

06.73.09

C.N.E.A. Biblioteca	
ARCHIVO PUBLICACIONES	
Nº 1	AÑO 1973

EN-35/107

REPUBLICA ARGENTINA
COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA
DEPENDIENTE DE LA PRESIDENCIA DE LA NACION
GERENCIA DE ENERGIA

FUNDAMENTOS TEORICOS DEL RADIOINMUNOENSAYO

S. J. CEMBAL * - R. E. VALLES *

* Departamento de Radioisótopos

BUENOS AIRES - MAYO 1973

REPUBLICA ARGENTINA
COMISION NACIONAL DE ENERGIA ATOMICA
DEPENDIENTE DE LA PRESIDENCIA DE LA NACION
GERENCIA DE ENERGIA

FUNDAMENTOS TEORICOS DEL RADIOINMUNOENSAYO

S. J. CEMBAL * - R. E. VALLÉS *

* Departamento de Radioisótopos

BUENOS AIRES - MAYO 1973

CONTENIDO

SECCION		PAGINA
1.0.0	Introducción	1
2.0.0	Generalidades.	1
3.0.0	Estudio matemático del modelo básico	2
3.1.0	Análisis de la ecuación general de Ekins	6
4.0.0	Curvas de dosis-respuesta	7
5.0.0	Influencia de los parámetros p^* , K y q en la forma de las curvas de dosis respuesta.	8
6.0.0	Aspectos estadísticos del radioinmunoensayo	10
6.1.0	Cálculo de la varianza dentro del ensayo y entre ensayos	11
6.2.0	Aplicación de la varianza dentro del ensayo.	12
6.3.0	Cálculo de la varianza entre ensayos.	12
6.4.0	Cálculo de la varianza local entre ensayos	13
6.5.0	Aplicación de la varianza entre ensayos	13
7.0.0	Control de calidad del radioinmunoensayo	14
8.0.0	Metodología.	16

1.0.0 INTRODUCCION

La utilización cada vez más frecuente del análisis de saturación para el dosaje de moléculas, ya sea en investigación básica como así también en aplicaciones clínicas, muestran claramente la necesidad de mantener al día la información del fundamento teórico de estos métodos.

Aunque la mayoría de los métodos se refieren al radioinmunoensayo y a ensayos de competición proteica, este tipo de análisis presenta múltiples posibilidades para cualquier molécula que se quiera dosar en cualquier medio, siempre que se encuentre un reactivo específico de ésta y que se pueda marcar la molécula con un isótopo radiactivo.

Las consideraciones teóricas que se hacen en esta recopilación sirven para todos los sistemas de competición establecido entre, moléculas a dosar (reactante), molécula a dosar marcada con un isótopo radiactivo y un reactivo específico.

Si bien se pueden conseguir adelantos importantes en la modificación de técnicas de determinación de moléculas (hormonas proteicas esteroides, etc.) se necesita el conocimiento fisicoquímico de las reacciones para poder controlar los diversos parámetros que modifican la sensibilidad y reproducibilidad del sistema.

Los autores han querido con esta recopilación poner al día los conocimientos acerca de éstos parámetros describiendo en la primera parte el modelo básico y su estudio fisicoquímico, en la segunda la influencia de los parámetros involucrados en el sistema y en la tercera parte el estudio estadístico y su aplicación como método de control de calidad del radioinmunoensayo.

2.0.0 GENERALIDADES

En los últimos años se ha desarrollado una nueva técnica in vitro de valoración de hormonas en líquidos biológicos, basada en lo que se denomina genéricamente análisis de saturación, término introducido por Ekins. [6]

Se entiende por análisis de saturación al ensayo en el cual el compuesto que se desea determinar satura progresivamente a un reactivo específico.

El sistema está formado entonces por:

- A - El compuesto a determinar que denominaremos p.
- B - La misma especie química que el compuesto a determinar, marcado con un isótopo radiactivo al que denominaremos p*.
- C - Un reactivo específico para el compuesto a determinar que llamaremos q.

Si el reactivo específico es un anticuerpo el ensayo recibe el nombre de RADIO-INMUNOENSAYO (RIE); mientras que si es una proteína transportadora específica del compuesto a determinar, se denomina ENSAYO POR COMPETICION PROTEICA.

Esquemáticamente el sistema funciona de la siguiente manera:

El compuesto a determinar p , se mezcla con el trazador p^* , que frente al reactivo específico q formará dos fracciones, la fracción unida y la fracción libre.

La fracción unida comprende al compuesto a determinar unido al anticuerpo que simbolizaremos con PQ y el compuesto marcado unido al anticuerpo P^*Q .

La fracción libre comprende la fracción del compuesto a determinar p y del compuesto marcado p^* que no se han unido al anticuerpo (ver gráfico de la figura 1).

Se separan las dos fracciones y se mide la radiactividad presente en cada una de ellas.

La combinación de la medida de la actividad de ambas fracciones permite obtener distintos índices de respuesta.

Así, por ejemplo, se puede tomar como respuesta del sistema al cociente entre la actividad en la fracción unida y la actividad de la fracción libre o su inversa.

Se observa que al variar gradualmente la cantidad de p , manteniendo constante p^* y q , se produce un progresivo aumento de la formación de PQ , quedando por consiguiente mayor cantidad de P^* libre. Esto se traduce en un cambio en el índice de respuesta del sistema.

La concentración de un compuesto en un líquido biológico puede determinarse conociendo la respuesta del sistema, por interpolación en un gráfico que relacione los índices de respuesta con dosis conocidas de ese compuesto.

3.0.0 ESTUDIO MATEMATICO DEL MODELO BASICO

A fin de conocer el comportamiento fisicoquímico del sistema propuesto, es necesario definir un modelo básico.

Este modelo permite hacer el desarrollo matemático de la ley general que rige a los análisis por saturación.

El conocimiento de esta ley hará posible predecir y analizar curvas de dosis-respuesta obtenidos con este sistema.

Para el modelo básico se postula que:

- 1.- El antígeno (o ligando) está presente en el ensayo en forma homogénea y constituido por una sola especie química p.
- 2.- El anticuerpo (o proteína ligante) está presente en una sola forma química homogénea.
- 3.- Ambos, el antígeno y el anticuerpo, son univalentes; esto significa que un antígeno puede reaccionar con una sola molécula del anticuerpo, pero no pueden ocurrir otras combinaciones.
- 4.- No hay efectos alostéricos ni cooperativos; la reacción antígeno-anticuerpo es una reacción de segundo orden según la cinética fisicoquímica.
- 5.- El antígeno frío p, y el antígeno marcado p* tienen las mismas propiedades fisicoquímicas y estéricas, por lo tanto la constante de equilibrio para la reacción con el antígeno frío es la misma que para el antígeno marcado.
- 6.- El antígeno y el anticuerpo reaccionan hasta alcanzar el equilibrio.
- 7.- La forma libre puede ser separada cuantitativamente de la forma unida, sin perturbar el equilibrio.
- 8.- La relación entre antígeno unido a libre o la relación antígeno unido a total puede ser medida perfectamente.

Se puede escribir entonces que:



Siendo:

- P = antígeno frío
 P* = antígeno marcado
 Q = Anticuerpo
 PQ = antígeno frío unido al anticuerpo
 P*Q = antígeno marcado unido al anticuerpo.

De (1) y (2)

$$K_1 = \frac{|PQ|}{|P| \cdot |Q|}$$

$$K_2 = \frac{|P^*Q|}{|P^*| \cdot |Q|}$$

a) Por el 5.- postulado $K_1 = K_2 = K$

b) Llamaremos $R = \text{unido B} / \text{libre F}$, a la relación P^*Q / P^*

c) $p = |P| + |PQ|$ donde p = concentración molar total de antígeno frío.

d) $p^* = |P^*| + |P^*Q|$ donde p^* = concentración molar total de antígeno marcado.

e) $q = |Q| + |PQ| + |P^*Q|$ donde q = concentración molar total de anticuerpo.

De (1):

$$\frac{|PQ|}{|Q|} = K \cdot |P|$$

De (2):

$$\frac{|P^*Q|}{|Q|} = K \cdot |P^*|$$

Sumando miembro a miembro:

$$\frac{|PQ|}{|Q|} + \frac{|P^*Q|}{|Q|} = K (|P| + |P^*|) \quad (3)$$

De (e):

$$q - |Q| = |PQ| + |P^*Q|$$

Luego reemplazando en (3):

$$\frac{q - |Q|}{|Q|} = K (|P| + |P^*|) \quad (4)$$

$$\frac{q}{|Q|} - 1 = K (|P| + |P^*|) \quad (4')$$

Si se multiplica y divide por K el primer miembro:

$$\frac{Kq}{K|Q|} - 1 = K (|P| + |P^*|) \quad (5)$$

Como:

$$K \cdot |Q| = \frac{|P^*| \cdot |Q|}{|P^*|} = \frac{B}{F} = R$$

$$\frac{K \cdot q}{R} - 1 = K (|P| + |P^*|) \quad (6)$$

Pasando todo al segundo miembro:

$$0 = K (|P| + |P^*|) - \frac{K \cdot q}{R} + 1 \quad (7)$$

De c) y d) se deduce que:

$$|P^*| = p^* - |P^*Q|$$

$$|P| = p - |PQ|$$

Reemplazando en la ecuación anterior:

$$0 = K (p - |PQ| + p^* - |P^*Q|) - \frac{K \cdot q}{R} + 1 \quad (8)$$

Por e):

$$-|PQ| - |P^*Q| = |Q| - q$$

$$0 = K (p + p^* + |Q| - q) - \frac{K \cdot q}{R} + 1$$

$$0 = K p + K p^* + K |Q| - K q - \frac{K \cdot q}{R} + 1 \quad (9)$$

Como:

$$K \cdot |Q| = R$$

$$0 = K p + K p^* + R - K q - \frac{K \cdot q}{R} + 1$$

Multiplicando miembro a miembro por R:

$$0 = K p R + K p^* R + R^2 - R K q - K q + R$$

Sacando factor común y ordenando los términos en orden decreciente:

$$0 = R^2 + R (1 + K p + K p^* - K q) - K q \quad (10)$$

La ecuación (10) es la ecuación general para el modelo básico presentado por Ekins. [6]

3.1.0 ANALISIS DE LA ECUACION GENERAL DE EKINS

Esta ecuación relaciona la respuesta variable R con la constante de equilibrio K de la reacción, la cantidad de trazador p^* , la capacidad total del reactivo específico q y la cantidad de sustancia a determinar p presente en la muestra.

K : se expresa en l/mol

p^* : se expresa en mol/l

q : se expresa en número de moles de p y p^* que puede fijar el anticuerpo por litro.

Si se conocen K, p^* y q se puede predecir el valor de R para un determinado valor de p.

Se puede llegar a otra expresión matemática útil para el radioinmunoensayo que relaciona la respuesta variable R con la cantidad de sustancia B unida al anticuerpo q.

De la ecuación (2):

$$\frac{|P^*Q|}{|P^*|} = K|Q|$$

Como:

$$R = \frac{|P^*Q|}{|P^*|}$$

$$R = K|Q|$$

$$|Q| = q - |PQ| - |P^*Q|$$

Luego:

$$R = K q - K (|PQ| + |P^*Q|)$$

Si se llama:

$$B = |PQ| + |P^*Q|$$

$$R = K q - K B \tag{11}$$

$$|B| = \frac{|P^*Q|}{|P^*| + |P^*Q|} \cdot (p + p^*) = \frac{B}{T} (p + p^*)$$

Siendo:

B = actividad de la fracción unida (c/min)

T = actividad correspondiente a p^* (c/min)

p = concentración molar

p^* = concentración molar

|B| = concentración molar del compuesto marcado y sin marcar unido al anticuerpo.

La ecuación (11) que se denomina de Scatchard es la ecuación de una recta cuya pendiente permite conocer la K de equilibrio del sistema y cuya abscisa en el origen representa la capacidad total de unión del anticuerpo q. La pendiente de esta recta es igual a $\Delta R/\Delta B = 1/\text{mol}$ y corresponde a la K de equilibrio del sistema. (fig. 3b)

Cuando $R = 0$, $q = B$

4.0.0 CURVAS DE DOSIS-RESPUESTA

La concentración de un compuesto en un líquido biológico puede determinarse, conociendo la respuesta del sistema, por interpolación en una gráfica que relacione los índices de respuesta con dosis conocidas de ese compuesto.

Si bien en el desarrollo matemático se definió como índice del sistema la relación B/F , pueden ser usados otros índices.

Otras formas de expresar la respuesta del sistema son:

a) B/T : donde B es la actividad aparente medida en la fracción unida y T es la actividad total aparente de la fracción unida y libre.

b) F/B : donde F es la actividad en la fracción libre y B es la actividad en la fracción unida.

c) B/B_0 : corresponde al cociente entre B/T para una dosis determinada y el valor de $(B/T)_0$ que corresponde a la respuesta del sistema en ausencia de compuesto a dosar.

Por lo tanto para una dosis de $p = x$, $B/B_0 = (B/T)_x / (B/T)_0$

d) Logit B/B_0 : se define como la función logit de B/B_0 al:

$$\ln \frac{B/B_0}{1 - B/B_0}$$

La dosis del compuesto a dosar debe expresarse en mol/l. Podrá usarse

ug/ml o uUI/ml siempre que la correspondencia entre mol, masa y uUI sea constante.

Por consiguiente las curvas de dosis-respuesta tienen distintas representaciones. Para su estudio las hemos agrupado en tres grupos.

1.- Grupo: a este grupo pertenecen las curvas cuya pendiente varía bruscamente, lo que limita el rango útil de trabajo (ver gráfico de la figura 2). Estas curvas son:

- a) $B/F = f(p)$
- b) $B/T = f(p)$
- c) $B/B_0 = f(p)$

2.- Grupo: Si se representan los mismos índices de respuesta que en el grupo anterior en función del logaritmo de la dosis, se obtienen curvas sigmoides que permiten disminuir la variación brusca de la pendiente del grupo anterior, aumentándose así el rango útil de trabajo (ver gráfico de la figura 3). Estas curvas son:

- a) $B/T = f(\log p)$
- b) $B/B_0 = f(\log p)$

3.- Grupo: En este grupo hemos incluido aquellas curvas que mediante transformaciones empíricas dan como resultado rectas, lo que facilita la interpolación y el posterior estudio del sistema (ver gráfico de la figura 4). Estas curvas son:

- a) transformación logit
 $\text{logit } B/B_0 = f(\log p)$

- b) $F/B = f(p)$

Esta curva es una recta aparente, Ekins demostró que cuando el sistema es poco sensible, la pendiente de esta recta es grande, lo cual puede llevar a confusiones. [6]

- c) $B/F = f(B)$

siendo:

B = concentración del anticuerpo que está unido.

Esta gráfica constituye la gráfica de Scatchard y es una recta si p y q se comportan como moléculas univalentes.

5.0.0 INFLUENCIA DE LOS PARAMETROS p^* , K y q EN LA FORMA DE LAS CURVAS DE DOSIS-RESPUESTAS

El operador debe conocer la influencia de los parámetros p^* , q y K en la forma de las curvas de dosis respuesta pues, aún trabajando con p^* y q que responden

a los postulados del modelo básico, si la relación en que se encuentran dentro del sistema no es la adecuada se obtendrán curvas de dosis-respuesta deficientes y no aptas para una correcta interpolación.

A fin de conocer las distintas formas de curvas por influencia de p^* , q y K , Rodbard trabajó con la ecuación general de Ekins dando valores arbitrarios a los parámetros. [7]

Obtuvo:

1.- Curvas de dosis-respuesta que muestran el efecto de cambios en la concentración de q en presencia de una cantidad infinitesimal de trazador ($p^* \rightarrow 0$) para un valor de K arbitrario igual a 10 (ver gráfico de la figura 5).

2.- Curvas de dosis-respuesta que señalan el efecto de cambios de K en presencia de cantidades infinitesimales de trazador ($p^* \rightarrow 0$), manteniendo q constante (ver gráfico de la figura 6).

3.- Curvas de dosis-respuesta que muestran el efecto de cambios en K en presencia de una cantidad finita y significativa de trazador $p^* \neq 0$, para la misma cantidad de q utilizado en 2.- (ver gráfico de la figura 7).

4.- Curvas de dosis-respuesta que muestran el efecto de la variación del trazador en presencia de una concentración de q recomendada por Ekins ($q = 3/K$) para $K = 10$ (ver gráfico de la figura 8).

5.- Experimentalmente Ekins ha demostrado que el error experimental que se comete es mínimo cuando $(B/F)_0$ es igual a 1; es decir que la respuesta del sistema en ausencia de p , está afectada de menor error cuando cumple con esta condición.

Por lo tanto se puede hallar una expresión matemática que relaciona p^* , q y K para que $R = 1$.

Ekins encuentra a partir de la ecuación general:

$$R^2 + R(1 + Kp + Kp^* - Kq) - Kq = 0$$

$$\text{si } R = 1$$

$$p^* = 2(q - 1/K)$$

De donde se observa que existen pares de valores p^* y q para una misma constante K que satisface la condición $R = 1$.

El propio Ekins recomienda y deduce matemáticamente que para obtener la

máxima sensibilidad, para el modelo básico, $p^* = 4/K$ y $q = 3/K$, bajo éstas condiciones $(B/F)_0 = 1$ y $(B/T)_0 = 0,5$ (ver gráfico de la figura 9).

6.- Curvas de dosis-respuesta mostrando el efecto de la variación en la concentración del trazador y anticuerpo por arriba y por debajo de las recomendadas por la ecuación de Ekins para $K = 10$ (ver gráfico de la figura 10).

7.- Curvas de dosis-respuesta que parten de $R = 1$ o $(B/T)_0 = 0,5$ para $K = 10$ y $p^* = 2(q - 1/K)$ (ver gráfico de la figura 11).

6.0.0 ASPECTOS ESTADISTICOS DEL RADIOINMUNOENSAYO

A fin de controlar la estabilidad, precisión y reproducibilidad del radioinmunoensayo y de conocer el límite de confianza de una dosis estimada, es necesario hacer uso de ciertos parámetros estadísticos.

Este procedimiento es fundamental cuando se dosan hormonas que se caracterizan por producir cambios clínicos importantes o significativos, cuando varía su concentración en sangre en valores muy pequeños.

Ejemplo: variaciones diurnas de LH en fase luteal y folicular; variaciones de LH en fase folicular, etc.

El estudio estadístico no tiene mayor importancia clínica en el caso de hormonas cuya concentración plasmática sufre grandes variaciones ante factores externos (stress), ejemplo ACTH, hormona de crecimiento, etc.

Desde que la curva de dosis-respuesta no es lineal y la dispersión de la varianza no es constante, sino que depende de la dosis, la utilización de métodos estadísticos clásicos para el radioinmunoensayo no es aplicable. [11]

Los parámetros estadísticos más importantes involucrados en el radioinmunoensayo son:

a) La varianza dentro del ensayo (local y acumulativo)

b) La varianza entre ensayos (local y acumulativo)

a) La varianza dentro del ensayo es una medida de la "precisión" del ensayo, para un límite de confianza del 95%, los datos extraídos se expresan con $\pm 2 \cdot DS$

Según se observa en el gráfico de la figura 12, la varianza no es uniforme, sino que depende de la dosis, por lo tanto la precisión de la dosis estimada dependerá del valor absoluto de la misma. Ello hace necesario conocer la precisión de la deter-

minación en cada punto de la curva de dosis-respuesta.

b) La varianza entre ensayos informa sobre la "estabilidad del sistema". La importancia de éste parámetro radica en que indica cuando un ensayo sale "fuera de control", es decir que los resultados extraídos de ese ensayo no pueden ser comparados con otros realizados anteriormente.

6.1.0 CALCULO DE LA VARIANZA DENTRO DEL ENSAYO Y ENTRE ENSAYOS

Para conocer estos dos parámetros estadísticos es necesario fraccionar en alícuotas uno o más plasmas de dosis próximas, los cuales serán usados por duplicado en cada ensayo como control.

El procedimiento, aplicado a una serie de ensayos que damos como ejemplo, es el siguiente:

1.- Se confecciona con los datos de la potencia estimada de esos plasmas, extraídos de cada nuevo ensayo, un cuadro de valores (ver Tabla I).

2.- A partir del cuadro de valores se puede calcular un contraste para cada plasma control en cada nuevo ensayo:

$$C = \frac{(X_1 - X_2)^2}{2}$$

Se obtiene la Tabla II (columna a y b)(ver Tabla II)

3.- Se calcula el promedio de los contrastes para los plasmas del sujeto 1 y 2 para cada ensayo.

Este valor es la varianza local dentro del ensayo $\overline{MS}$ (ver Tabla II, columnas c y d).

4.- Se suman todos los contrastes del plasma de los sujetos 1 y 2 hasta el ensayo número i y se divide por el número de contrastes; este valor es la varianza acumulativa dentro del ensayo (ver Tabla II, columnas e y f).

La raíz cuadrada de la varianza acumulativa dentro del ensayo es la desviación standard de la distribución de los datos experimentales de las dosis de hormona comprendidos entre la dosis del plasma del sujeto 1 y del sujeto 2.

6.2.0 APLICACION DE LA VARIANZA DENTRO DEL ENSAYO

En el ejemplo, después de los primeros diez ensayos se tiene una varianza acumulativa dentro del ensayo de 1,34; esto significa una desviación standard de 1,15.

Los valores extrapolados de sueros de pacientes comprendidos entre 14 mUI/ml y 20 mUI/ml pueden expresarse con un 95% de confianza como:

$$X \pm 2,30 \text{ mUI/ml}$$

6.3.0 CALCULO DE LA VARIANZA ENTRE ENSAYOS

1.- A partir de la Tabla I, se calculan los valores T_i , para cada plasma control.

T_i es la suma de los dos valores encontrados para un plasma control en el ensayo número i (ver Tabla II).

2.- Se calcula la suma de los cuadrados (SS), para cada plasma en cada ensayo según la fórmula:

$$SS = \frac{E(T_i)^2}{r} - \frac{(E T_i)^2}{rn}$$

siendo:

r = número de replicados; en este caso $r = 2$

n = número de los ensayos que se toman en cuenta; si un ensayo es dejado "fuera de control", ese ensayo no se tiene en cuenta para el cálculo de varianza entre ensayos (ver Tabla IV, columnas 1 y 3).

3.- Se calculan los grados de libertad para n ensayos aceptados como $df = n-1$ (columnas 2 y 4).

4.- Se suman los valores de SS de cada plasma control en cada ensayo y se obtiene un SS combinado (columna 5).

5.- Se divide cada valor de SS combinado por el número total de grados de libertad que resultan de sumar las columnas 2 y 4.

Se obtiene un valor de MS (varianza) para cada ensayo, que en este caso es la varianza acumulativa entre ensayos.

6.4.0 CALCULO DE LA VARIANZA LOCAL ENTRE ENSAYOS

Para el cálculo de la varianza local entre ensayos se sigue el siguiente procedimiento:

1.- Se resta de las columnas 1 y 3 de la Tabla IV dos valores consecutivos de SS (ver Tabla V, columnas 8 y 9).

Ejemplo para el plasma n° 1

$$SS_{n+1} \text{ (local)} = SS_{n+1} - SS_n$$

$$SS_3 \text{ (local)} = SS_3 - SS_2$$

$$3,00 = 3,09 - 0,09$$

2.- Se calculan los SS locales combinados, como la suma de los valores de SS_{local} para el plasma 1 y 2 (ver columna 10).

3.- Se divide los valores por 2, que es el grado de libertad para dos valores de SS y se halla el valor de MS (varianza) que figura en la columna 12.

El valor MS calculado es la varianza local entre ensayos.

6.5.0 APLICACION DE LA VARIANZA ENTRE ENSAYOS

La varianza entre ensayos provee un criterio objetivo para rechazar o aceptar un ensayo.

La combinación de la varianza local entre ensayos y la varianza acumulativa entre ensayos da un parámetro cuyo valor indica cuando es necesario rechazar un ensayo.

Esta relación se calcula como:

$$F = \frac{\text{Varianza local entre ensayos para el ensayo } n}{\text{Varianza acumulativa entre ensayos para el ensayo } n-1}$$

En el ejemplo, después del ensayo n° 10, es decir $n = 8$ (por haber sido rechazados los ensayos 2 y 5), el valor de la varianza local entre ensayos es 209,44 (ver Tabla V, columna 12), mientras que la varianza acumulativa entre ensayos hasta el ensayo n° 9, es decir $n = 7$, es de 13,17 (ver Tabla IV, columna n° 7).

En la relación $F = 209,44/13 = 16$ es muy superior a los valores de F encontra-

dos anteriormente.

En el ejemplo se rechazan ensayos con valores de F mayor que 3, idealmente F debe ser igual a 1.

Cuando el operador cuenta con once ensayos estadísticamente aceptados puede ir desechando los primeros para los cálculos de varianza para nuevos ensayos y evaluar siempre los últimos once. [11]

En el ejemplo, luego del ensayo n° 16, se desechan los primeros a medida que se tienen datos de nuevos ensayos, es decir que se trabaja con $n = 11$ y por lo tanto con un grado de libertad igual a 10 (ver Tabla IV).

7.0.0 CONTROL DE CALIDAD DEL RADIOINMUNOENSAYO

Los parámetros que se utilizan para el control son:

- 1.- Actividad específica de p^*
- 2.- Cantidad de trazador
- 3.- Número total de cuentas (T)
- 4.- Porcentaje de unión no específica (N)
- 5.- Pendiente en el gráfico de dosis-respuesta $\text{Logit } B/B_0 = f(\log p)$
- 6.- Porcentaje correspondiente a la intercepción en el gráfico indicado en 5.-
- 7.- Valor de $(B/T)_0$
- 8.- Varianza entre ensayos
- 9.- Varianza dentro del ensayo
- 10.- Promedios de muestras corridas en ensayos repetidos (Tabla I).

Los cuatro primeros parámetros dependen del proceso de marcación y $(B/T)_0$ depende de las condiciones en que se realiza el ensayo, es decir de p^* , q y K . [9]

5.- Pendiente: La pendiente en el Logit-log sirve para controlar si el comportamiento experimental responde al tratamiento teórico, en tal caso el valor de la pendiente tendrá que encontrarse entre ciertos límites aceptables (-2,2 a -2,4).

En el caso de que la curva experimental no sea lineal para todos los valores de dosis ensayados, la curva es útil sólo en la porción que es recta.

6.- Intercepción: El 50% de intercepción es la cantidad de hormona fría (p) que hace disminuir el valor inicial de $(B/T)_0$ a un 50%.

Por lo tanto ese punto corresponde a la dosis de hormona que presenta una respuesta del sistema de $B/B_0 = 0,5$ y a un $\text{logit } B/B_0 = 0$

Este parámetro informa indirectamente sobre la sensibilidad del sistema.

Llamamos sensibilidad a la mínima dosis detectable.

Si el 50% de intercepción es bajo corresponde a una sensibilidad alta.

El operador debe interpolar los índices de respuesta de sueros incógnitas en un entorno al valor $B/B_0 = 0,5$ debido a que esta zona presenta menor dispersión de la respuesta del sistema.

Este parámetro debe mantenerse constante en sucesivos ensayos; pues su valor depende de la concentración de p^* y q dentro del sistema.

7.- $(B/T)_0$: Experimentalmente se comprobó que los errores casuales son menores cuando B/T es cercano a 0,5. Por lo tanto se aconseja trabajar con un valor inicial de $(B/T)_0$ que se aproxime a este valor.

8.- Varianza dentro del ensayo: Como se ha visto, este parámetro indica con que precisión se está trabajando; y la forma correcta en que deben ser expresados los resultados.

9.- Varianza entre ensayos: Provee de un criterio objetivo para aceptar o desechar un ensayo.

Límites de tolerancia: Este límite para cada parámetro es un factor muy importante del sistema de control y depende del propósito de un determinado ensayo.

Según si el investigador desea trabajar con un límite de confianza del 68%, 95% ó 99% expresará sus resultados con $\pm 1ds$, $2ds$, $3ds$.

Los cuatro parámetros más importantes del sistema de control son:

- 1.- $(B/T)_0$
- 2.- 50% de intercepción
- 3.- Varianza dentro del ensayo
- 4.- Varianza entre ensayos

Cuando uno de éstos parámetros sale fuera de los límites de tolerancia se inspeccionan los otros a fin de individualizar las causas del problema.

Los límites de tolerancia pueden ser modificados y el número de muestras control reducidos a medida que el operador adquiera más experiencia sobre el comportamiento de su sistema.

Es aconsejable confeccionar una carta control representando gráficamente

los valores hallados para cada nuevo ensayo según lo indica la figura 13)

8.0.0 METODOLOGIA

Una vez que se ha encontrado las condiciones óptimas de p^* y q el procedimiento que se aconseja seguir para conocer la precisión, estabilidad y reproducibilidad del radioinmunoensayo es el siguiente:

1.- Se eligen seis plasmas control que se fraccionan en alícuotas para ser incluidos en cada nuevo ensayo por duplicado.

Las características que deben presentar son:

Plasma A_1 y A_2	dosis bajas
Plasma B_1 y B_2	dosis intermedias
Plasma C_1 y C_2	dosis altas

2.- Cuando se realiza un ensayo se aconseja representar los índices de respuesta en función de la dosis según la forma:

$$B/F = f(p) \text{ y } \text{logit } B/B_0 = f(\log p)$$

3.- Calcular en la representación logit:

- a) la pendiente
- b) la dosis de p que corresponde a un $\text{logit} = 0$; con este procedimiento se conoce y se controla la sensibilidad del sistema.

4.- Interpolarse en la gráfica de logit los índices de respuesta correspondientes a los plasmas control, para estimar la dosis que le corresponde según el ensayo.

5.- Tabular la dosis estimada para los plasmas del grupo A, B y C, según la Tabla I.

Obsérvese que este cuadro corresponde a un solo rango de dosis, de modo que el operador tendrá luego de tabulado los valores, tres cuadros correspondientes a las tres dosis control, cada una de ellas con dos plasmas 1 y 2.

6.- Para cada dosis control calcular un contraste aplicando:

$$C_A = \frac{(X_1 - X_2)^2}{2}$$

Se obtendrá un cuadro similar al n° 2 para las dosis A, B y C.

7.- Para cada rango de dosis se calcula la varianza acumulativa dentro del ensayo, la raíz cuadrada de aquella es la desviación standard para esos rangos de dosis ensayados; es decir de A₁ a A₂ ; de B₁ a B₂ ; de C₁ a C₂ .

Este procedimiento permite conocer la precisión del ensayo y la expresión correcta de una dosis de una muestra incógnita estimada con el sistema de radioinmunoensayo.

La expresión del resultado se hará con la potencia estimada del plasma, incógnita ± 2 DS del plasma control que más se acerque.

Luego de diez ensayos, o los que el operador considere convenientes, este procedimiento puede abandonarse y reducir el sistema de control a una sola dosis que seguirá analizándose en cada nuevo ensayo. Este plasma control sirve para saber si un ensayo puede aceptarse o debe ser rechazado.

8.- Con los datos de la potencia estimada de una de las dosis control B₁ - B₂ , se confecciona a medida que se realizan nuevos ensayos un cuadro de valores similar a la Tabla III.

9.- Se calcula la suma de los cuadrados SS como:

$$SS = \frac{E (T_i)^2}{r} - \frac{(E T_i)^2}{rn}$$

10.- Se calcula la varianza acumulativa entre ensayos (ver Tabla IV).

11.- Se calcula la varianza local entre ensayos (ver Tabla V).

12.- Se aplica el cálculo de F para aceptar o rechazar el nuevo ensayo.

En caso de ser rechazado un ensayo, los resultados extraídos del mismo no se tendrán en cuenta para calcular la varianza entre ensayos para posteriores ensayos.

Este procedimiento permite el control de la reproducibilidad del sistema de radioinmunoensayo y su estabilidad.

Las ventajas que se obtienen al seguir este procedimiento son:

1.- Las medidas de los errores experimentales son independientes de las curvas de dosis-respuesta empleada, y están exsentos de suposiciones de linealidad, normalidad, etc.

Los cálculos están basados en valores de dosis extraídos de las curvas en

términos de unidades/ml, mg/ml.

2.- Las mediciones hechas con plasmas proveen mayor información que las realizadas con buffer; de ahí la razón de la utilización de plasma controles.

3.- Mantener este sistema de control es simple rápido y útil para extraer conclusiones cuando el comportamiento del ensayo sale fuera de control.

4.- Es un método flexible pues el operador a medida que gana en experiencia puede modificar los límites de tolerancia y reducir el número de muestras de plasmas control

XXXXXXXXXXXX

AGRADECIMIENTO: Agradecemos al Doctor Renato Radicella, Gerente de Radioisótopos y Radiaciones de la Comisión Nacional de Energía Atómica, el asesoramiento técnico, la revisión y discusión del manuscrito original.-

XXXXXXXXXXXX

REFERENCIAS

- [1] ALBANO, J., EKINS, R. P., The Attainment of High Sensitivity and Precision in Radioimmunoassay Techniques as Exemplified in a Simple Assay of Serum Insulin; In vitro Procedures with Radioisotopes in Medicine. IAEA, Vienna 1970, STI/PUB/237, p.491
- [2] ALBANO, J., EKINS, R. P., A Sensitive Precise Radioimmunoassay of Serum Insulin; Relying on Charcoal Separation of Bound and Free Hormone Moieties; Acta Endocrinológica, 70 (1972), p. 487-509
- [3] BROWNLEE, K. A., Statistical Theory and Methodology in Science and Engineering, Wiley, New York, 1961
- [4] EKINS, R. P., NEWMAN, G. B., The Optimisation of Precision and Sensitivity in the Radioimmunoassay Method; Protein and Polypeptide Hormone; (Proc Int. Symp. Liege 1968) 2 (Margoulies M. Ed.) Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, ICS 161 (1968) p. 329
- [5] EKINS, R. P., NEWMAN, M. A., O'RIORDAN J. H. L., Theoretical Aspects of Saturation and Radioimmunoassay; Radioisotopes in Medicine; In vitro Studies (Hayes, R. L., Goswitz, F. A., Murphy, B. E. P. Ed.) USAEC, Oak Ridge, Tenn. (1968) p. 59
- [6] EKINS, R. P., Theoretical Aspects of Saturation Analysis; In vitro Procedures with Radioisotopes in Medicine, IAEA, Vienna 1970, STI/PUB/237, p. 325
- [7] FELDMAN, M., RODBARD, D., Mathematical Theory of Radioimmunoassay; Principles of Competitive Protein Binding Assay, Chapter VII, p. 158 (1971)
- [8] KENNETH WEAVER, Radioimmunoassay; A Simplified Procedure for Dose Interpolation; The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, St. Louis, vol. 77 N° 4, p. 661-664, April 1971
- [9] RODBARD, D., RAYFORD, J. A., COOPER, ROSS, G. T., Statistical Quality Control of Radioimmunoassay; The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 28, N° 10, october 1968, p. 1412-1418
- [10] RODBARD, D., COOPER, J. A., A Model for Prediction of Confidence Limits in Radioimmunoassay and Competitive Protein Binding Assays; In vitro Procedures with Radioisotopes in Medicine IAEA, Vienna, 1970
- [11] RODBARD, D., Statistical Aspects of Radioimmunoassays; Principles of Competitive Protein Binding Assays, Chapter VIII, p.204, (1971)
- [12] RODBARD, D., RUDER, Mathematical Analysis of Kinetics of Radioligand Assays;

Improved Sensitivity Obtained by Delayed Addition of Labeled Ligand, *J. Clin. Endocr.* 33; p. 343 (1971)

- [13] YALOW, R. S., BERSON, S. A., General Principles of Radioimmunoassay, Radioisotopes in Medicine; In vitro Studies (11th A. E. C. Symp. in Med., Oak Ridge, Tenn. 1967), 1968, p.7
- [14] YALOW, R. S., General Aspects of Radioimmunoassay Procedures; In vitro Procedures with Radioisotopes in Medicine, IAEA, Vienna 1970, STI/PUB/237, p. 455

FIGURAS

Y

TABLAS

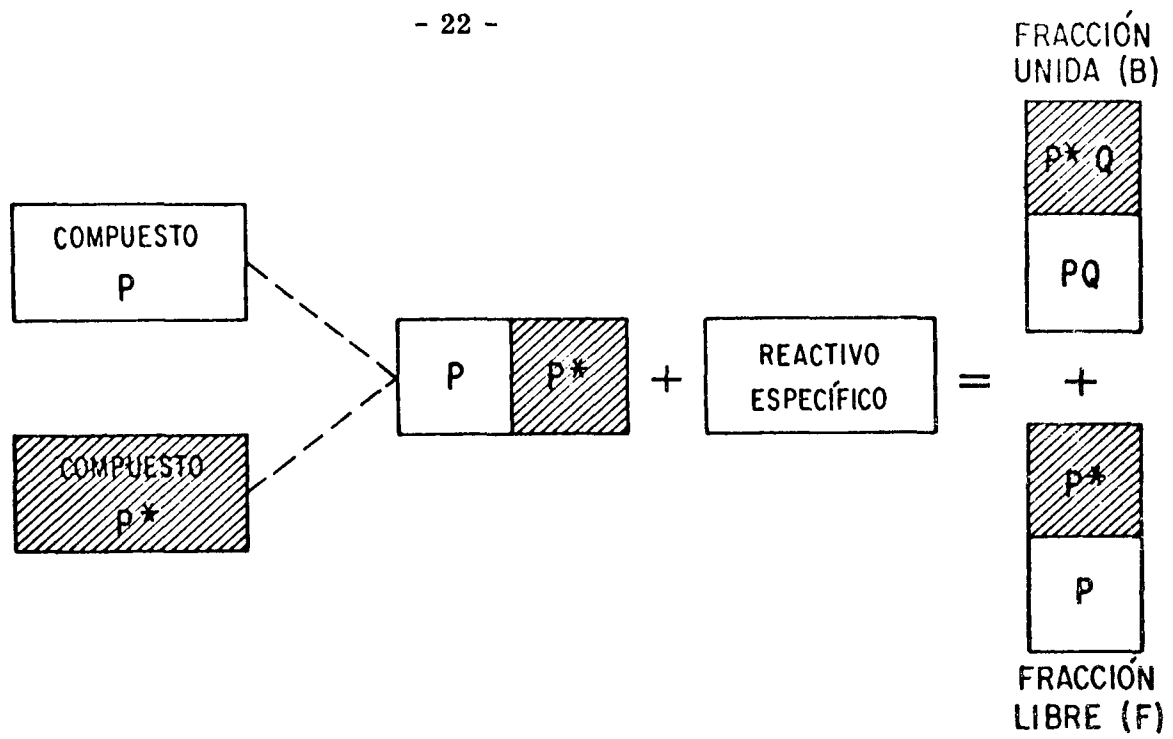


Fig 1

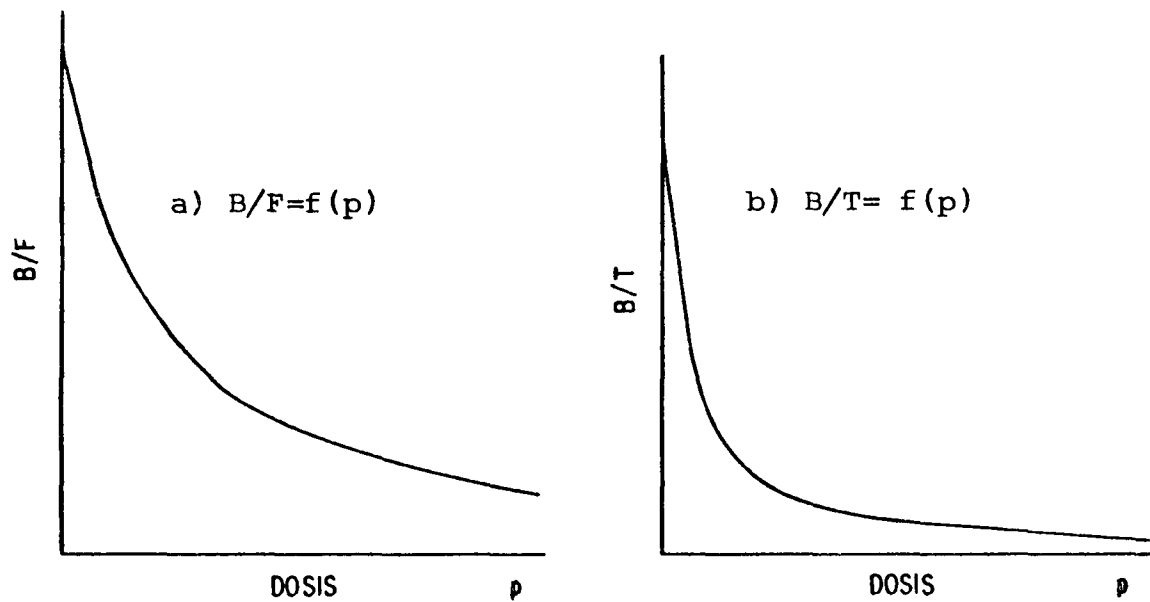
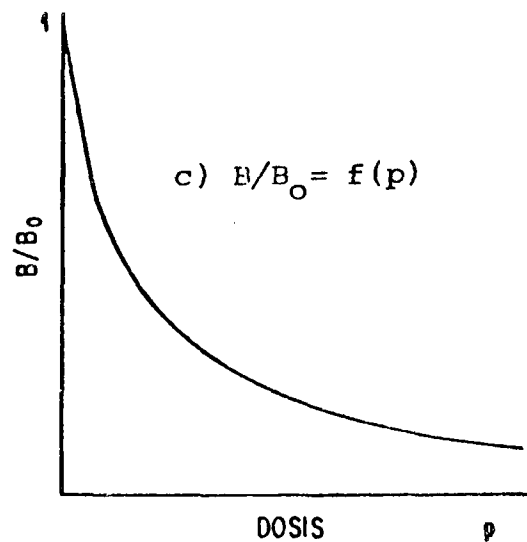


Fig 2
Primer Grupo



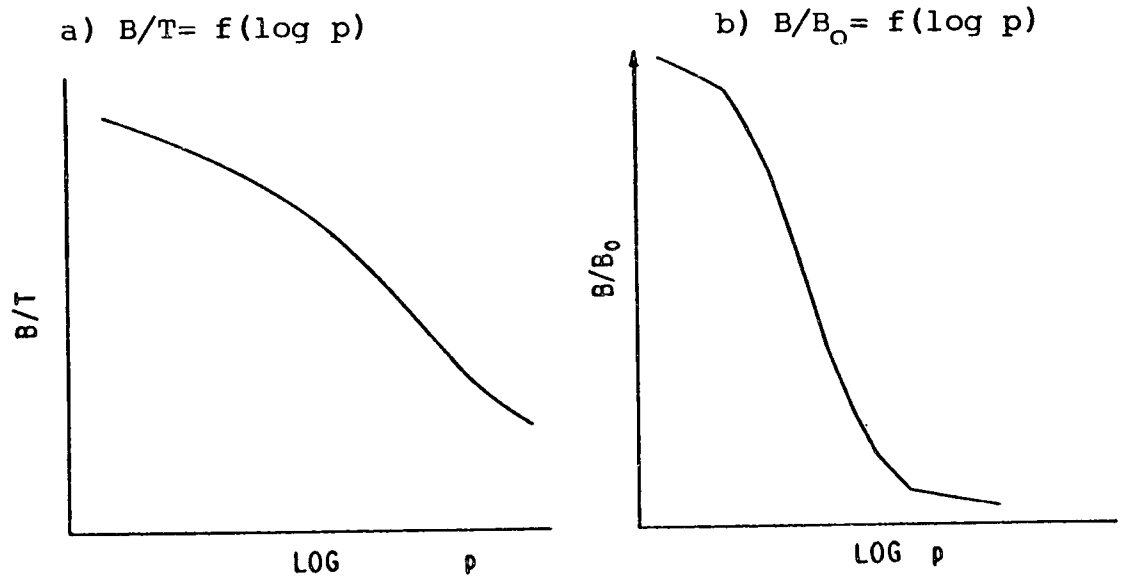


Fig 3 - Segundo Grupo

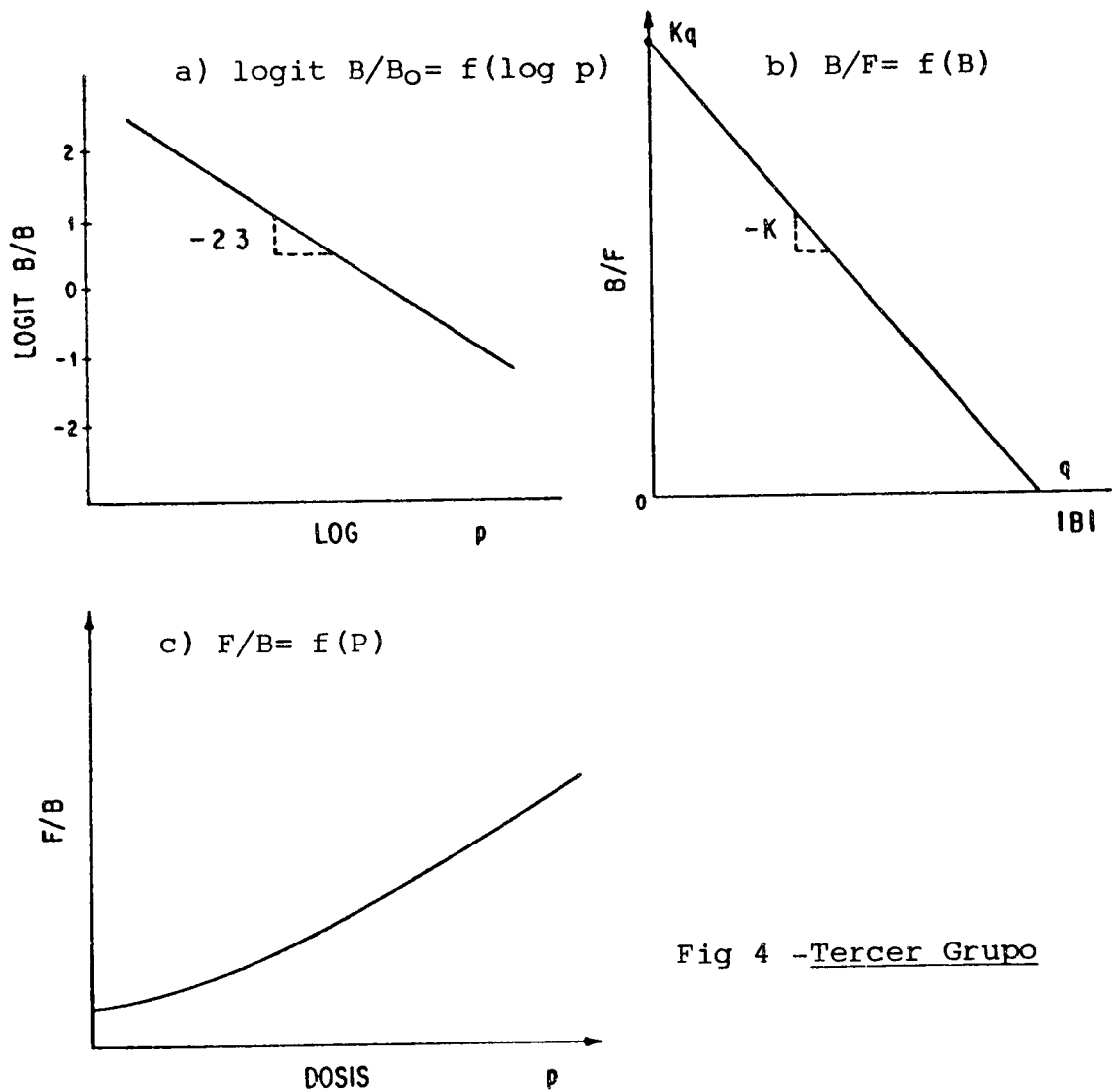


Fig 4 - Tercer Grupo

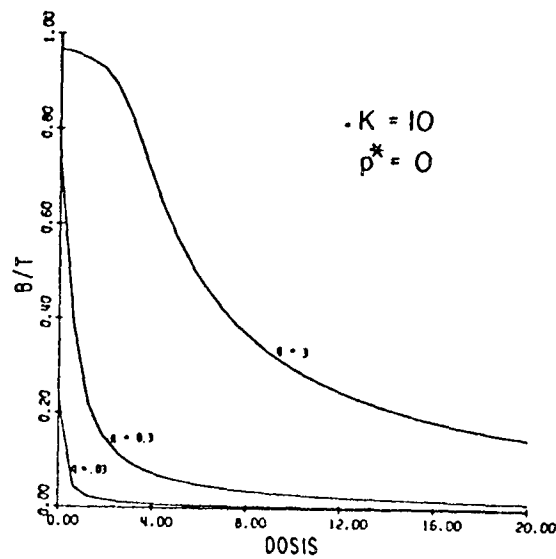


Fig 5a- A medida que aumenta q , disminuye la pendiente de la curva y aparece una zona de baja sensibilidad para bajas dosis. La mejor, en este caso, es la que corresponde a $q=0.3$ ya que tiene buena pendiente y un rango útil de trabajo mayor que la de $q=0.03$. [7]

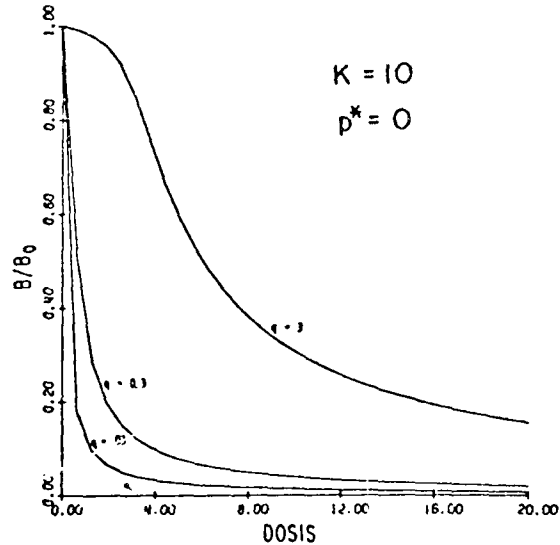
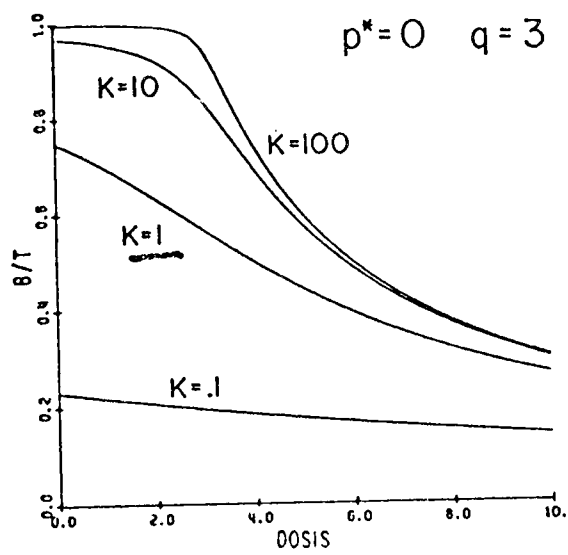
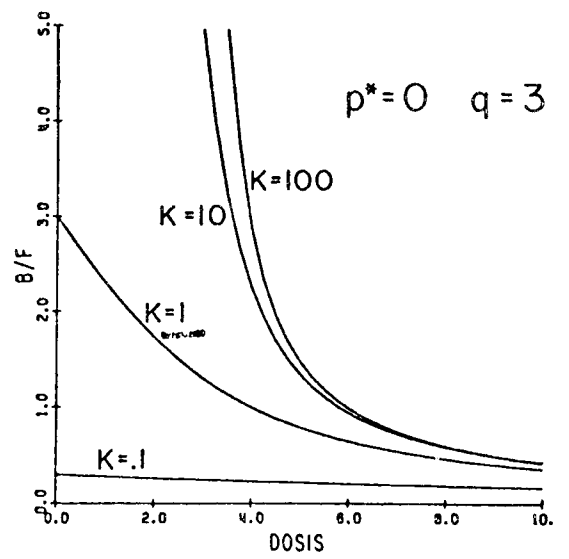


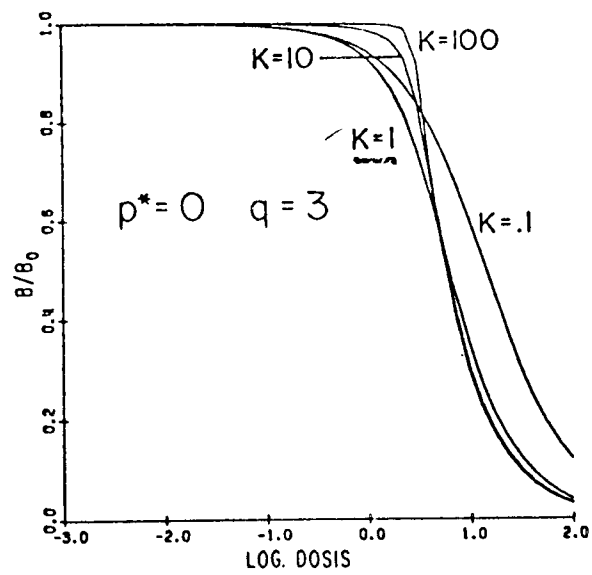
Fig 5b -Al representar B/B_0 en función de la dosis, permite la mejor comparación entre las tres curvas, ya que parten de la misma ordenada en el origen. [7]



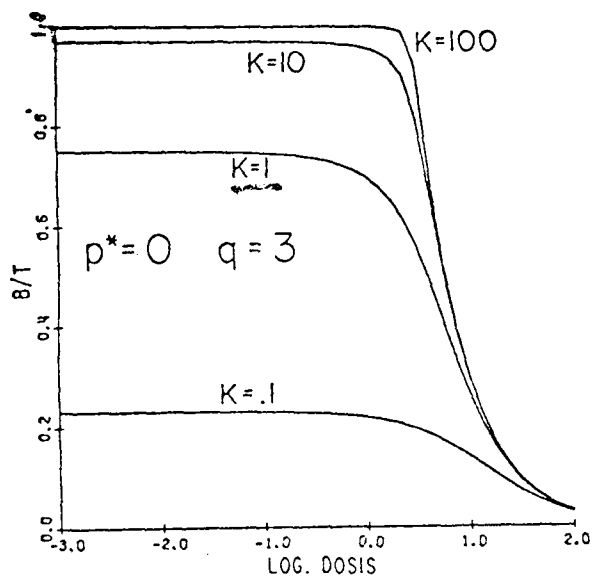
6a



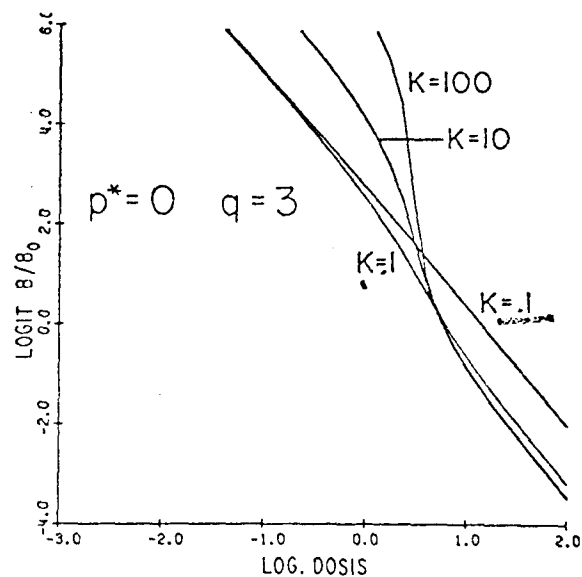
6b



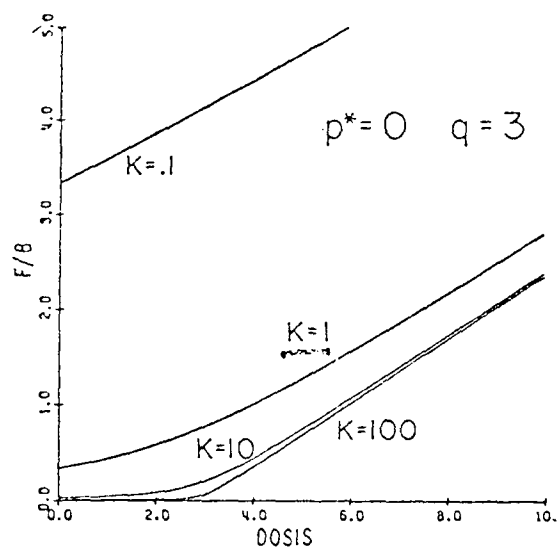
6c



6d

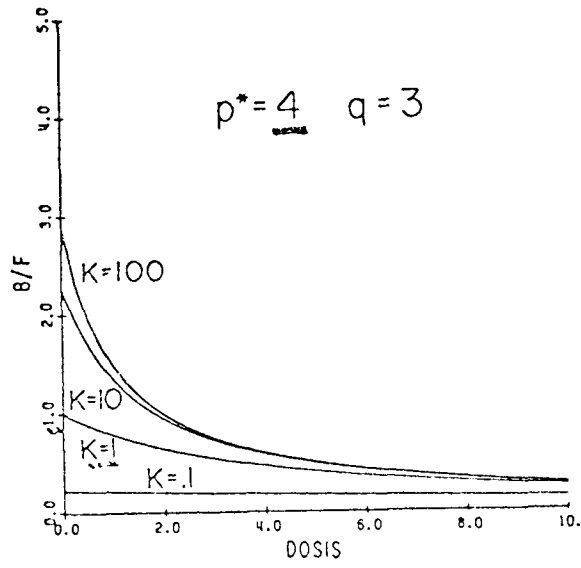


6e

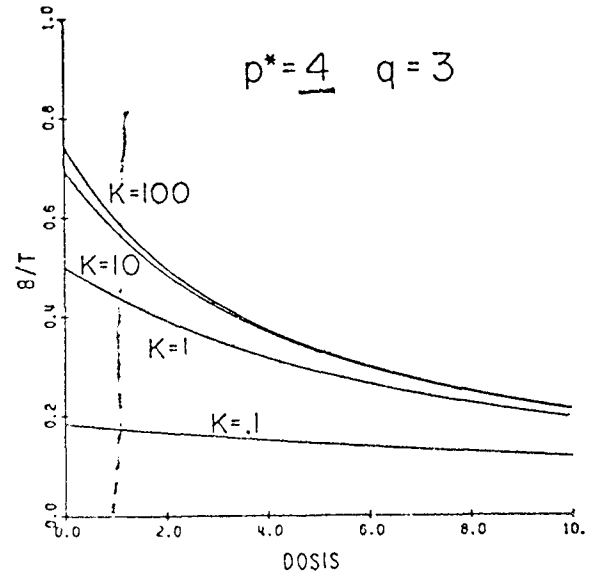


6f

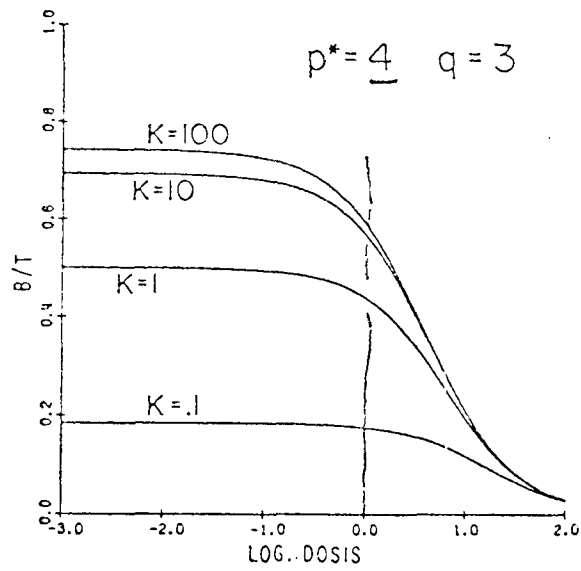
Fig 6 -Se observa un plateau a bajas dosis que en las condiciones del sistema se mantiene hasta cuatro unidades. Este efecto no es mejorado en ninguna de las representaciones de dosis respuesta. [7]



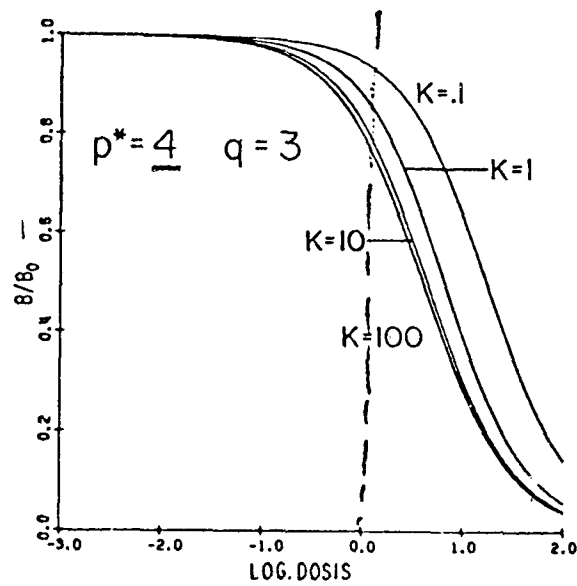
7a



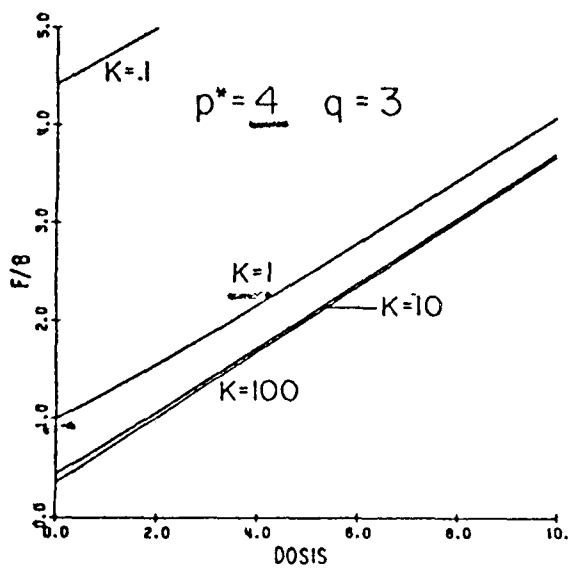
7b



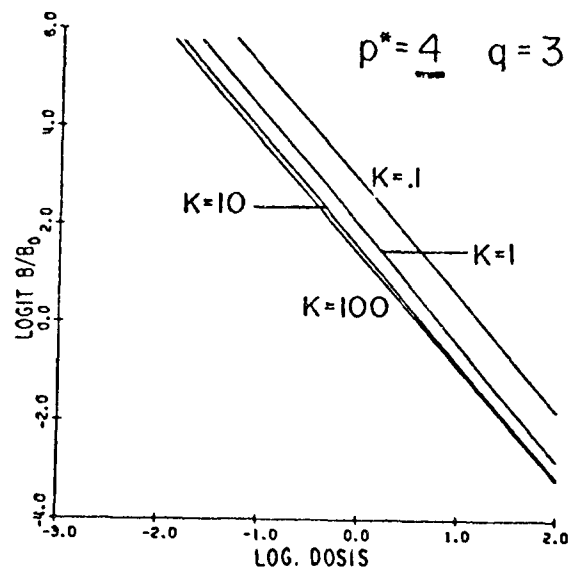
7c



7d

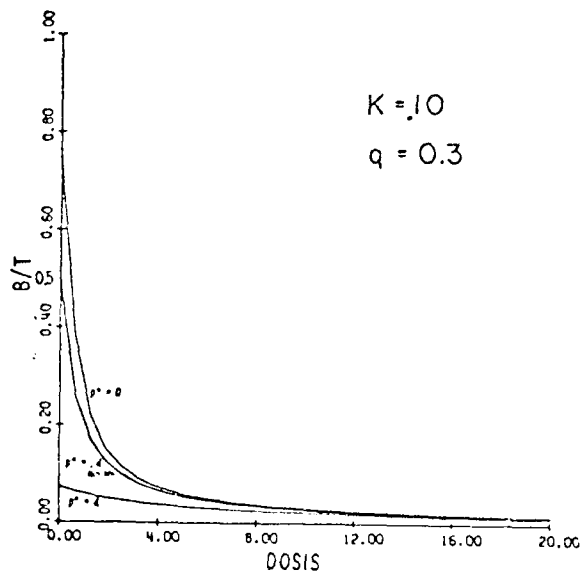


7e

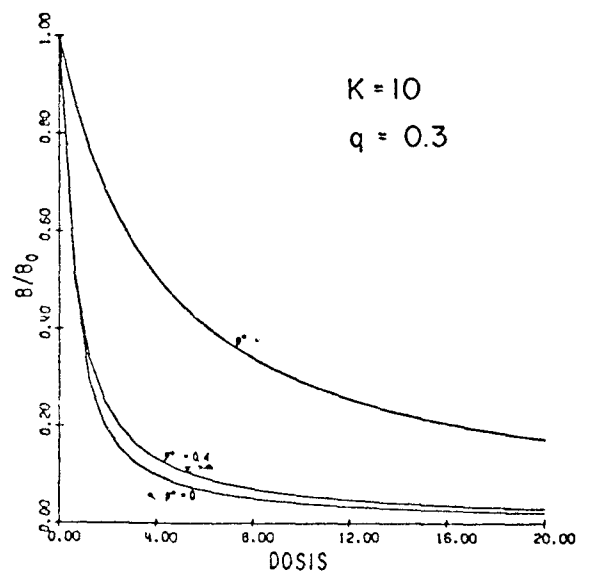


7f

Fig 7-Por agregado de 4 unidades de p^* se obtiene un efecto mejorador sobre la forma de las curvas de dosis respuesta que se señaló en la fig 6. Desde que p^* y p son idénticos en el modelo básico, equivale a correr el eje de las ordenadas de la fig 6, 4 unidades hacia la derecha.[7]

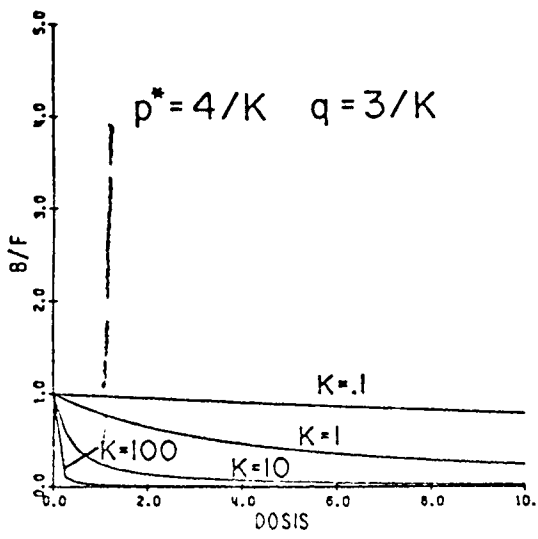


8a

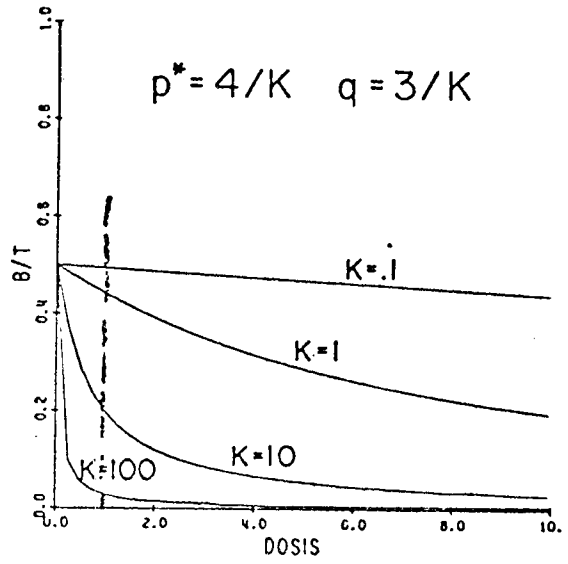


8b

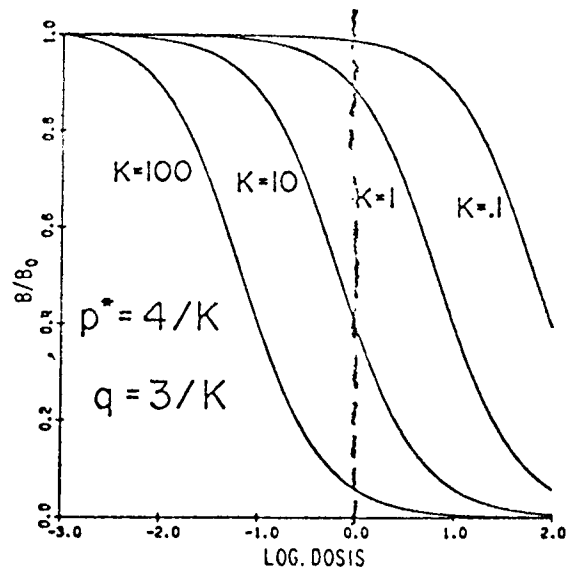
Fig 8- Se señala el efecto de cambios en el trazador. Se observa que a medida que se disminuye el trazador, aumenta la sensibilidad del sistema (pendiente) Nótese en la fig. 8a, el cambio que presenta en el valor de la ordenada en el origen. [7]



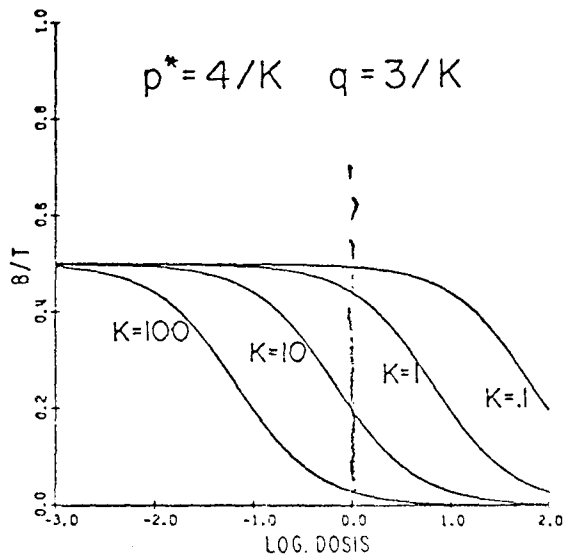
9a



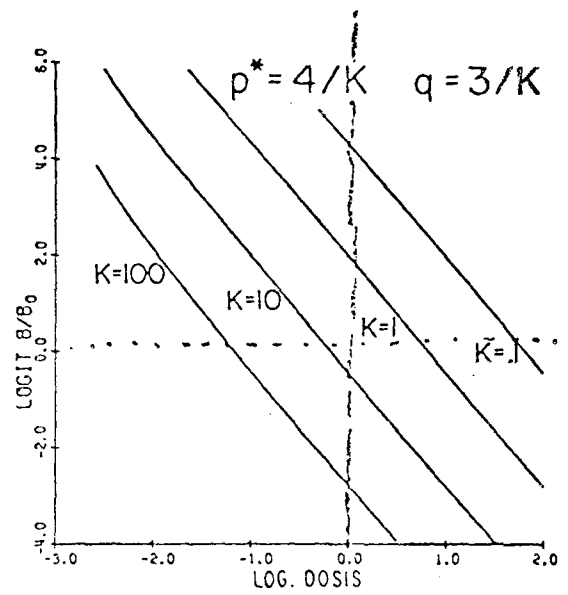
9b



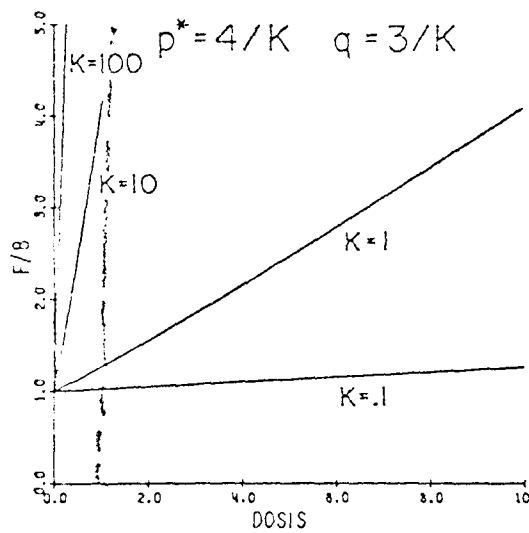
9c



9d



9e



9f

Fig 9-Señala el efecto de cambios recíprocos entre q y p ; según el valor de K , de acuerdo con lo recomendado por Ekins.
Obsérvese que todas las curvas tienen un valor inicial de $B/T=0.5$.
En la fig. 9e, se observa que la pendiente de todas las curvas es igual a $-\ln 10$ o sea $-2,3$. [7]

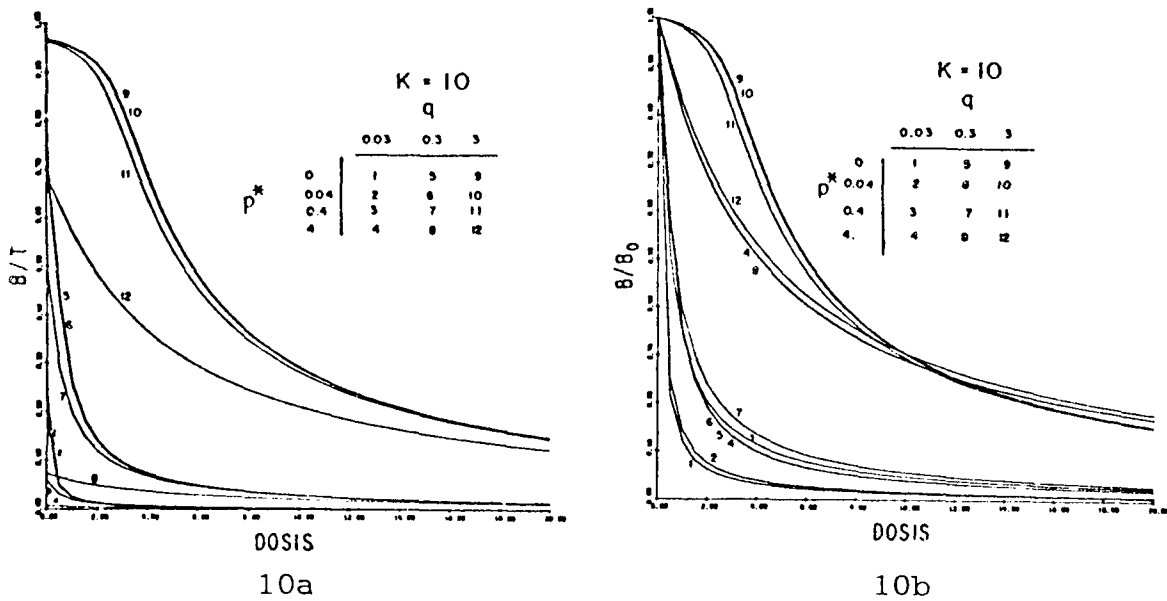


Fig 10- Señala el efecto de cambios en la relación de p^* y q dentro del sistema.
Se observa que las mejores condiciones de trabajo se obtienen cuando la relación entre p^* y q cumple con lo recomendado por Ekins, es decir $p^*=4/K$ y $q=3/K$, condiciones que corresponden a la curva 7. [7]

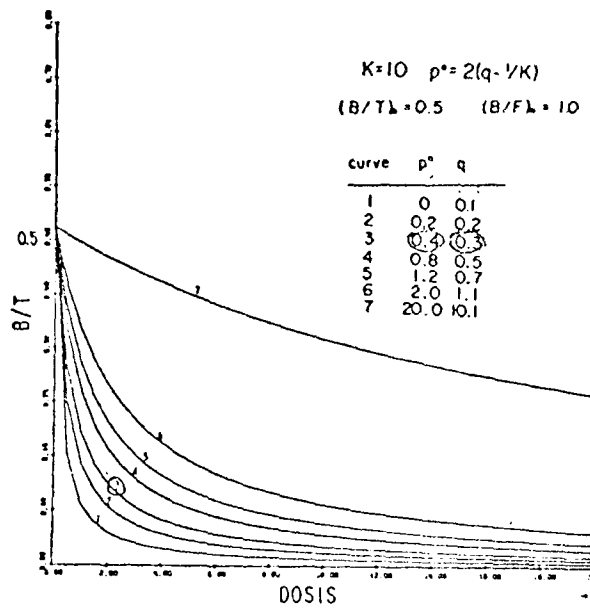


Fig 11 -Se muestra una familia de curvas que parten de B/T inicial igual a 0.5, pues cumplen con la condición: $p^* = 2(q-1/K)$. Resulta claro que no basta la condición $(B/T)_0 = 0.5$ para suponer que el sistema está en las condiciones óptimas de trabajo. La curva 3 corresponde a las condiciones que postula Ekins. [7]

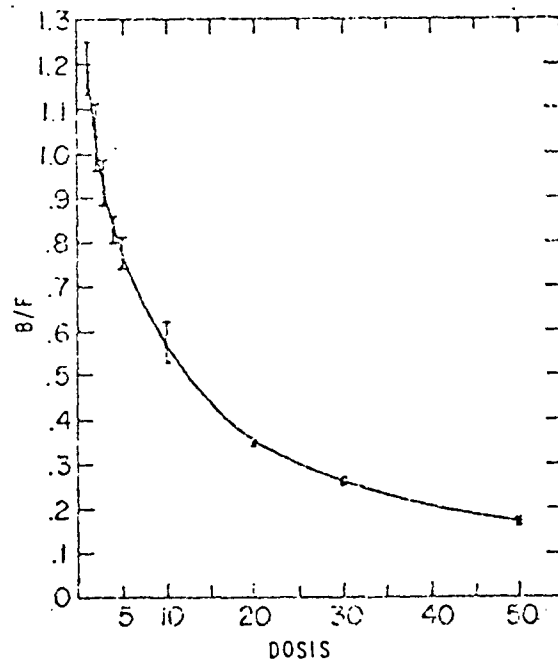


Fig 12 -Curva de dosis respuesta típica donde se indica la varianza de 10 replicados. Obsérvese que la varianza no es uniforme en toda la curva. [11]

CARTA DE CONTROL DE ENSAYOS DE HLH [11]

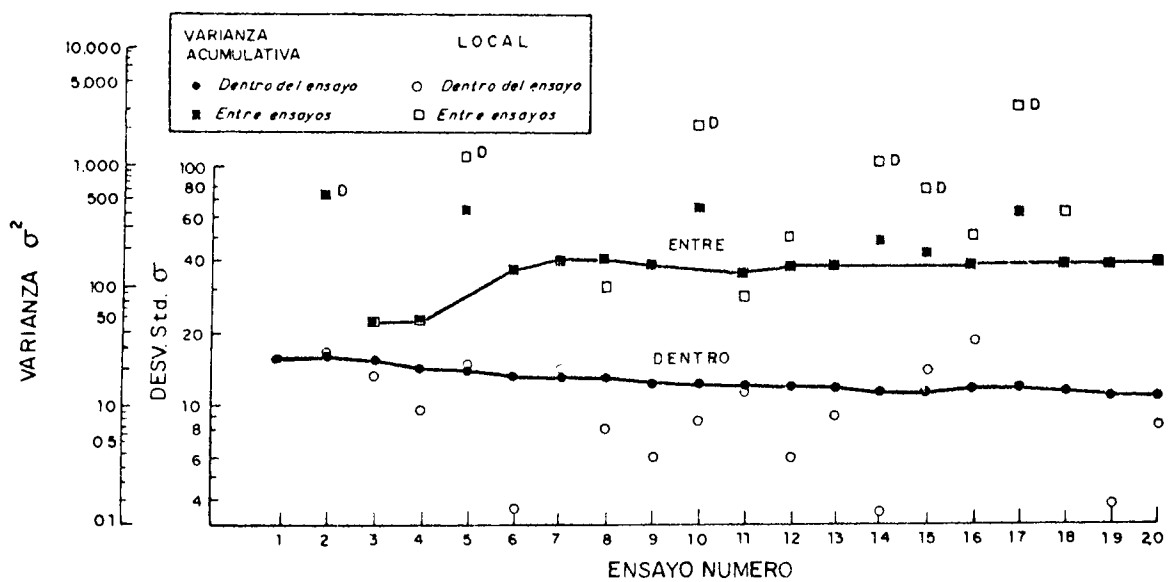
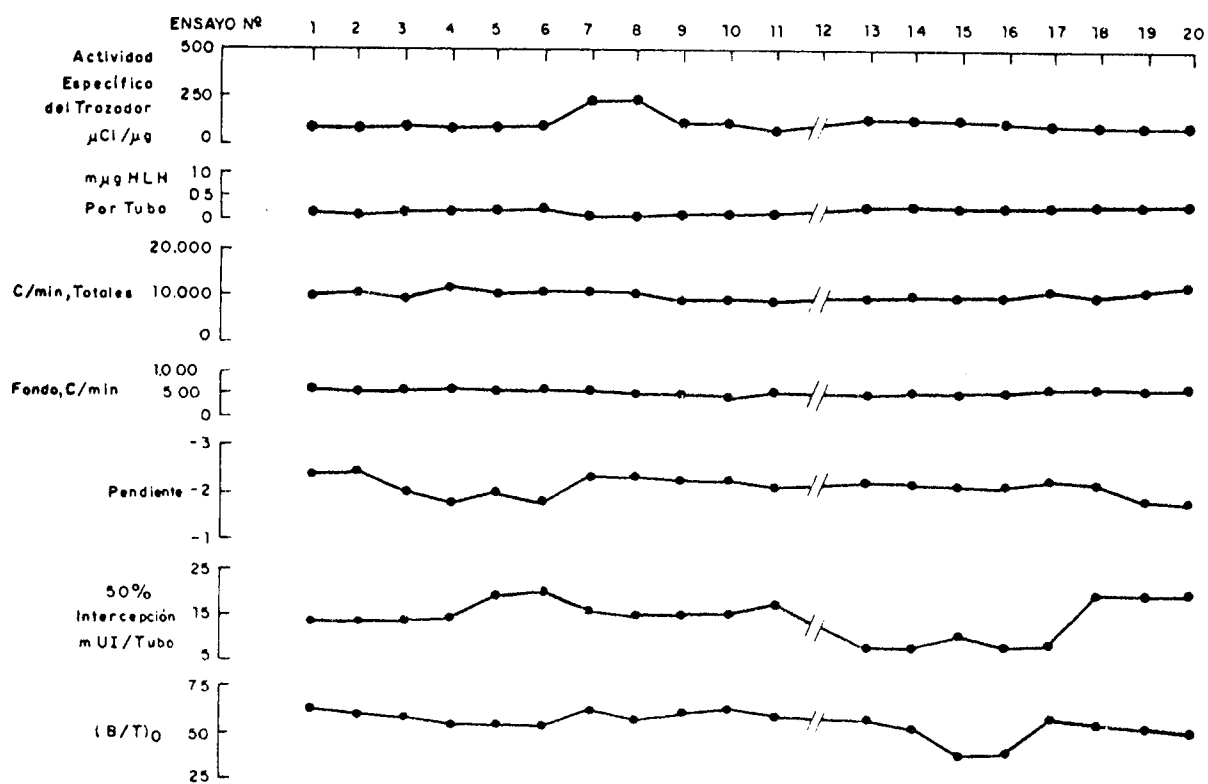


Fig 13 - Carta de control de ensayos de HLH., los ensayos descartados están indicados como "D".

Tabla I

Ensayo Nº	Sujeto 1		Sujeto 2	
	x ₁	x ₂	x ₁	x ₂
1	16.5	16.5	23.3	26.5
2	9.5	9.5	15.2	18.5
3	16.2	16.2	20.5	23.1
4	17.2	18.5	20.5	21.8
5	25.7	23.8	20.8	22.8
6	19.8	19.8	17.2	17.2
7	11.9	11.9	17.4	20.2
8	15.1	15.8	23.1	24.7
9	15.2	15.2	21.1	22.4
10	22.4	22.4	34.7	36.3
11	12.2	14.5	22.4	22.4
12	10.6	10.6	21.1	19.8
13	13.9	14.5	25.1	23.4
14	6.9	7.3	14.8	14.8
15	9.6	9.6	14.2	16.5
16	11.2	11.2	16.2	19.8
17	4.6	4.6	7.5	5.7
18	20.5	20.5	20.5	21.1
19	16.5	16.5	23.1	22.4
20	12.5	14.1	17.2	17.2

Tabla II

Ensayo No.	a Contraste		b	c SS	Local df	d MS	e SS	f Acumulativo	
	1	2						df	MS
1	0	4.84		4.85	2	2.42	4.84	2	2.42
2	0	5.45		5.45	2	2.73	10.29	4	2.57
3	0	3.38		3.38	2	1.69	13.67	6	2.28
4	0.85	0.85		1.70	2	0.85	15.37	8	1.92
5	1.81	2.00		3.81	2	1.91	19.18	10	1.92
6	0	0		0	2	0	19.18	12	1.60
7	0	4.00		4.00	2	2.00	23.18	14	1.66
8	0.25	1.28		1.53	2	0.77	24.71	16	1.54
9	0	0.85		0.85	2	0.43	25.56	18	1.42
10	0	1.28		1.28	2	0.64	26.84	20	1.34
11	2.65	0		2.65	2	1.33	29.49	22	1.34
12	0	0.84		0.84	2	0.42	30.33	24	1.26
13	0.18	1.45		1.63	2	0.82	31.96	26	1.23
14	0.08	0		0.08	2	0.04	32.04	28	1.14
15	0	2.65		2.65	2	1.83	34.69	30	1.16
16	0	6.48		6.48	2	3.24	41.17	32	1.29
17	0	1.81		1.81	2	0.91	42.98	34	1.26
18	0	0.18		0.18	2	0.09	43.16	36	1.20
19	0	0.25		0.25	2	0.13	43.41	38	1.14
20	1.28	0		1.28	2	0.64	44.69	40	1.12

Tabla III

Ensayo i	Totales, TI		n
	Sujeto 1	Sujeto 2	
1	33.0	49.8	1
2	19.0	33.7	Descartado
3	32.4	43.6	2
4	35.7	42.3	3
6	49.5	64.0	Descartado
6	39.6	34.4	4
7	23.8	37.6	5
8	30.9	47.8	6
9	30.4	43.5	7
10	44.8	71.0	Descartado
11	26.7	44.8	8
12	21.2	40.9	9
13	28.4	48.5	10
14	14.2	29.6	Descartado
15	19.2	30.7	Descartado
16	22.4	36.0	11
17	9.2	13.2	Descartado
18	41.0	41.6	12
19	33.0	45.5	13
20	26.6	14.4	14

Tabla IV

Ensayo	n'	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
		Sujeto 1	Sujeto 2	Combinado				
		SS	df	SS	df	SS	df	MS
1	1'	—	—	—	—	—	—	—
2	2'	43.68	1	64.80	1	108.36	2	54.18
3	3'	0.09	1	9.61	1	9.70	2	4.85
4	4'	3.09	2	18.06	2	19.15	4	4.79
5	5'	96.71	3	148.13	3	244.84	6	40.81
6	6'	18.14	3	60.07	3	78.21	6	12.70
7	7'	87.90	4	69.78	4	139.68	8	17.46
8	8'	69.56	5	88.10	5	155.66	10	15.57
9	9'	71.58	6	80.45	6	150.04	12	13.17
10	10'	140.41	7	438.69	7	579.11	14	41.21
11	11'	85.09	7	88.37	7	173.46	14	12.39
12	12'	132.81	8	90.28	8	223.09	16	13.94
13	13'	134.63	9	105.19	9	239.82	18	13.32
14	14'	251.14	10	100.75	10	441.89	20	22.09
15	15'	189.73	10	177.50	10	367.31	20	18.37
16	16'	162.78	10	179.54	10	291.90	20	14.60
17	17'	316.53	10	478.91	10	831.44	20	40.67
18	18'	219.45	10	101.51	10	320.96	20	16.05
19	19'	270.92	10	108.37	10	327.29	20	16.36
20	20'	206.26	10	133.01	10	432.26	20	17.11

$$\text{fórmula: } SS = \frac{\sum Ti^2}{r} - \frac{(\sum Ti)^2}{rn}$$

Tabla V

Varianza Local Entre Ensayos						
		(8)	(9)	(10)	(11)	(12)
		Sujeto 1	2	Combinado		
		SS	SS	SS	df	MS
1	1'	—	—	—	—	—
2	2'	43.58	64.77	108.35	2	54.18-
3	3'	0.09	9.61	9.70	2	4.85
4	4'	3.00	6.45	9.45	2	4.73
5	5'	93.62	132.07	225.68	2	112.85-
6	6'	13.05	44.01	57.06	2	28.53
7	7'	51.76	9.70	61.46	2	30.73
8	8'	1.67	16.32	17.99	2	9.00
9	9'	2.01	0.36	2.37	2	1.19
10	10'	68.33	360.04	418.87	2	209.44-
11	11'	13.51	1.90	15.41	2	7.71
12	12'	47.73	1.91	49.64	2	24.82
13	13'	1.82	14.91	16.73	2	8.37
14	14'	116.51	85.56	203.07	2	101.04-
15	15'	56.10	72.39	127.49	2	63.75-
16	16'	27.73	24.35	52.08	2	26.04
17	17'	180.91	375.45	556.36	2	278.16
18	18'	63.83	0.05	63.88	2	31.94
19	19'	4.06	6.43	10.49	2	5.25
20	20'	4.43	26.67	31.15	2	16.53