			
	RIA	MEIA	IQMA
DPC-5	34.3	37.6	13.7
	32.1	37.1	16
	35.4	38.2	15.7
	30.9	39.2	15.1
	31.8	38.3	16.3
	34.2	34.3	15.5
Promedio	33.1	37.4	15.3
Desviación estándar	1.7	1.7	0.9
CV (%)	5.1	4.5	5.8
Valor esperado: Media=32, Rango=27.0-37.0 $\mu\text{U/mL}$.			

INSULINA ($\mu\text{U/mL}$)			
	RIA	MEIA	IQMA
DPC-6	87.5	122.9	41.5
	98.8	126.7	44.4
	76.3	118.3	45.4
	104.6	118.6	44.1
	88.3	109.2	47.8
	91.3	112.4	43.2
Promedio	91.1	118	44.4
Desviación estándar	9.8	6.4	2.1
CV (%)	10.7	5.4	4.7
Valor esperado: Media=104, Rango=86.0-122.0 $\mu\text{U/mL}$.			

Las siguientes tablas (2 a 4) muestran la precisión intra e interensayo de los controles internos comerciales.

Tabla 2. Precisión intra e interensayo de controles comerciales por el método de RIA.

R I A			
PRECISIÓN INTRAENSAYO ($\mu\text{U/mL}$)			
	Promedio	DE	CV (%)
DPC-4	5.2	0.3	5.8
	6.2	1	15.8
DPC-5	33.9	1.4	4
	32.3	1.4	4.3
DPC-6	87.5	9.2	10.5
	94.7	7.1	7.5
PRECISIÓN INTERENSAYO ($\mu\text{U/mL}$)			
	Promedio	DE	CV (%)
DPC-4	5.7	0.6	10.8
DPC-5	33.1	1.4	4.1
DPC-6	91.1	8.1	9

Tabla 3. Precisión intra e interensayo de controles comerciales por el método de MEIA.

M E I A			
PRECISIÓN INTRAENSAYO ($\mu\text{U/mL}$)			
	Promedio	DE	CV (%)
DPC-4	16.2	0.6	4
	14.3	0.4	2.7
DPC-5	37.6	0.4	1.2
	37.2	2.1	5.7
DPC-6	122.6	3.4	2.8
	113.4	3.9	3.4
PRECISIÓN INTERENSAYO ($\mu\text{U/mL}$)			
	Promedio	DE	CV (%)
DPC-4	15.2	0.5	3.3
DPC-5	37.4	1.2	3.4
DPC-6	118	3.6	3.1

Tabla 4. Precisión intra e interensayo de controles comerciales por el método de IQMA.

I Q M A			
PRECISIÓN INTRAENSAYO ($\mu\text{U/mL}$)			
	Promedio	DE	CV (%)
DPC-4	7.3	0.4	6.2
	8	0.2	3.1
DPC-5	15.1	1	6.7
	15.6	0.5	3.2
DPC-6	43.7	1.6	3.8
	45	2	4.4
PRECISIÓN INTERENSAYO ($\mu\text{U/mL}$)			
	Promedio	DE	CV (%)
DPC-4	7.7	0.3	4.6
DPC-5	15.3	0.7	4.9
DPC-6	44.3	1.8	4.1

La siguiente figura muestra las determinaciones de insulina que se obtuvieron por los tres métodos para el control DPC-4.

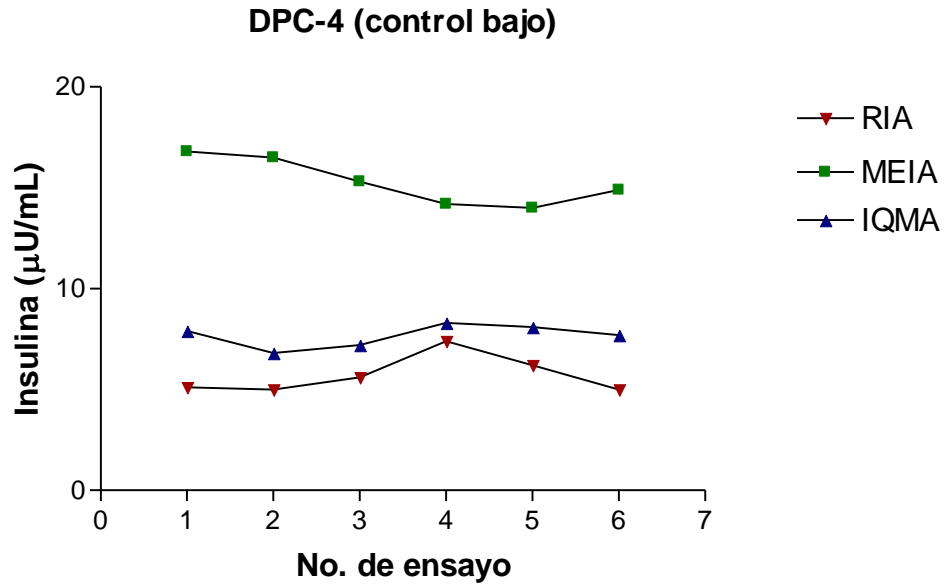


Figura 1. Determinación de insulina del control DPC-4 por RIA, MEIA e IQMA.

En las siguientes figuras (2, 3 y 4), se muestran las graficas obtenidas para determinar la correlación de los métodos entre sí.

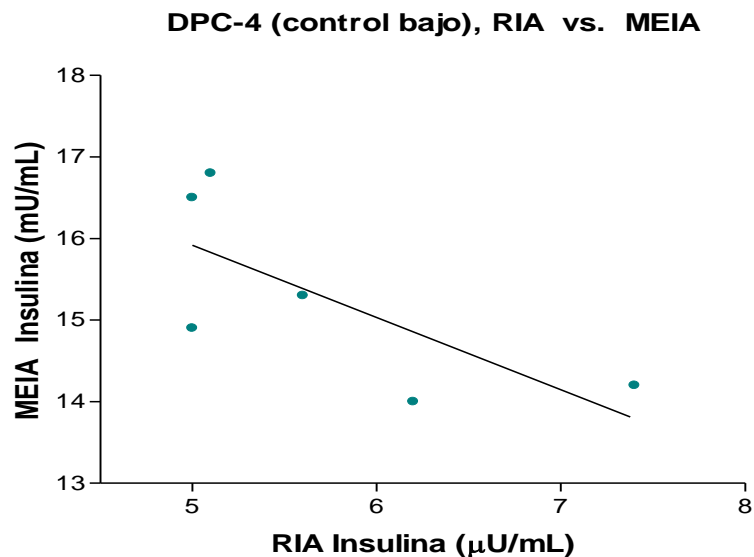


Figura 2. Correlación de los métodos de RIA y MEIA en la determinación de insulina del control DPC-4 (control bajo). $P=0.0014$; $r=-0.7229$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

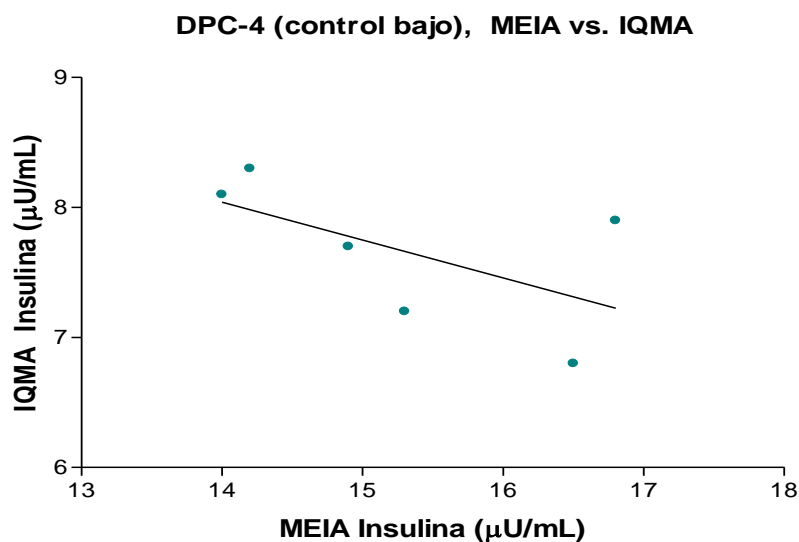


Figura 3. Correlación de los métodos de MEIA e IQMA en la determinación de insulina del control DPC-4 (control bajo). $P < 0.0001$; $r = -0.595$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

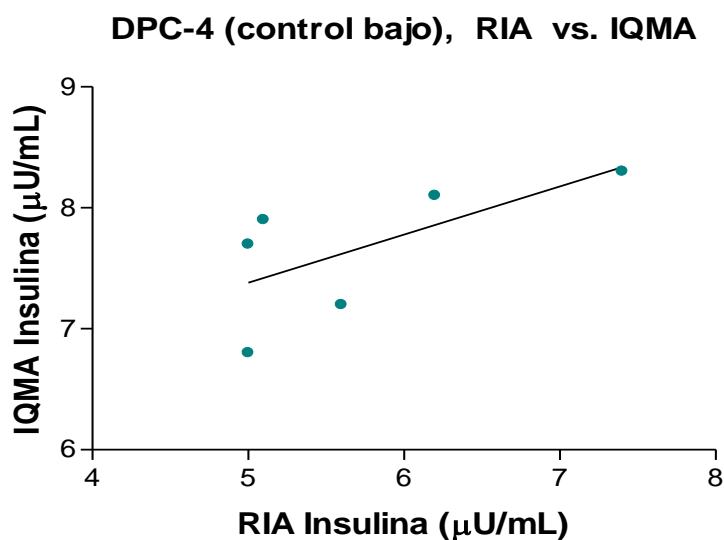


Figura 4. Correlación de los métodos de RIA e IQMA en la determinación de insulina del control DPC-4 (control bajo). $P = 0.0011$; $r = 0.6627$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

La siguiente figura (Fig. 5), muestra la concentración de insulina obtenida por los métodos a evaluar para el control DPC-5

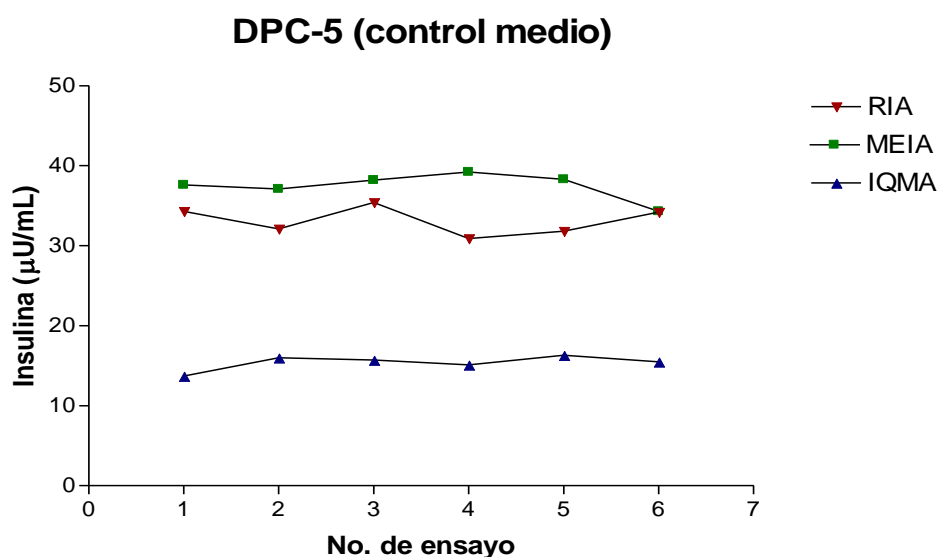


Figura 5. Determinación de insulina del control DPC-5 (control medio) por los métodos de RIA, MEIA e IQMA.

Las figuras 6, 7 y 8 muestran la correlación de los métodos para el control DPC-5.

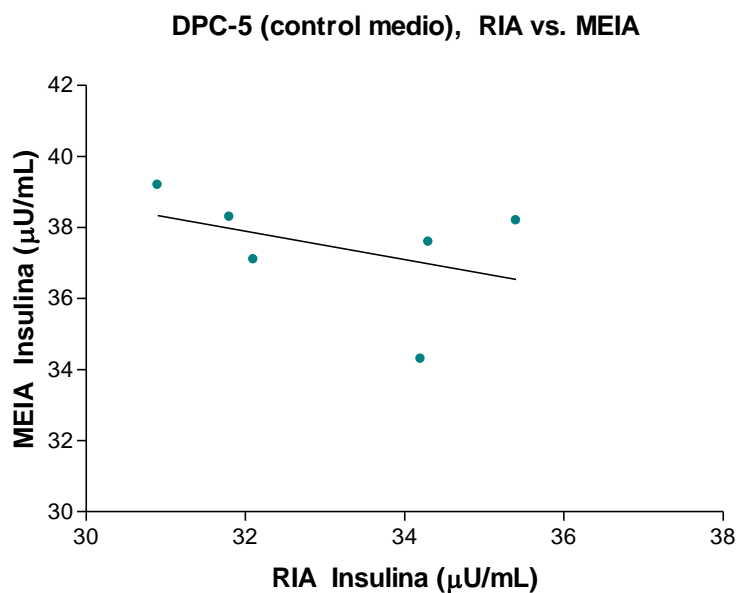


Figura 6. Correlación de los métodos de RIA y MEIA en la determinación de insulina del control DPC-5 (control medio). $P=0.0147$; $r=-0.4129$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

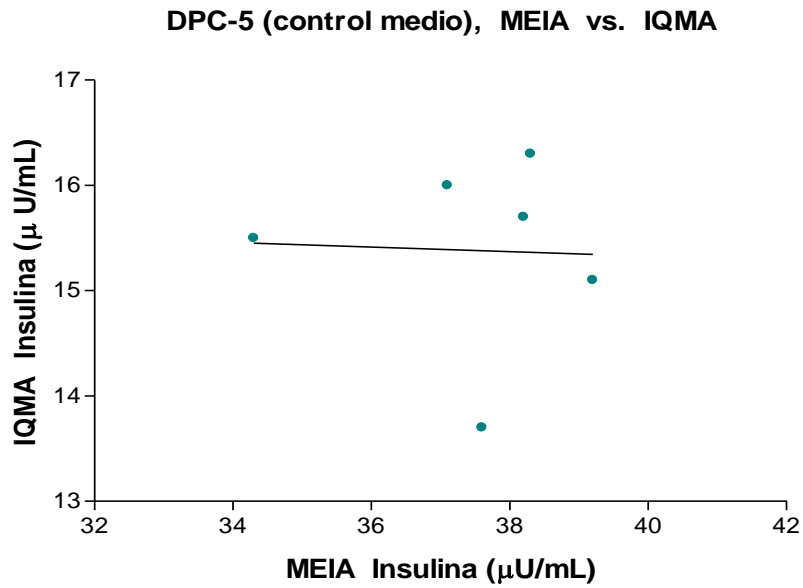


Figura 7. Correlación de los métodos de MEIA e IQMA en la determinación de insulina del control DPC-5 (control medio). $P < 0.0001$; $r = -0.0402$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

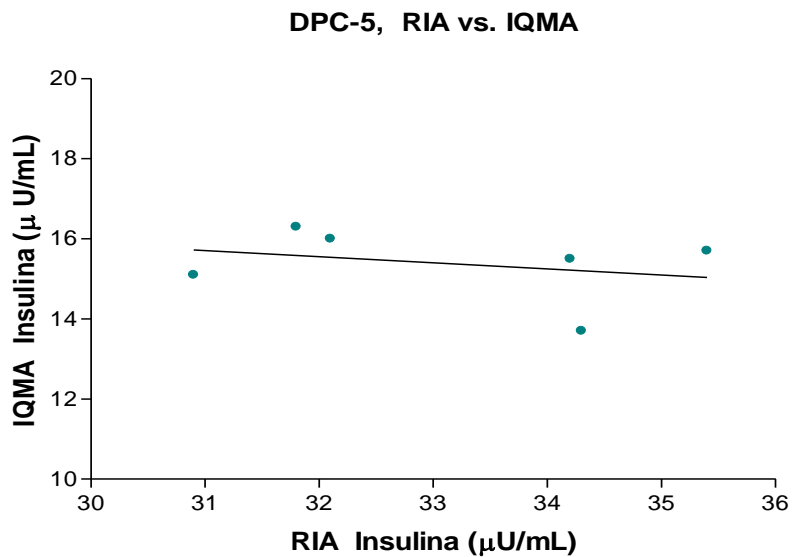


Figura 8. Correlación de los métodos de RIA e IQMA en la determinación de insulina del control DPC-5 (control medio). $P < 0.0001$; $r = -0.2897$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

En la siguiente figura puede observarse la concentración de insulina obtenida por los métodos a evaluar para el control interno comercial DPC-6.

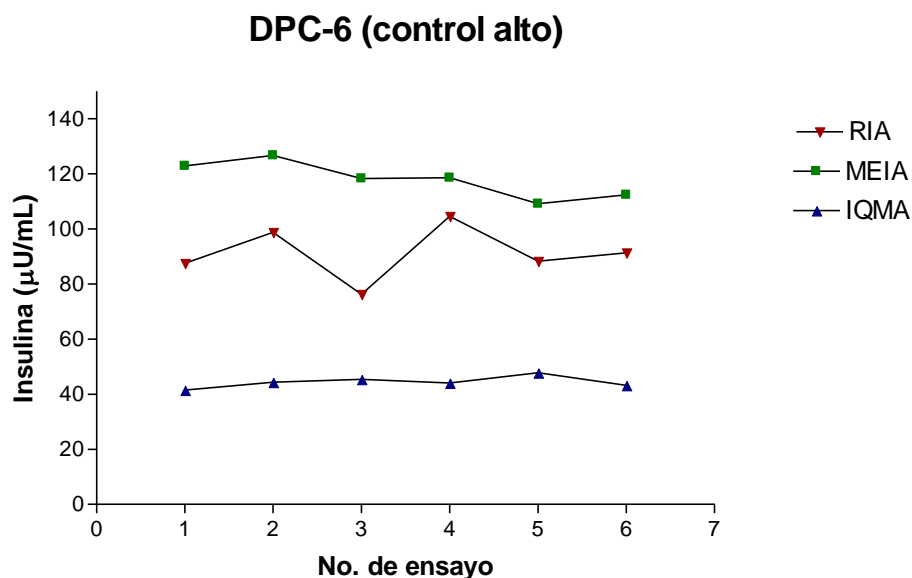


Figura 9. Determinación de insulina del control DPC-6 (control alto) por los métodos de RIA, MEIA e IQMA.

En las figuras 10 a 12 se muestran la correlación de métodos que se obtuvieron para el control DPC-6.

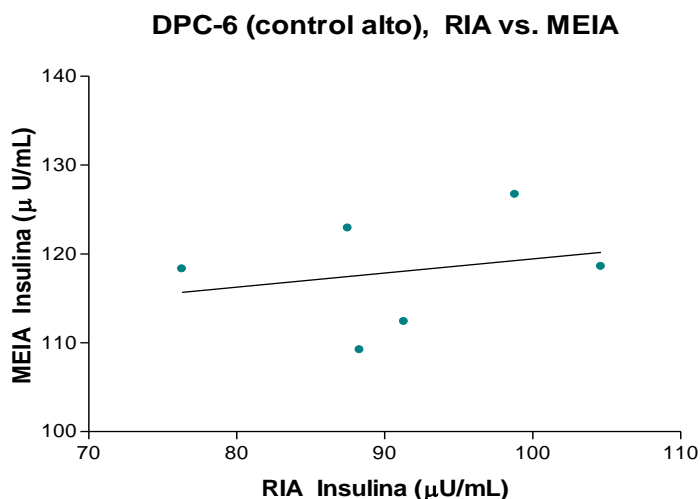


Figura 10. Correlación de los métodos de RIA y MEIA en la determinación de insulina del control DPC-6 (control alto). $P=0.0014$; $r=0.2413$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

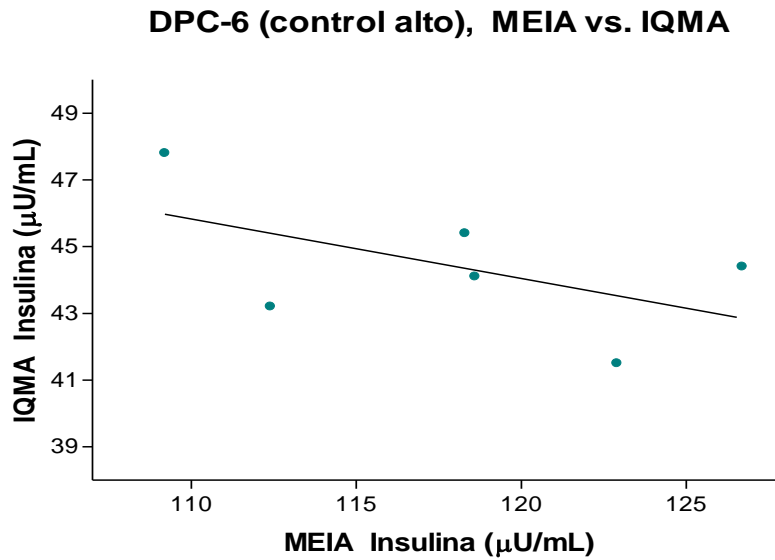


Figura 11. Correlación de los métodos de MEIA e IQMA en la determinación de insulina del control DPC-6 (control alto). $P < 0.0001$; $r = -0.5439$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

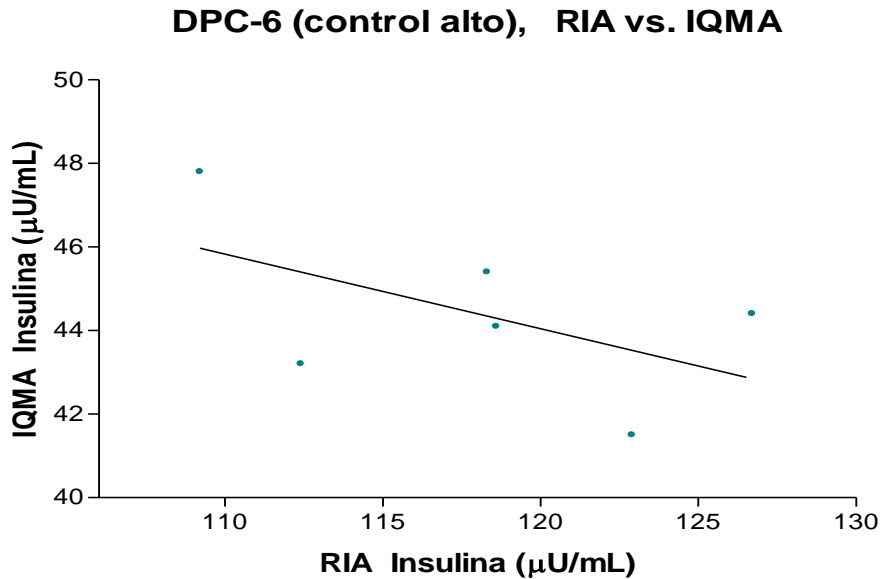


Figura 12. Correlación de los métodos de RIA e IQMA en la determinación de insulina del control DPC-6 (control alto). $P = 0.0001$; $r = -0.1746$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

6.2. CONTROLES INTERNOS CASEROS

La tabla 5 muestra los valores de insulina que se obtuvieron por los métodos de RIA, MEIA e IQMA para los controles internos caseros alto, medio y bajo.

Tabla 5. Determinación de insulina en controles internos caseros.

DETERMINACIÓN DE INSULINA ($\mu\text{U/mL}$)			
	M É T O D O		
	RIA	MEIA	IQMA
C. INTERNO BAJO	25.5	26.5	19.2
	21.5	26.8	19.6
	15.6	24.4	22
	16.5	23.5	20
	16.6	25.9	19.6
	19.1	27.8	22
Promedio	19.3	25.8	20.4
Desviación estándar	3.8	1.6	1.3
CV (%)	19.6	6.2	6.3
C. INTERNO MEDIO	173.5	159.7	103
	134.5	162.4	104
	153.7	151.5	105
	114.5	138.7	110
	150	155.7	103
	151.2	154.7	108
Promedio	146.2	153.8	105.5
Desviación estándar	19.9	8.3	2.9
CV (%)	13.6	5.4	2.7
C. INTERNO ALTO	204.9	202.2	127
	190.9	203.5	125
	177.9	197.9	130
	224.3	203.5	129
	183.2	200.6	119
	185	206.6	122
Promedio	194.4	202.4	125.3
Desviación estándar	17.3	2.9	4.2
CV (%)	8.9	1.4	3.3

Las tablas 6, 7 y 8 muestran la precisión intra e interensayo de controles internos caseros por el método de RIA, MEIA e IQMA. En todos los métodos se realizaron dos ensayos, en cada ensayo se determinó por triplicado cada control.

Tabla 6. Precisión intra e interensayo de controles internos caseros por el método de RIA.

R I A			
PRECISIÓN INTRAENSAYO ($\mu\text{U/mL}$)			
	Promedio	DE	CV (%)
CONTROL BAJO	20.8	4.1	19.5
	17.4	1.2	6.9
CONTROL MEDIO	153.9	15.9	10.3
	138.5	17	12.3
CONTROL ALTO	191.2	11	5.7
	197.5	18.9	9.6
PRECISIÓN INTERENSAYO ($\mu\text{U/mL}$)			
	Promedio	DE	CV (%)
CONTROL BAJO	19.1	2.6	6.3
CONTROL MEDIO	146.2	16.4	11.3
CONTROL ALTO	194.3	14.9	7.6

Tabla 7. Precisión intra e interensayo de controles internos caseros por el método de MEIA.

M E I A			
PRECISIÓN INTRAENSAYO ($\mu\text{U/mL}$)			
	Promedio	DE	CV (%)
CONTROL BAJO	25.9	1.1	4.1
	25.7	1.7	6.8
CONTROL MEDIO	157.8	4.6	2.9
	149.7	7.8	5.2
CONTROL ALTO	201.2	2.4	1.2
	203.5	2.4	1.2
PRECISIÓN INTERENSAYO ($\mu\text{U/mL}$)			
	Promedio	DE	CV (%)
CONTROL BAJO	25.8	1.4	5.4
CONTROL MEDIO	153.7	6.2	4
CONTROL ALTO	202.3	2.4	1.2

Tabla 8. Precisión intra e interensayo de controles internos caseros por el método de IQMA.

I Q M A			
PRECISIÓN INTRAENSAYO ($\mu\text{U/mL}$)			
	Promedio	DE	CV (%)
CONTROL BAJO	20.2	1.2	6.1
	20.5	1	5.1
CONTROL MEDIO	104	0.8	0.8
	107	2.9	2.7
CONTROL ALTO	127.3	2	1.6
	123.3	4.2	3.4

PRECISIÓN INTERENSAYO ($\mu\text{U}/\text{mL}$)			
	Promedio	DE	CV (%)
CONTROL BAJO	20.3	1.1	5.6
CONTROL MEDIO	105.5	1.8	1.7
CONTROL ALTO	125.5	3.1	2.5

La figura siguiente muestra la determinación de insulina del control interno casero bajo por los métodos a correlacionar.

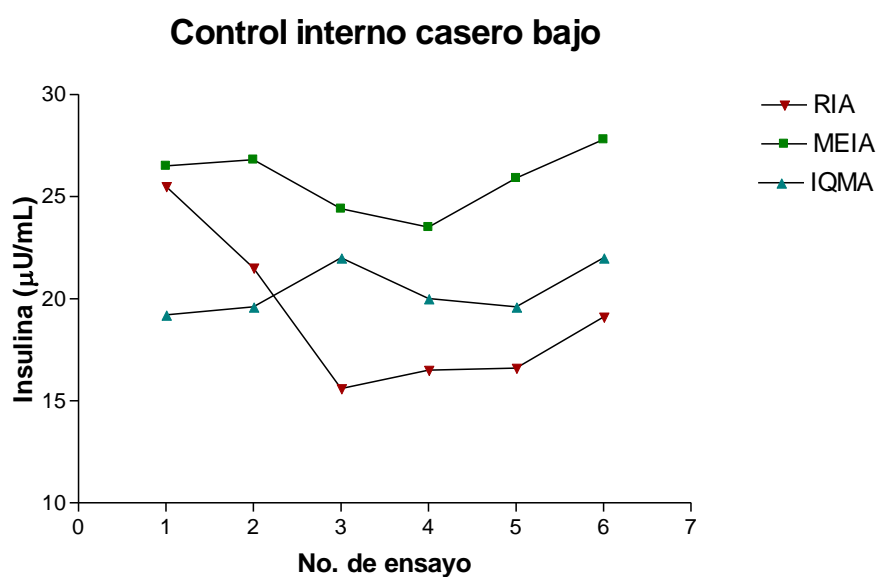


Figura 13. Determinación de insulina en control interno casero bajo por los métodos de RIA, MEIA e IQMA.

Las figuras 14, 15 y 16 muestran la correlación de los métodos a evaluar para el control interno casero bajo.

Control interno casero bajo, RIA vs. MEIA

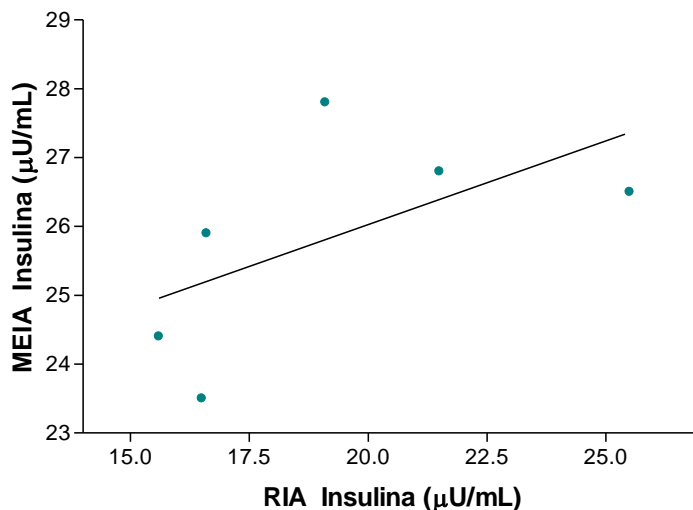


Figura 14. Correlación de los métodos de RIA y MEIA en la determinación de insulina del control interno casero bajo. $P=0.0035$; $r=0.578$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

Control interno casero bajo, MEIA vs. IQMA

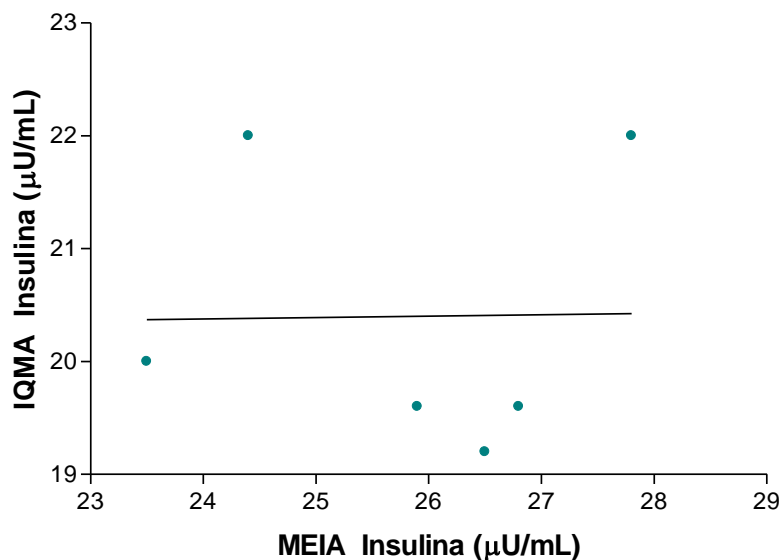


Figura 15. Correlación de los métodos de MEIA e IQMA en la determinación de insulina del control interno casero bajo. $P=0.0012$; $r=0.0158$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

Control interno casero bajo, RIA vs. IQMA

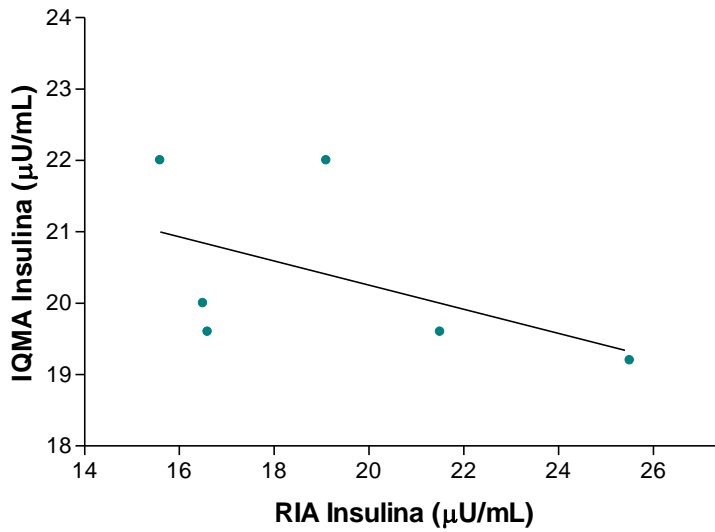


Figura 16. Correlación de los métodos de RIA e IQMA en la determinación de insulina del control interno casero bajo. $P=0.5271$; $r=-0.5068$; no hay una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

Control interno casero medio

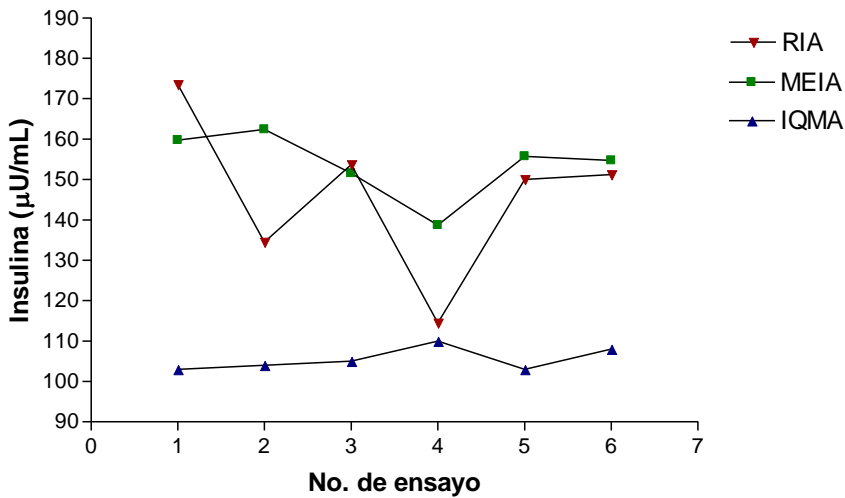


Figura 17. Determinación de insulina en control interno casero medio por los métodos de RIA, MEIA e IQMA.

Control interno casero medio, RIA vs. MEIA

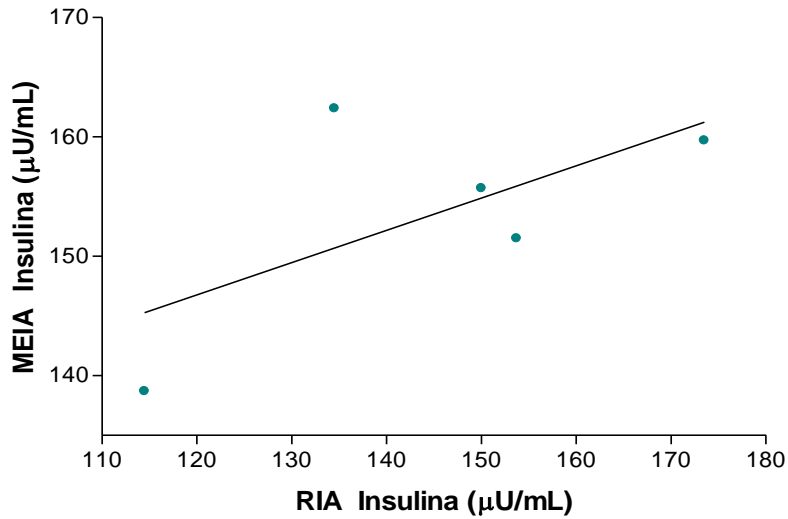


Figura 18. Correlación de los métodos de RIA y MEIA en la determinación de insulina del control interno casero medio. $P=0.2969$; $r=-0.6438$; no hay una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

Control interno casero medio, MEIA vs. IQMA

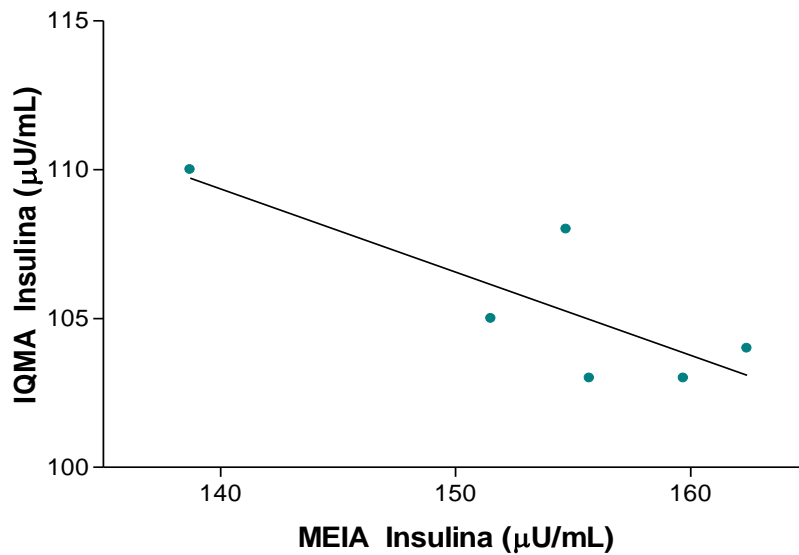


Figura 19. Correlación de los métodos de MEIA e IQMA en la determinación de insulina del control interno casero medio. $P=0.0257$; $r=-0.8085$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

Control interno casero medio, RIA vs. IQMA

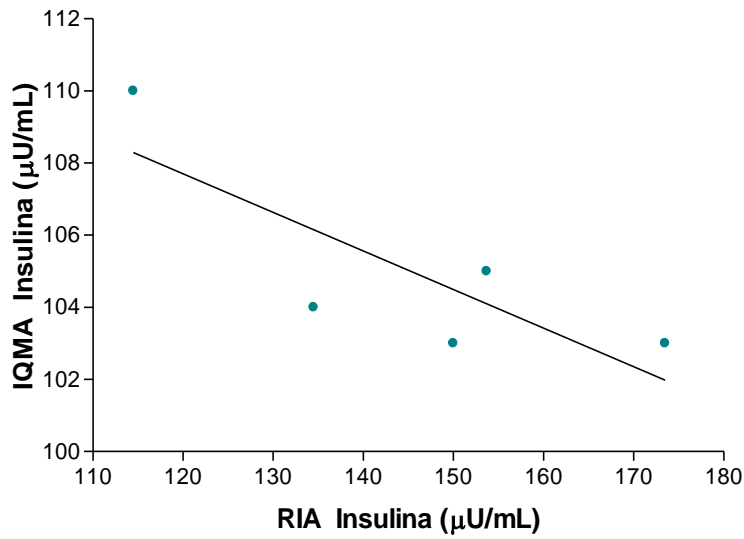


Figura 20. Correlación de los métodos de RIA e IQMA en la determinación de insulina del control interno casero medio. $P=0.0062$; $r=-0.811$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

Control interno casero alto

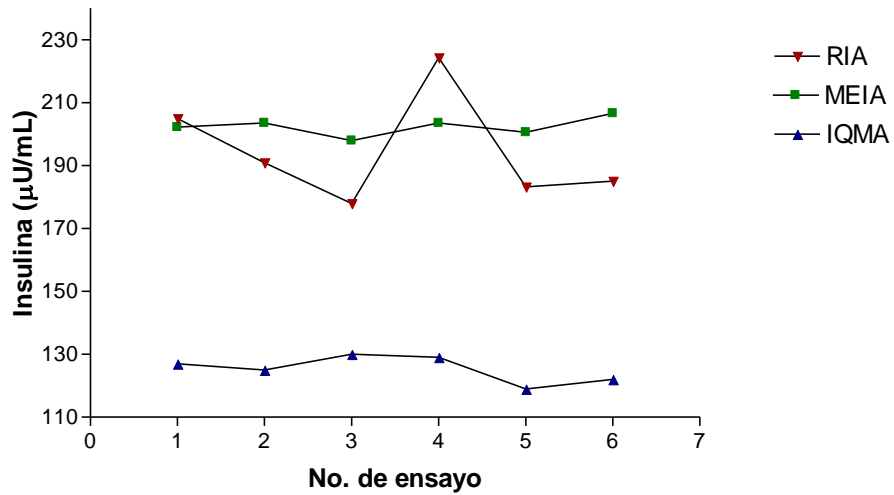


Figura 21. Determinación de insulina en control interno casero alto por los métodos de RIA, MEIA e IQMA.

Control interno casero alto, RIA vs. MEIA

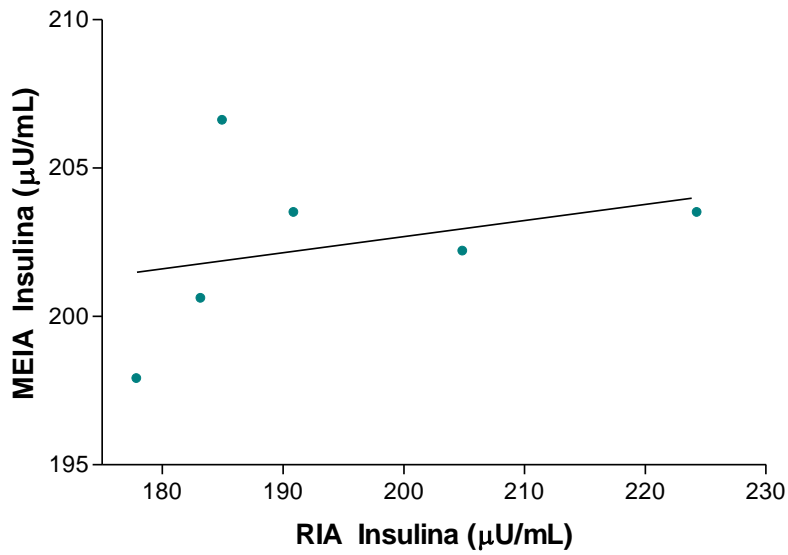


Figura 22. Correlación de los métodos de RIA y MEIA en la determinación de insulina del control interno casero alto. $P=0.2907$; $r=0.3199$; no hay una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

Control interno casero alto, MEIA vs. IQMA

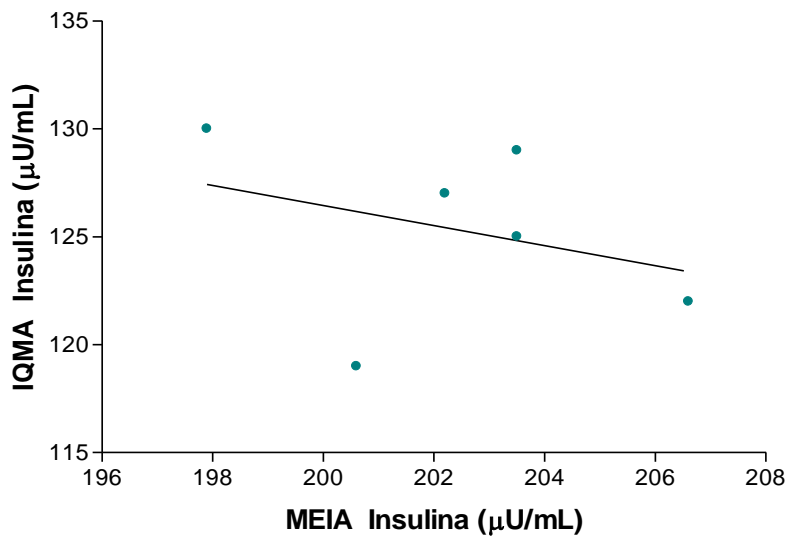


Figura 23. Correlación de los métodos de MEIA e IQMA en la determinación de insulina del control interno casero alto. $P<0.0001$; $r=-0.3248$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

Control interno casero alto, RIA vs. IQMA

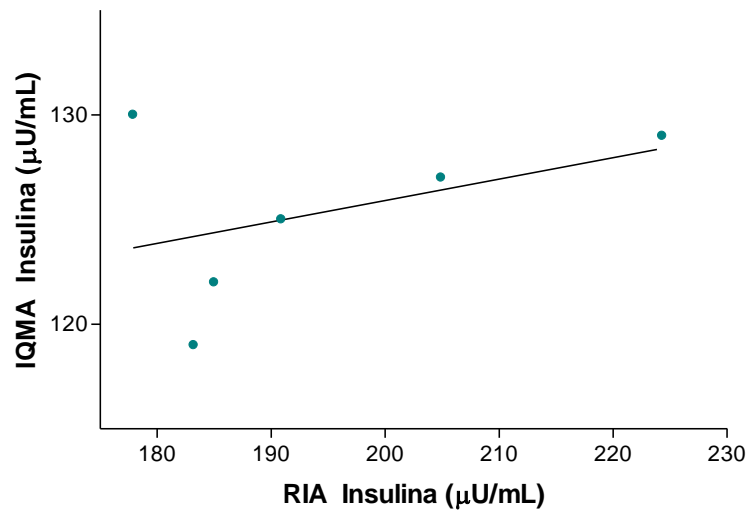


Figura 24. Correlación de los métodos de RIA e IQMA en la determinación de insulina del control interno casero alto. $P=0.0001$; $r=0.4192$; se observa una diferencia estadísticamente significativa y no existe correlación entre ambos métodos.

6.3. Muestras de suero humano

La siguiente tabla muestra los valores de insulina obtenidos por los tres métodos a comparar.

Tabla 9. Muestras de voluntarios sanos.

INSULINA ($\mu\text{U/mL}$)				INSULINA ($\mu\text{U/mL}$)			
Muestra	RIA	MEIA	IQMA	Muestra	RIA	MEIA	IQMA
1	3.9	5.2	5.1	29	25.3	25.3	26.7
2	14	19.4	16.4	30	7.8	6.9	6.7
3	13.6	13.7	11.7	31	13.9	9.2	11
4	13.8	8.4	9.4	32	19.3	19.6	22.2
5	6.8	6.6	6.2	33	9	10.7	11.7
6	4	9.3	9.9	34	8.2	11.7	13.1
7	6.6	6.2	6.8	35	4.8	4.6	5.5
8	5.7	2.7	4.4	36	4.4	3.5	3
9	5.3	6	5.9	37	7.7	6.5	6.8
10	10.9	11.7	9.4	38	8.4	9.6	10.9
11	10.7	8.9	8.7	39	10.1	9.8	8.7
12	4.9	6.9	11.8	40	13.4	10.5	15.3
13	8.7	8.8	7.7	41	12.1	14.9	16.7
14	7.1	6.9	8.3	42	6.4	5.3	7.6
15	5.5	5.6	6.3	43	12.6	9.3	10.6
16	7.4	7.4	8.1	44	10.9	7.7	7.3
17	11	7	9	45	41.7	36.7	33.6
18	10.8	8.3	10.1	46	11.8	12.9	10.7
19	13.9	14.7	10.8	47	5.7	5.2	6.7
20	2.7	3.5	3.9	48	12.7	11	8.7
21	7.4	10	9.4	49	15.1	16.7	14.7
22	8	7.1	6.7	50	8.9	11.2	11
23	15.7	16.1	14.6	51	13.2	13.5	11
24	19.7	17.8	16.3	52	3.2	3.2	4.4
25	7.4	7.5	9	53	11.2	9	8.2
26	11.6	10.5	11	54	25.4	17.7	14.6
27	7.1	5.6	5.9	55	7.2	4.1	5.5
28	10.6	10.6	10.8				

COMPARACIÓN DE MÉTODOS

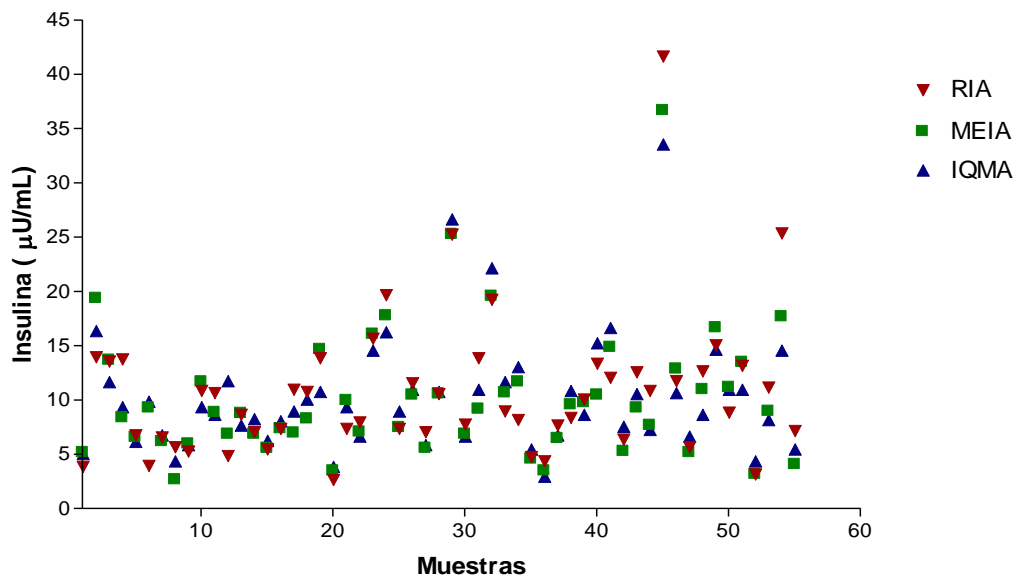


Figura 25. Comparación de métodos para la cuantificación de insulina en voluntarios sanos de la facultad de química.

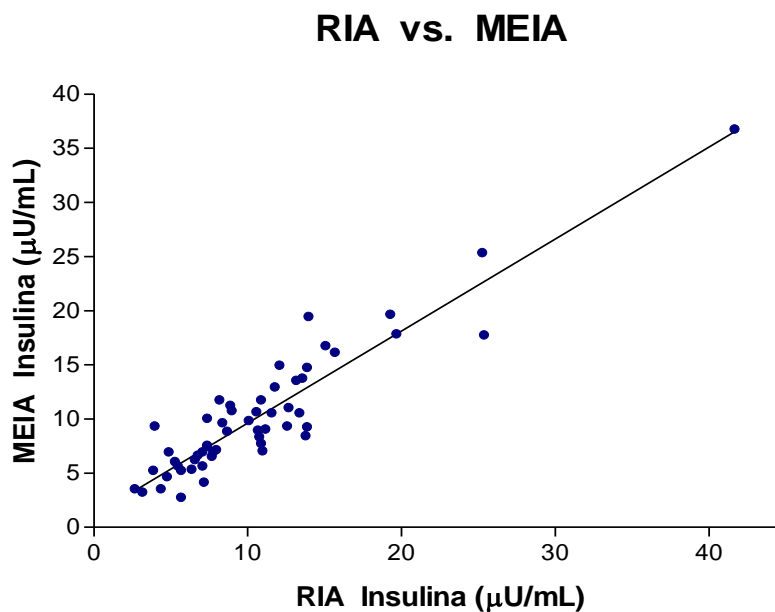


Figura 26. Diagrama de dispersión de los métodos de RIA y MEIA en la determinación de insulina de voluntarios sanos. $n=55$; $P=0.1497$; $r=0.9258$; no se observa una diferencia estadísticamente significativa y la correlación obtenida es muy aceptable entre ambos métodos.

MEIA vs. IQMA

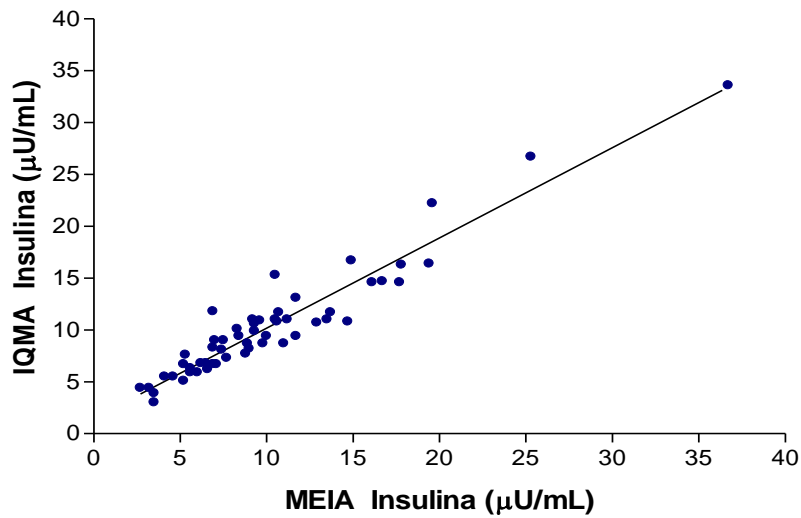


Figura 27. Diagrama de dispersión de los métodos de MEIA y IQMA en la determinación de insulina de voluntarios sanos. $n=55$; $P=0.5657$; $r=0.9527$; no se observa una diferencia estadísticamente significativa y se obtuvo una correlación muy aceptable entre ambos métodos.

RIA vs. IQMA

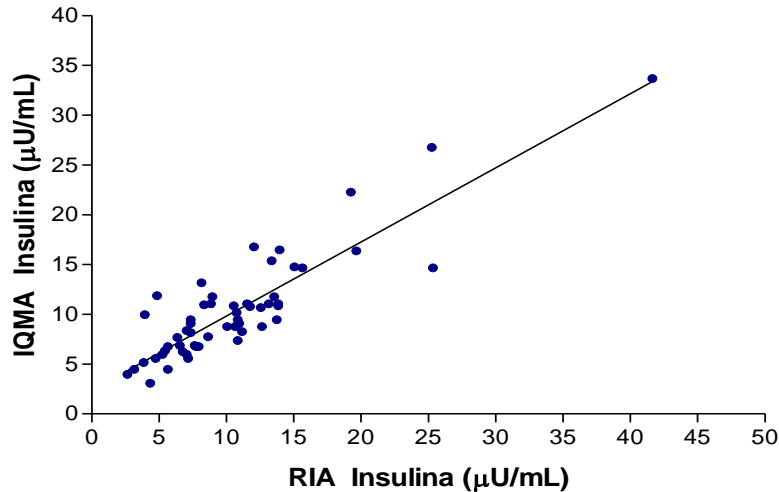


Figura 28. Diagrama de dispersión de los métodos de RIA e IQMA en la determinación de insulina de voluntarios sanos. $n=55$; $P=0.4043$; $r=0.8872$; no se observa una diferencia estadísticamente significativa y se obtuvo una correlación muy aceptable entre ambos métodos.

Para determinar si los métodos presentan concordancia o no, se empleó la prueba de Bland-Altman (31,32). Este método proporciona mayor información acerca de la dispersión de los datos y con base a los resultados de esta prueba se determinó si los métodos presentaban o no concordancia entre sí.

Se graficaron los promedios de los dos métodos a comparar vs. la diferencia numérica entre el método de referencia (en este caso el método de RIA) y el método a comparar.

Tabla 10. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de la diferencia entre el método de referencia (RIA) menos el valor de insulina obtenido por el método de MEIA.

Muestras	Promedio (RIA y MEIA)	Diferencia (RIA - MEIA)	Muestras	Promedio (RIA y MEIA)	Diferencia (RIA - MEIA)
1	4.5	1.3	29	25.3	0
2	16.7	-5.4	30	7.3	0.9
3	13.6	-0.1	31	11.5	4.7
4	11.1	5.4	32	19.4	-0.3
5	6.7	0.2	33	9.8	-1.7
6	6.6	-5.3	34	9.9	-3.5
7	6.4	0.4	35	4.7	0.2
8	4.2	3	36	3.9	0.9
9	5.6	-0.7	37	7.1	1.2
10	11.3	-0.8	38	9	-1.2
11	9.8	1.8	39	9.9	0.3
12	5.9	-2	40	11.9	2.9
13	8.7	-0.1	41	13.5	-2.8
14	7	0.2	42	5.8	1.1
15	5.5	-0.1	43	10.9	3.3
16	7.4	0	44	9.3	3.2
17	9	4	45	39.2	5
18	9.5	2.5	46	12.3	-1.1
19	14.3	-0.8	47	5.4	0.5
20	3.1	-0.8	48	11.8	1.7
21	8.7	-2.6	49	15.9	-1.6
22	7.5	0.9	50	10	-2.3
23	15.9	-0.4	51	13.3	-0.3
24	18.7	1.9	52	3.2	0
25	7.4	-0.1	53	10.1	2.2
26	11	1.1	54	21.5	7.7
27	6.3	1.5	55	5.6	3.1
28	10.6	0			

Nota: Los valores de insulina se reportan en $\mu\text{U/mL}$.

Comparación de RIA y MEIA

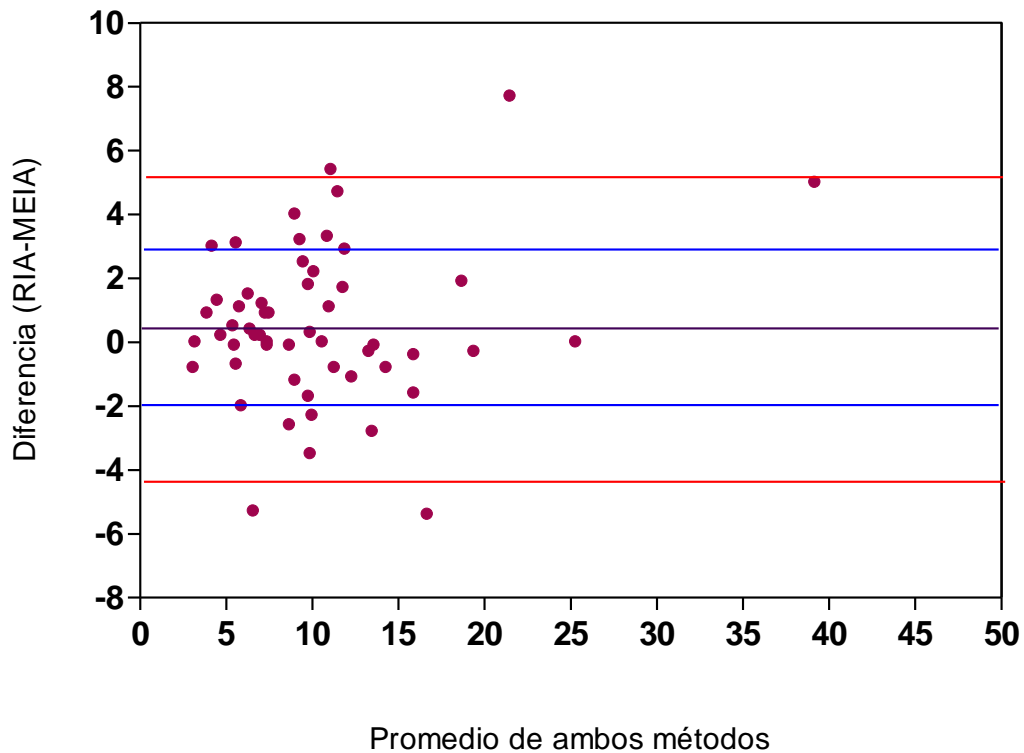


Figura 29. La siguiente figura muestra la gráfica de Bland-Altman que corresponde a los métodos de RIA y MEIA.

a. Promedio=0.53
DE=2.41
 $p+1DE= 2.94$
 $p+2DE= 5.35$
 $p-1DE= -1.88$
 $p-2DE= -4.3$

b. El 71% de las determinaciones se encuentra dentro del $p \pm 1DE$, y el 93% dentro del $p \pm 2DE$

c. El método de MEIA puede reportar hasta 4.3 $\mu\text{U}/\text{mL}$ menos ó 5.3 $\mu\text{U}/\text{mL}$ más que el valor de insulina obtenido por el método de RIA.

Tabla 11. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de la diferencia entre el valor de insulina obtenido por el método de referencia (RIA) menos el valor de insulina obtenido por el método de IQMA.

Muestras	Promedio (RIA e IQMA)	Diferencia (RIA-IQMA)	Muestras	Promedio (RIA e IQMA)	Diferencia (RIA-IQMA)
1	4.5	-1.2	29	26	-1.4
2	15.2	-2.4	30	7.2	1.1
3	12.6	1.9	31	12.4	2.9
4	11.6	4.	32	20.7	-2.9
5	6.5	0.6	33	10.3	-2.7
6	6.9	-5.9	34	10.6	-4.9
7	6.7	-0.2	35	5.1	-0.7
8	5	1.3	36	3.7	1.4
9	5.6	-0.6	37	7.2	0.9
10	10.1	1.5	38	9.6	-2.5
11	9.7	2	39	9.4	1.4
12	8.3	-6.9	40	14.3	-1.9
13	8.2	1	41	14.4	-4.6
14	7.7	-1.2	42	7	-1.2
15	5.9	-0.8	43	11.6	2
16	7.7	-0.7	44	9.1	3.6
17	10	2	45	37.6	8.1
18	10.4	0.7	46	11.2	1.1
19	12.3	3.1	47	6.2	-1
20	3.3	-1.2	48	10.7	4
21	8.4	-2	49	14.9	0.4
22	7.3	1.3	50	9.9	-2.1
23	15.1	1.1	51	12.1	2.2
24	18	3.4	52	3.8	-1.2
25	8.2	-1.6	53	9.7	3
26	11.3	0.6	54	20	10.8
27	6.5	1.2	55	6.3	1.7
28	10.7	-0.2			

Nota: Los valores de insulina se reportan en $\mu\text{U}/\text{mL}$.

Comparación de RIA e IQMA

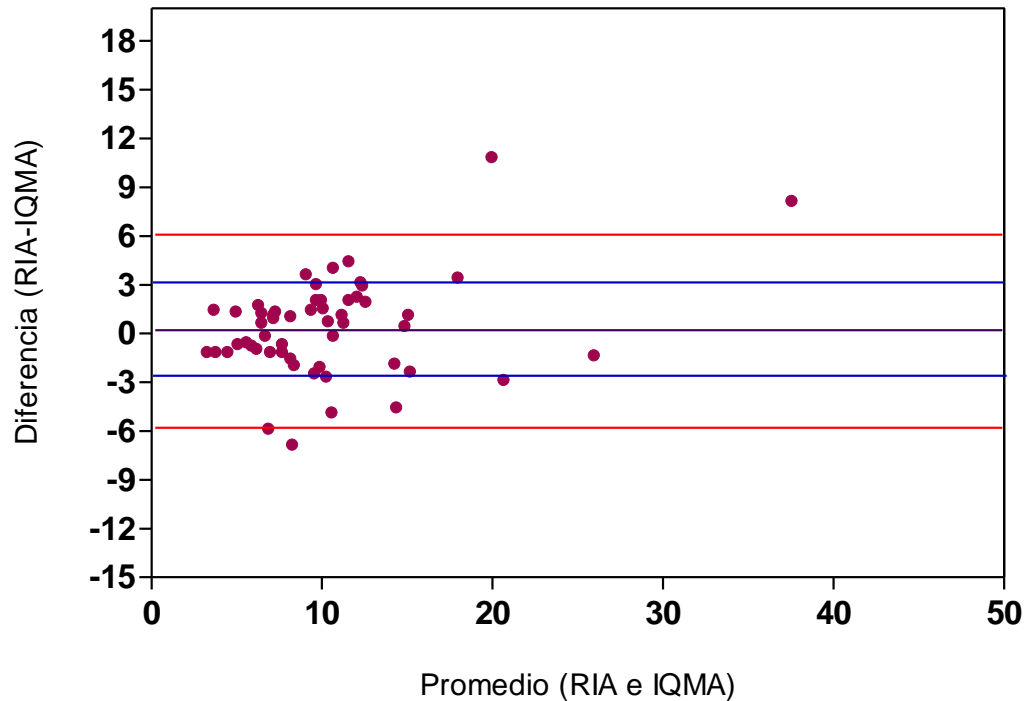


Figura 30. La siguiente figura muestra la gráfica de Bland-Altman que corresponde a los métodos de RIA e IQMA.

a. Promedio= 0.34
DE= 2.97
p+1DE 3.31
p+2DE= 6.28
p-1DE= -2.63
p-2DE=-5.60

b. El 78% de los valores están dentro del $p \pm 1DE$ y el 93% se encuentran dentro del $p \pm 2DE$.

c. El método de IQMA puede reportar hasta $5.6 \mu U/mL$ menos ó $6.2 \mu U/mL$ más que el valor de insulina obtenido por el método de RIA.

Tabla 12. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos de la diferencia entre el valor de insulina obtenido por el método de MEIA menos el valor de insulina obtenido por el método de IQMA.

Muestras	Promedio (MEIA e IQMA)	Diferencia (MEIA-IQMA)	Muestras	Promedio (MEIA e IQMA)	Diferencia (MEIA-IQMA)
1	5.1	0.1	29	26	-1.4
2	17.9	3*	30	6.8	0.2
3	12.7	2*	31	10.1	-1.8
4	8.9	-1	32	20.9	-2.6*
5	6.4	0.4	33	11.2	-1
6	9.6	-0.6	34	12.4	-1.4
7	6.5	-0.6	35	5	-0.9
8	3.5	-1.7	36	3.2	0.5
9	5.9	0.1	37	6.6	-0.3
10	10.5	2.3*	38	10.2	-1.3
11	8.8	0.2	39	9.2	1.1
12	9.3	-4.9*	40	12.9	-4.8*
13	8.2	1.1	41	15.8	-1.8
14	7.6	-1.4	42	6.4	-2.3*
15	5.9	-0.7	43	9.9	-1.3
16	7.7	-0.7	44	7.5	0.4
17	8	-2*	45	35.1	3.1*
18	9.2	-1.8	46	11.8	2.2*
19	12.7	3.9*	47	5.9	-1.5
20	3.7	-0.4	48	9.8	2.3*
21	9.7	0.6	49	15.7	2
22	6.9	0.4	50	11.1	0.2
23	15.3	1.5	51	12.2	2.5*
24	17	1.5	52	3.8	-1.2
25	8.2	-1.5	53	8.6	0.8
26	21.7	-0.5	54	16.1	3.1*
27	5.7	-0.3	55	4.8	-1.4
28	10.7	-0.2			

Nota: Los valores de insulina se reportan en $\mu\text{U/mL}$.

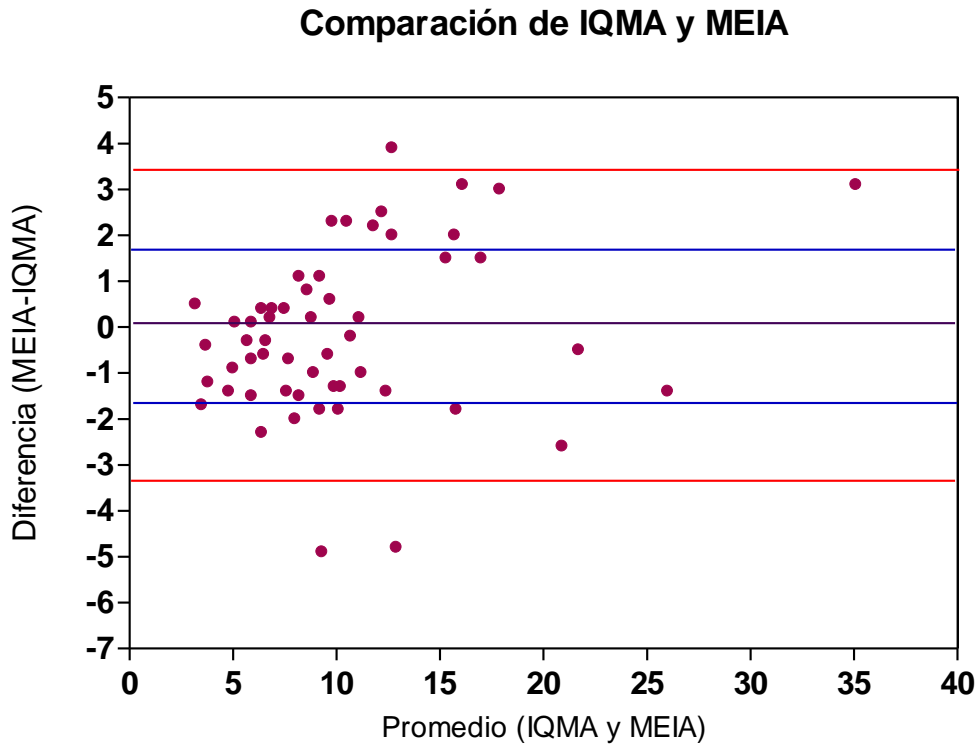


Figura 31. La siguiente figura muestra la gráfica de Bland-Altman que corresponde a los métodos de IQMA y MEIA.

a. Promedio= -0.14
 DE= 1.80
 $p+1DE= 1.66$
 $p+2DE= 3.46$
 $p-1DE= -1.94$
 $p-2DE= -3.75$

b. El 73% de los valores caen dentro del $p \pm 1DE$ y el 95% cae dentro del $p \pm 2DE$.

c. El método de IQMA puede reportar hasta $3.7 \mu\text{U/mL}$ menos ó $3.4 \mu\text{U/mL}$ más que el valor de insulina obtenido por el método de MEIA.

SENSIBILIDAD

En el caso del métodos de RIA y MEIA, la sensibilidad analítica se obtuvo del promedio de seis mediciones del Calibrador A, que tiene una concentración cero de insulina +3 DE.

Tabla 10. En la siguiente tabla se reportan los resultados obtenidos para evaluar la sensibilidad del RIA.

SENSIBILIDAD (RIA)	
Repetición	Insulina ($\mu\text{U/mL}$)
1	0.605
2	1.339
3	1.188
4	0.448
5	-1.199
6	-0.057
Promedio	0.387
DE	0.847

Sensibilidad experimental del método de RIA: 2.9 $\mu\text{U/mL}$ de insulina.

Sensibilidad reportada en el inserto: 1.2 $\mu\text{U/mL}$ de insulina.

Tabla 11. En la siguiente tabla se reportan los resultados obtenidos para evaluar la sensibilidad del método de MEIA

SENSIBILIDAD (MEIA)	
No. de ensayo	Insulina ($\mu\text{U/mL}$)
1	0.5
2	0.2
3	0.2
4	0.2
5	0.3
6	0.3
Promedio	0.28
DE	0.106

Sensibilidad experimental del método de MEIA: 0.58 $\mu\text{U/mL}$ de insulina.

Sensibilidad reportada en el inserto: 1.0 $\mu\text{U/mL}$ de insulina.

La sensibilidad del método de IQMA no pudo determinarse, ya que el equipo sólo realiza un ajuste con ajustadores alto y bajo, por lo que no se cuenta con un estándar de concentración cero para realizar la curva de calibración.

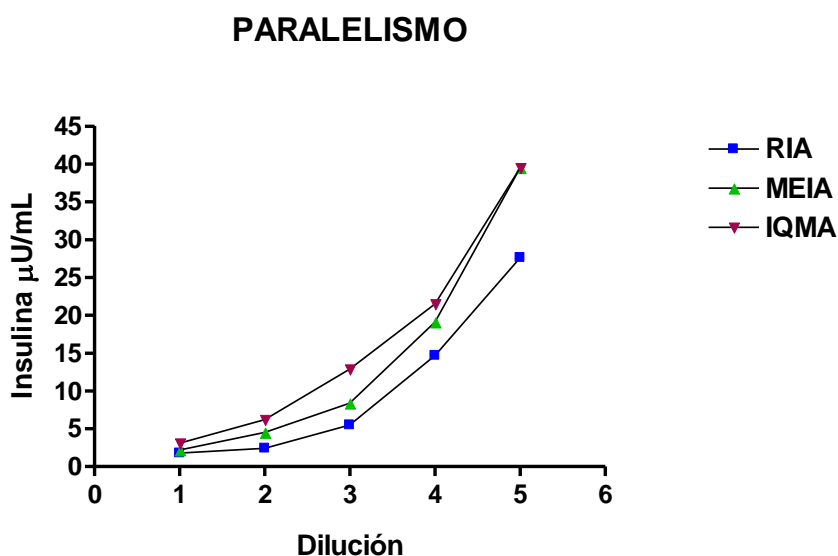
6.5 PARALELISMO

Para evaluar el paralelismo entre los métodos se realizaron diluciones seriadas de una muestra con una concentración determinada de insulina cuantificándose la concentración de ésta en cada dilución.

Tabla 11. Resultados obtenidos para evaluar el paralelismo entre los métodos de RIA e IQMA.

Insulina ($\mu\text{U/mL}$)			
Dilución	Método		
	RIA	MEIA	IQMA
Directa	27.6	39.5	39.5
1:2	14.7	19.1	24.5
1:4	5.5	8.4	12.9
1:8	2.4	4.5	6.2
1:16	1.8	2.2	3.1
Valor de r	0.8573	0.8515	0.9104

Figura 29. La siguiente gráfica muestra el paralelismo entre los métodos de RIA e IQMA en la determinación de insulina. El método de RIA tiene un coeficiente de correlación de 0.8573, el método de MEIA tiene un $r=0.8515$ y el método de IQMA tiene un $r=0.9104$.



7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Controles comerciales internos

Un parámetro a determinar para cada método fue la precisión intra e interensayo. Para evaluarla se determinó el CV (%), que no debe ser mayor a 15% para ensayos de cuantificación de hormonas. Los coeficientes de variación obtenidos fueron menores a 15%, por lo que la precisión de los métodos se considera aceptable.

El método de RIA presentó un CV (%) muy elevado en los controles DPC-4 (control bajo) y DPC-5 (control alto), comparándolo los métodos de MEIA e IQMA. Esto puede deberse a que la técnica de RIA se realizó en forma manual, por lo que los errores del analista pudieron influir en el aumento del CV (%), errores que en los equipos automatizado disminuyen o se eliminan.

En el caso del control comercial DPC-5, como se puede observar en la tabla 4, el promedio de los valores de insulina obtenidos por el método de IQMA (15.3 $\mu\text{U}/\text{mL}$) presenta una diferencia significativa con respecto al promedio obtenido por los otros dos métodos, 33.1 $\mu\text{U}/\text{mL}$ por el método de RIA y 37.41 $\mu\text{U}/\text{mL}$ por la técnica de MEIA (IMx). Lo mismo ocurrió con el control comercial DPC-6, en donde el promedio obtenido de la técnica de IQMA fue de 44.4 $\mu\text{U}/\text{mL}$ de insulina, mientras que el valor promedio para RIA y MEIA fue de 91.1 $\mu\text{U}/\text{mL}$ y 118 $\mu\text{U}/\text{mL}$, respectivamente. La diferencia entre estos resultados podría deberse a que los controles comerciales que se emplearon en este trabajo, (DPC-4, DPC-5 y DPC-6) están indicados para llevar a cabo el control de calidad interno del método de RIA, exclusivamente.

En el caso del RIA se menciona que el control está compuesto por una concentración de insulina más otros 25 analitos que pueden determinarse en una matriz de suero humano; en el

caso del equipo IMx (que emplea el MEIA), el control está compuesto por insulina humana derivada de porcino en una solución amortiguadora y el Immulite 2000 (método de IQMA) emplea un control constituido por insulina liofilizada en una matriz sérica no humana.

La variación en cuanto a la composición de la matriz y la naturaleza de la insulina de los controles puede explicar la discrepancia en los resultados obtenidos, infiriendo así que no podemos esperar resultados similares en los métodos evaluados, ya que los controles son específicos para cada equipo, aunque los tres métodos se empleen para la determinación del mismo analito.

En el caso de los métodos de MEIA e IQMA, que se evaluaron en los equipos IMx e Immulite 2000 respectivamente, cada estuche de reactivos incluye los controles específicos para cada sistema y en el inserto se recomienda procesarlos como muestras desconocidas en cada corrida que se realiza. La concentración de los controles debe estar dentro del rango que marca el inserto como condición para validar la corrida. Como se recomienda en el inserto, en todas las corridas se procesaron los controles específicos para cada equipo y en todos los casos la concentración de insulina estaba dentro del rango determinado por el fabricante, cumpliendo con el control de calidad interno y validando así las corridas.

Como se observa en las figuras 2-4, 6-8 y 10-12, los coeficientes de correlación y los valores de P obtenidos indican que los métodos de RIA, MEIA e IQMA no presentan correlación entre sí.

Controles internos caseros

La preparación de los controles internos se llevo a cabo preparando las diluciones pertinentes de la Insulina Humulin para obtener las concentraciones que se habían fijado para cada control. Sin embargo, las determinaciones experimentales no coincidían con las que se

habían calculado teóricamente. La concentración de insulina de las diluciones rebasaba la linealidad del método, es decir, tenían una concentración mayor de 350 $\mu\text{U}/\text{mL}$. Entonces tuvieron que realizarse diluciones hasta obtener las concentraciones que se habían acordado para cada control.

A pesar de que la insulina empleada para la preparación de los controles internos es estructuralmente idéntica a la humana, la solución en la que está contenida tiene otros aditivos, tales como conservadores, ajustadores de pH (NaOH o HCl) y glicerina, así como iones de zinc para evitar que la hormona forme agregados. Cabe mencionar que la presencia de estos compuestos más el suero humano pudo afectar la estabilidad de la molécula de insulina o pudo presentarse también un efecto matriz para la reacción antígeno-anticuerpo, dificultando así la preparación y estabilidad de los controles internos caseros, (error metodológico).

Los controles caseros e internos presentan un CV aceptable (menor al 15%). El método de RIA fue el que presentó CV más altos, como ya se mencionó anteriormente, por ser un método manual, la habilidad y experiencia del técnico que realiza la prueba es una variable que influye en la precisión y reproducibilidad del método. Este factor disminuye notablemente cuando se emplean equipos totalmente automatizados, como el Immulite 2000 y el IMx, lo que representa una ventaja sobre el método de RIA.

Como se puede observar en las gráficas 17 y 21, el método de IQMA reporta valores significativamente más bajos para los controles caseros internos medio y alto. En este caso tanto la matriz como la naturaleza de la insulina fueron las mismas, por lo que el método de IQMA no reconoce a la insulina de la misma manera que los métodos de RIA y MEIA.

Los coeficientes de correlación y los valores de P obtenidos de las figuras 14-16, 18-20 y 22-24, indican que en el caso de los controles caseros internos, los métodos de RIA, MEIA e IQMA no presentan correlación entre sí.

Sensibilidad

En el caso del método de RIA, la sensibilidad experimental es significativamente menor a la que indica el inserto y con respecto a la técnica de MEIA, la sensibilidad experimental fue mayor a la reportada en el inserto. Como ya se menciono la sensibilidad del método se calculó promediando 6 determinaciones del estándar cero +3DE, mientras que la que reporta el inserto es calculada a partir de 30 determinaciones del estándar cero +3DE. La variación obtenida de la sensibilidad experimental y la indicada en el inserto pudo deberse a la diferencia en el número de determinaciones y también a que las condiciones en las que se lleva a cabo el ensayo pueden ser más estrictas o controladas en la casa comercial.

Muestras

El tratamiento de la muestra antes de realizarse las determinaciones fue el mismo, por lo que la fase preanalítica fue un parámetro que no influyó en el resultado de la cuantificación de insulina. Sin embargo, cuando un paciente solicita la determinación de insulina en más de un laboratorio, las diferencias en el tratamiento preanalítico que cada laboratorio le dé a la muestra puede ser un factor que influya en la diferencia de los resultados, aún cuando los laboratorios empleen el mismo equipo.

Con respecto a los coeficientes de correlación y los valores de P obtenidos de las gráficas 26-28, presentan una correlación aceptable y no hay diferencias significativas; siendo los métodos de MEIA e IQMA los que presentan mayor similitud.

Para determinar si los métodos presentan concordancia entre sí, se empleó la prueba de Bland-Altman, ya que presenta de manera más clara la distribución de los resultados. De acuerdo a las gráficas que se obtuvieron, los métodos de RIA, MEIA e IQMA no presentan concordancia entre sí, es decir, no reconocen a la insulina de la misma manera.

El que los métodos no sean comparables y que los resultados no sean reproducibles puede deberse a que el método de MEIA emplea un estándar diferente al que se utiliza en las técnicas de RIA e IQMA, no hay una técnica de referencia para la cuantificación de insulina y por último, la especificidad de los anticuerpos monoclonales o policlonales que emplea cada método es diferente.

Actualmente no se cuenta con un método de referencia para realizar la determinación de insulina. En 1996 la Asociación Americana de Diabetes comparó los valores de insulina entre más de 40 laboratorios que empleaban diferentes métodos y equipos con el objetivo de evaluar y en su caso, sugerir las correcciones para mejorar la reproducibilidad de la determinación de esta hormona. Después de la evaluación de los resultados, se encontró que había discrepancias entre éstos, estas diferencias disminuían un poco cuando se empleaba el mismo estándar (actualmente no se cuenta con un estándar de referencia para la determinación de insulina); por otro lado, las diferencias de los resultados cuando los laboratorios empleaban el mismo estuche no disminuyó (33).

El hecho de que hasta la fecha no se cuente con un estándar de referencia de insulina es un factor que influye para que no haya correlación en los resultados que reportaron los diferentes laboratorios, por lo que se sugiere generalizar el empleo de un único estándar. Otros factores que pueden intervenir en la discrepancia de los resultados son las reacciones cruzadas, el empleo de anticuerpos poli o monoclonales y la no linealidad de los diferentes métodos que emplean los laboratorios. Se sugiere entonces que el primer paso para la

estandarización del método para la cuantificación de insulina es que cada laboratorio determine la linealidad, especificidad, precisión y estabilidad de la técnica que empleen; si no cumplen con los rangos establecidos realizar las acciones correctivas y una vez que estén dentro de éstos, vigilar continuamente su cumplimiento (C.C.I.). El segundo paso es que los laboratorios clínicos comparen los resultados cuando se procesan las mismas muestras; es decir, que el laboratorio realice un control de calidad externo (33).

Los tres métodos evaluados cumplen con el control de calidad interno, ya que presentan una precisión aceptable y en todos los casos se validaron las corridas con los controles que incluye el estuche, ya que la determinación de insulina es un parámetro importante para el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de patologías importantes como DM e insulinoresistencia, y si los resultados no son reproducibles actualmente, se sugiere entonces que el paciente se realice el estudio en el mismo laboratorio para tener un seguimiento más certero.

Si la evaluación de cada método es aceptable, entonces el empleo de uno u otro método dependerá de los recursos económicos y humanos con que cuente el laboratorio, del número de muestras que se procesen diariamente y de las ventajas y desventajas que ofrezca cada uno de ellos, determinando así el costo-beneficio de cada método para poder elegir el adecuado.

En este caso se evaluaron dos equipos totalmente automatizados, el Immulite 2000 (para evaluar la técnica de IQMA) y el IMx (para el método de MEIA) así como una técnica de RIA manual. Los equipos Immulite 2000 y IMx tienen todas las ventajas de los sistemas totalmente automatizados, tales como: ahorro de tiempo, cantidad mínima de muestra, se eliminan los errores clericales (el equipo cuenta con lector de código de barras), almacenamiento de datos

y en el caso del Immulite 2000, el equipo cuenta con un programa de control de calidad interno.

Por otro lado, la técnica manual del RIA ofrece la ventaja de que pueden emplearse estuches de diferentes casas comerciales, por lo que no existe tanta dependencia del laboratorio con el proveedor. La desventaja que representa el realizar una técnica manual es que la precisión de la misma va a depender mucho de la destreza y experiencia del técnico que la realice y el empleo de sustancias radiactivas que emplea la técnica del RIA también es una desventaja, ya que el personal que la realiza requiere entrenamiento especial para el empleo adecuado del reactivo y el confinamiento final de los residuos que se generen, que también representan un costo extra al laboratorio.

La determinación de insulina en suero humano es de gran utilidad para evaluar la secreción de insulina e insulinoresistencia. Actualmente, la no estandarización de los métodos para su determinación impiden o dificultan la obtención de resultados consistentes para poder establecer tratamientos más eficaces. La discordancia entre los resultados de estuches o métodos empleados comercialmente para la determinación de insulina requiere de un esfuerzo continuo para lograr la estandarización (34).

Como en cualquier determinación analítica, el método que se elija para la cuantificación de insulina debe ser confiable para aumentar el valor diagnóstico de esta en el tratamiento y prevención de la DM y de otras patologías. La insulina es una hormona que se libera de manera pulsátil y por estímulos externos (principalmente la ingesta de carbohidratos), por lo que su liberación va a estar relacionada con los niveles de glucosa sanguíneos. Se sugiere entonces realizar junto con la determinación de insulina una curva de tolerancia a la glucosa para que el personal médico pueda observar alteraciones en la relación glucosa-insulina, con la posibilidad de detectar patologías como DM e insulinoresistencia.

Por otro lado, la evolución de los inmunoensayos se enfoca principalmente a buscar marcadores que mejoren la sensibilidad del mismo; por ejemplo, el empleo del ADN como marcador de anticuerpos en inmunoensayos no competitivos, en los que la señal a medir puede ser amplificada a través de la PCR, aumentando la sensibilidad y detectando concentraciones en suero de attamoles (1×10^{-18}). Otro enfoque en cuanto la evolución de los inmunoensayos son los análisis múltiples, que permiten la medición o cuantificación simultánea de varios analitos en un mismo inmunoensayo tipo “sándwich”; en donde el primer anticuerpo se encuentra adherido a microesferas de un solo color, y el segundo anticuerpo se encuentra marcado con un marcador fluorescente. La incubación de la muestra con diferentes poblaciones de microesferas, permite entonces la cuantificación de diferentes analitos, empleando un citómetro de flujo para su cuantificación (35).

8. CONCLUSIONES

La evaluación de cada método (RIA, FIA y QIA) indica precisión y un Control de Calidad Interno aceptable.

Los métodos de Radioinmunoanálisis, Inmunofluorescencia y Quimioluminiscencia empleados para la determinación de insulina en suero humano no presentan buena concordancia entre sí.

El hecho de que hasta la fecha no se cuente con un estándar de referencia de insulina es un factor que influye para que no haya correlación en los resultados que reportaron los diferentes laboratorios, por lo que se sugiere generalizar el empleo de un único estándar.

Se sugiere entonces que el primer paso para la estandarización del método para la cuantificación de insulina es que cada laboratorio determine la linealidad, especificidad, precisión y estabilidad de la técnica que empleen; si no cumplen con los rangos establecidos realizar las acciones correctivas y una vez que estén dentro de éstos, vigilar continuamente su cumplimiento (C.C.I.). El segundo paso es que los laboratorios clínicos comparen los resultados cuando se procesan las mismas muestras; es decir, que el laboratorio participe en un programa de control de calidad externo.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. **Ganong F. William**; Fisiología médica; Ed. Manual Moderno; México D. F., 2004.
2. **Francis S. Greenspan, Gordon J. Strewler**; Endocrinología básica y clínica; Ed. Manual Moderno; México D.F; 1998.
3. **P. M. Clark**; Assays for insulin, proinsulin (s) and C-péptide; Ann Clin Biochemistry; 36: 541-564; 1999.
4. **Alexis Labhart**; Endocrinología clínica: Teoría y práctica; Salvat Editores; Barcelona, España; 1990.
5. **Niels Parksen, Malene Holligndal, Claus Juhl, Peter Butler, Johannes D. Veldhuis and Ole Schmitz**; Pulsatile insulin secretion: Detection, regulation, and role in diabetes; Diabetes; 51(S1):245-254; 2002.
6. **N. Purksen**; The in vivo regulation of pulsatile insulin secretion; Diabetologia; 45:3-20; 2002.
7. **Robert T. Watson and Jeffrey E. Pessin**; Intracellular organization of insulin signaling and Glut-4 translocation; Trends Biochem Sci; 31(4):215-222; 2006.
8. **Magdalena Pérez, Teresa Torlinska**; Insulin receptor, structural and functional characteristics; Med Sci Monit; 7(1):169-177; 2001.
9. **Cecil C. Yip, Peter Ottensmeyer**; Three-dimensional structural interactions of insulin and its receptor; Journal Biological Chem; 278 (30): 27329-27332; 2003.
10. **Yoshiaki Kido, Jun Nakae, Domenico Accili**; The insulin receptor and its cellular targets; The journal of clinical endocrinology and metabolism; 86 (3):972-979; 2001.
11. **Giorgio Sesti, Massimo Federici, Marta L. Hribal**; Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders; The FASEB journal; 15:2099-2111; 2001.
12. **Paul Bevan**; Insulin signaling; Journal of cell science; 114:1429-1430; 2001.
13. **Leninhger N. David**; Principios de Bioquímica; Ed. Omega; 4ta. Edición; Barcelona, España; 2000.
14. **Ma. Elena Valera Mora, Antonio Scarfone, Menotti Calvani, Aldo V. Greco, Gertrude Mingrome**; Insulin clearance obesity; Journal of american collage of nutrition; 22 (6): 487-493; 2003.
15. **William C. Duckworth, Robert G. Bennet and Frederick G. Hamel**; Insulin degradation: Progress and potencial; Endocrine Reviews; 19(5):608-624; 2002.

16. **S. Schinner, W. A. Scherbaum, S. R. Bornstein, A. Barthel**; Molecular mechanisms of insulin resistance; 22:674-682, 2005.
17. **González Buitrago José Manuel, Rodríguez Sánchez Alicia**; Fundamentos de inmunoanálisis; DPC Dipesa S.A.; Madrid España; 2000.
18. **D. Chevenne F. Trivin, D. Porquet**; Insulin assays and reference values; Diabetes and Metabolism; 25:459-476; 1999.
19. **Lennart Andersen, Peer Nobert Jorgensen, Fritz Poulsen**; Enzyme immunoassay for intact human insulin in serum or plasma; Clinical Chemistry; 39:578-582; 1993.
20. **E. Toloven, I. Hemmilä, J. Marniemi**; Two-site time resolved immunofluorometric assay of human insulin; Clinical Chemistry; 32:637-640; 1986.
21. **Rodríguez Portales José A.**; Endocrinología Clínica; Ed. Mediterráneo; Santiago, Chile; 2000.
22. **Salve, Prieto, Amich**; Laboratorio de Bioquímica; Ed. Interamericana; Madrid, España; 1994.
23. **Anderson-Cockayne**; Química Clínica; Ed. Interamericana McGraw-Hill; México, 1993.
24. **Blázquez Enrique y Tamarit Jorge**; Los islotes de Langerhans: Un órgano multiendocrino; Ed. Fundación Ramón Areces; Madrid, España; 1990.
25. **Jara A. Albarrán**; Endocrinología; Ed. Panamericana; Madrid, España; 2001.
26. **Adam B. Keeton, Maggie O. Amsler, Derwei Y.**; Insulin signal transduction pathways and insulin-induced gene expression; J. Bio. Chem; 277:48565-48573; 2003.
27. **Rafael Neshar, Erol Cerasi**; Modeling biphasic insulin release; Diabetes; 51:S53-S59; 2002.
28. **Niederhau C. M., Reinaver H.**; The Abbot IMx automated benchtop immunochemistry analyzer system. Clinical Chemistry; 34:1726-1732; 1988.
29. **Wheecks I, Woodhead J.**; Chemiluminiscent assay of alkaline phosphatasa applaid in a ultrasensitive enzyme immunoassay of thiotropina; Clinical Chemistry; 35:1441-1446; 1989.
30. **García Campaña A. M, Baeyens W. R. G., Zhang X.**; Unifamiliar though exciting analytical detection in flowing streams: chemiluminescence; Ars pharmaceutica; 42(1): 807-812; 2001.
31. **Per Hyltofl Petersen, Dietmar Stöckl, Ole Blaabjerg, Brent Petersen**; Graphical interpretation of analytical data from comparison of a field method with a reference method by use of difference plots; Clinical Chemistry 43(11):2039-2046, 1997.

32. **Bland J. Martin, Altman G. Douglas**; Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement; *The Lancet*; 8:307-310; 1986.
33. **David C., Robbins et col.**; Report of the American Diabetes Association's task force on standardization of the insulin assay; *Diabetes*; 45:242-256; 1996.
34. **Santica Marcovina, Ronald R. Bowsher, W. Greg Miller, Myrlen Staten, Gary Myers**; Standardization of insulin immunoassays: Report of the American Diabetes Association workgroup; *Clinical Chemistry* 53(4):1-6; 2007.
35. **Alan H.B. Wu**; A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry; *Clinica Chimica Acta*; 369:119-124; 2006.