

Fundamentos prácticos de la dosificación hormonal

CARLOS HERNÁNDEZ CASSIS¹, CARLOS CURE CURE², JORGE HERNÁNDEZ CASSIS³

El propósito buscado al tratar este trabajo sobre dosificación hormonal es brindar al lector conceptos claros y útiles acerca de los principios básicos del radioinmunoanálisis (RIA), definiendo someramente los componentes y las etapas del proceso de su elaboración y haciendo énfasis en el procesamiento de datos, en el control de calidad y en la determinación de rangos de normalidad.

Hoy se obtienen fácilmente "kits" comerciales para dosificación hormonal por RIA y es por eso que el laboratorista y el médico deben estar familiarizados con estos tópicos para brindar mejores resultados y diagnósticos a los pacientes.

Palabras claves: RIA, anticuerpo específico, trazador, antígeno.

Historia

Antes de 1960 era muy difícil medir las concentraciones pequeñas de sustancias que se encontraban en los fluidos biológicos. Las pruebas químicas y biológicas eran imperfectas lo que producía inexactitudes, y solían necesitarse grandes cantidades de las muestras por examinar.

En 1960, Yalow y Berson describieron, en Estados Unidos, un nuevo método para la dosificación de insulina basado en la técnica del análisis de unión competitiva utilizando anticuerpos contra la insulina¹.

Los enormes progresos realizados en la dos últimas décadas en el campo de la endocrinología deben ser atribuidos a estos descubrimientos, el radioinmunoanálisis (RIA) es una de las técnicas más utilizadas.

El RIA es una técnica en la cual se utiliza una reacción en la cual la hormona o ligante por investigar en cantidades variables compete con una cantidad constante y conocida de la misma hormona o ligante marcada radiactivamente para ocupar los sitios de unión de un anticuerpo específico.

-
1. M.D. Endocrinólogo. Profesor de Endocrinología. División de Ciencias de la Salud. Universidad del Norte. Barranquilla, Colombia.
 2. M.D. Endocrinólogo. Profesor Facultad de Medicina. Universidad Metropolitana. Barranquilla, Colombia.
 3. Ingeniero Mecánico. Supervisor Computer y Comunicación Sistem (CCS), Intercor.

Componente del RIA.

El radioinmunoanálisis requiere de cuatro (4) elementos fundamentales y de seis (6) procesos básicos.

Los cuatro (4) elementos fundamentales son:

Estándares: son cantidades conocidas de la hormona (Antígeno o ligante) altamente purificadas iguales a la sustancia que es preciso dosificar. Para evitar alteraciones en los resultados se requiere que el estándar sea puro, en la forma hormonal activa, que sea de la misma especie y que no esté en proceco de degradación.

Hormona marcada radiactivamente: El antígeno o ligante marcado debe ser de alta pureza, debe estar marcado radioactivamente sin perder su inmunorreactividad. El trazador más frecuentemente utilizado es el I125 por su vida media de 60 días y por su mayor actividad específica. La marcación con I125 se hace generalmente con cloramina T o lactoperoxidasa.

Anticuerpo específico: es un anticuerpo obtenido gracias a inyecciones repetidas del antígeno en animales. Lo más importante de un anticuerpo es que sea específico para su interacción con el antígeno, esto es lo que se denomina afinidad. De igual manera se define avidéz como la fuerza de la unión del complejo antígeno anticuerpo. Las pequeñas moléculas que son poco antigénicas son inyectadas en el animal con adyuvante para producir una reacción inflamatoria local lo cual origina anticuerpos de buena calidad. Estos adyuvantes son generalmente proteínas esmulsificadas en un aceite.

La unión de antígeno con el anticuerpo, principio básico del radioinmunoanálisis, mide antigenicidad y no actividad biológica. La cantidad de anticuerpo que se utiliza en un RIA es aquella en la cual el anticuerpo sea copado por el 50% del antígeno marcado radiactivamente de tal forma que la relación unido-antígeno libre (B/F) sea 1:1.

Muestra del paciente: la cual es realmente el antígeno no marcado que será medido en el suero o plasma y en análogo o idéntico al antígeno estándar ya mencionado.

Procesos básicos del RIA.

La reacción del RIA

La hormona marcada y la no marcada compiten

entre sí para unirse al anticuerpo hasta alcanzar el equilibrio entre ambos ligantes y el anticuerpo (o unidor). La sensibilidad obtenida en el RIA depende de la especificidad del anticuerpo tanto como de la antigenicidad del antígeno, lo cual es expresado en la constante de equilibrio o constante de afinidad que representa la energía de la reacción antígeno-anticuerpo. A partir de esta reacción puede determinarse la radioactividad presente en concentraciones conocidas diferentes del estándar para establecer una curva estándar, lo cual permitirá, por extrapolación, determinar cantidades desconocidas de la misma sustancia. (figura 1)

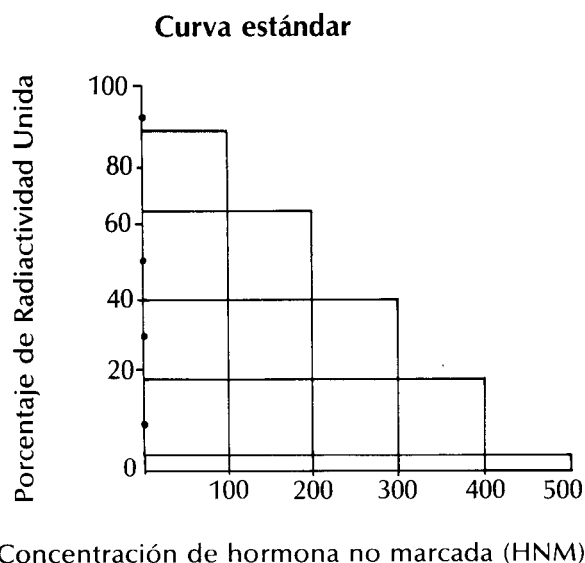
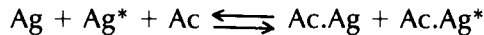


FIGURA 1. Representación esquemática del principio de RIA. Nótese que cuando la concentración de hormona no marcada es cero la radioactividad unida al anticuerpo es total. A medida que aumenta la concentración de la hormona no marcada la radioactividad disminuye. Una vez obtenida una curva de estándares se puede determinar las cantidades de muestras desconocidas por extrapolación.

El proceso de incubación

Tiene una duración que varía entre 2 y 24 horas dependiendo del anticuerpo utilizado y tiene como finalidad que se establezca un estado de equilibrio entre la hormona marcada y la no marcada en su unión con el anticuerpo. Las temperaturas de incubación varían también de acuerdo con el

método empleado entre 4°C y la temperatura ambiental. La reacción de equilibrio, entre el antígeno libre no marcado, el antígeno libre marcado, el anticuerpo libre y las fracciones de estas hormonas unidas al anticuerpo, la cual es obtenida con la incubación, se expresa:



Donde Ag* es la hormona marcada radioactivamente y Ac es el anticuerpo.

Separación de la hormona libre de la unida.

Existen muchos métodos para separar la hormona libre de la unida al anticuerpo tales como migración diferencial, precipitación de la forma unida utilizando un segundo anticuerpo o por adsorción de la hormona libre utilizando carbón, resina o tubos de polipropileno. El mejor método de separación debe ser aquel que con menor esfuerzo mantenga una máxima sensibilidad y debe ser seleccionado como el mejor al probar varias técnicas.

Medición de la radiactividad

La radiactividad de la hormona marcada libre o de la unida al anticuerpo, es medida en contadores gamma si se trata de sustancias que emiten rayos gama como el I125. Los contadores de centello líquido se utilizan cuando la sustancia emite partículas Beta como el H³ o el C¹⁴.

El conteo de las radiaciones de los tubos procesados se expresa en cuentas por minuto y previa sustracción de la unión no específica se convierte a porcentaje de la radiactividad unida al anticuerpo por medio de la fórmula:

$$\frac{\text{Cuentas de la muestra}}{\text{Cuentas totales}} \times 100 = \text{Porcentaje de radiactividad unida al anticuerpo.}$$

Donde, cuentas totales es la cantidad de radiactividad unida al anticuerpo cuando no se le ha agregado hormona no marcada. Este porcentaje de radiactividad unido a anticuerpo es entonces extrapolado en la curva de estándares también conocida como curva dosis-respuesta para determinar en la abscisa la cantidad de hormona de la muestra desconocida. (figura 1.)

Análisis de los datos

Existen diferentes métodos para elaborar la curva

de dosis-respuesta o curva de estándares, los cuales persiguen incrementar la sensibilidad, la exactitud y la precisión de las dosificaciones.

La manipulación de estos ejes de coordenadas puede hacerse mediante transformaciones de la curva por medio de su linearización, por logaritmos y otros métodos.

Una vez obtenidos los resultados por medio del método considerado más válido debe establecerse cuan confiables son utilizando un adecuado control de calidad.

El control de calidad establece:

La sensibilidad: que es determinar la cantidad más pequeña que puede ser medida de una sustancia.

La precisión: que consiste en determinar la reproducibilidad del RIA.

La exactitud: que es la correspondencia entre lo medido y la cantidad real.

La especificidad: es la posibilidad de determinar solo una sustancia y no otras conjuntamente.

Como puede verse de lo anterior, no se trata solamente de obtener un resultado de buena calidad sino también de comprobar que es de buena calidad y corregir los errores que puedan presentarse.

Rangos de normalidad

El establecimiento de los rangos de normalidad por parte del laboratorio, si bien puede determinar la toma de decisiones arbitrarias es algo necesario para poder comparar los resultados obtenidos en cada paciente y poder definir la conducta que debe seguirse con éste de acuerdo con la normalidad o anormalidad encontradas en aquellos. Los rangos de normalidad deben tomarse en grupos de personas saludables, teniendo en cuenta diferentes factores tales como escogencia al azar, edad, vida física, variaciones circadianas, efectos de la postura, etc.

Uno de los métodos de establecer el rango de normalidad de una hormona consiste en determinar la media y la desviación estándar de los resultados de la muestra y de establecer como límite de confianza 2 o 3 desviaciones estándares hacia ambas colas de la distribución.

Otro método más adecuado consiste en establecer los percentiles 5 y 95, previa normalización y obtención del gaussianismo de la distribución, lo cual se acerca más a la realidad³.

Tiempo de conteo:

El número de desintegraciones nucleares detectadas por un instrumento de detección nuclear se expresa como cuentas o como tasas de cuentas, esta última se refiere al número de cuentas por unidad de tiempo, generalmente cuentas por minuto. Estas cuentas son detectadas electrónicamente y representan la actividad o sea las desintegraciones nucleares que ocurren en la muestra radiactiva.

Al estar frente a unas muestras procesadas por RIA a las cuales hay que contar radiactivamente, debe determinarse el número de cuentas, el tiempo de conteo y el nivel de confiabilidad que ofrezcan un resultado de alta calidad.

Para obtener esta información es necesario revisar brevemente algunos conceptos:

El "background" o conteo de fondo: es la radiación que se encuentra en el equipo de conteo, aunque puede ser también radiación cósmica o sólo ser ruido electrónico presente en el sistema. Al medir una muestra cualquiera el aparato no sólo detecta la radiactividad de ésta sino también el "background" o conteo de fondo.

La desviación estándar fraccional o coeficiente de variación de la muestra: es el intervalo de confianza que expresa la posibilidad en porcentaje de que un conteo determinado se encuentre dentro de un rango establecido. La desviación estándar fraccional se obtiene dividiendo la desviación estándar de un conteo sobre la media, o sea las cuentas netas de una muestra.

Debe aclararse que el conteo de un radioisótopo producido por un contador de radiaciones sigue una distribución conocida como de Poisson, la cual tiene como características muy importantes que la variable solo asume números íntegros en la distribución de frecuencias y que la desviación estándar es igual a la raíz cuadrada de la media. Por lo tanto, la desviación estándar fraccional de las cuentas de una muestra será:

$$S = \frac{\sqrt{N}}{N}$$

en donde,

N es el número de cuentas de la muestra o la medida de varias cuentas y \sqrt{N} es la desviación estándar de la muestra por venir de una distribución de Poisson.

La tasa de conteo neto (Rn): se define como la diferencia entre el conteo total bruto (Rg) menos el conteo de fondo o "background" (Pb). Como el conteo de fondo puede haberse hecho utilizando un lapso diferente al del conteo total bruto entonces, la tasa de cuentas neta será:

$$Rn = Ng/tg - Nb/tb$$

donde,

N es el total de cuentas acumuladas en cada caso y t son los diferentes lapsos empleados.

No debe olvidarse que $Rg = Ng/tg$ y que $Rb = Nb/tb$.

El tiempo ideal de conteo de una muestra es aquel que permite tener una desviación estándar fraccional de 0.01, sin embargo, esto no siempre es posible de obtener por lo prolongado que se haría el tiempo de conteo, por lo cual se busca un tiempo de conteo que permita una desviación estándar fraccional entre 0.01 y 0.02.

Al tomar la decisión práctica de definir el tiempo de conteo de una muestra se debe tomar una duración de conteo suficiente para tratar de obtener al menos entre 2.500 y 3.000 cuentas netas totales por encima del conteo de fondo o "background". Esto nos permitirá obtener una desviación estándar fraccional de 0.02 ya que:

$$\frac{\sqrt{2.500}}{2.500} = 0.02$$

Para determinar el tiempo de conteo de una muestra para una desviación estándar fraccional dada, es útil la siguiente fórmula:

$$t = \frac{Rg + Rb}{S^2f (Rg - Rb)^2}$$

Como generalmente Rb es menor de 80 y Rg es mayor de 500 la fórmula anterior se aproxima de la siguiente manera:

$$t = \frac{1}{S^2 fRg}$$

donde,

Sf es la desviación estándar fraccional también conocida como error fraccional.

En aquellos casos en los cuales existe un conteo neto de la muestra bajo y un conteo de fondo elevado deberá utilizarse la fórmula:

Desviación estándar fraccional deseada =

$$\sqrt{\frac{\frac{Rg}{tg} + \frac{Rb}{tb}}{Rg - Rb}}$$

Por alguna manipulación matemática puede obtenerse la relación:

$$\frac{tg}{tb} = \sqrt{\frac{Rg}{Rb}}$$

de donde,

$$tb = \sqrt{\frac{tg}{\frac{Rg}{Rb}}}$$

Con lo cual se puede sustituir hasta despejar tg. Debe recordarse que Rg y Rb son expresadas en cuentas por minuto y representan al conteo de la muestra y el fondo durante sus respectivos lapsos de conteo y que tg es el nuevo lapso en minutos que deberá ser contada la muestra para obtener una desviación estándar fraccional determinada, sea esta de 0.01 y 0.02.

Para mayor información acerca de este tópico debe revisarse bibliografía adicional⁴.

X² (chi cuadrado): aun cuando se tenga la confianza de que las cuentas acumuladas son suficientes para asegurar validez estadística, de debe utilizar esta prueba para determinar si el contador cuenta adecuadamente. El X²(chi cuadrado) nos da los medios para evaluar un grupo particular de mediciones. Si las mediciones se ajustan a una distribución determinada se puede concluir que el contador de radiaciones gama trabaja de la forma esperada.

El rango de normalidad usualmente aceptado fluctúa entre 0.2 y 0.8 aunque lo ideal es 0.5 o más.

Si la posibilidad calculada cae fuera del índice del rango deseado no se podrá concluir que las muestras siguen la esperada distribución normal.

La fórmula del X²(chi cuadrado) es la siguiente:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(X_i - \bar{X})^2}{\bar{X}}$$

donde,

\bar{X} es el promedio de las cuentas (la medida), X_i son los diferentes valores en cuentas por minuto tomados cada vez, n es el número de veces de contada la muestra.

El valor del X²(chi cuadrado) obtenido se compara en una tabla de X²(chi cuadrado) teniendo en cuenta el número de grados de libertad que no es otra cosa que el número de observaciones menos 1. (Tabla 1)

Análisis de la curva dosis-respuesta

Alternativas de expresión

El objetivo de laboratorio de RIA es determinar, de una manera confiable, la concentración de la sustancia bajo estudio en la muestra tomada al paciente. El método utilizado es una modificación de un procedimiento fundamental en química que consiste en establecer una curva estándar. A partir de concentraciones conocidas del material sometido a estudio se establecen puntos estándares de referencia, con los cuales se puede hacer una curva continua que pase a través de todos ellos y utilizarla para determinar las concentraciones reales de los pacientes.

En el RIA la curva dosis-respuesta (Curva estándar) representa la relación entre el grado de unión de la hormona marcada con el anticuerpo (antisuero) que puede ser medida radiactivamente y la concentración conocida de la hormona (estándar).

Existen varias alternativas para expresión gráfica de la curva dosis respuesta (5):

- I. Porcentaje de radiactividad unida al antisuero (U) / radiactividad total (CT) vs. la concentración del estándar (STD) en escala aritmética o logarítmica.
- II. Porcentaje de U / la radiactividad libre (L) vs. la concentración del estándar (STD) en escala aritmética o logarítmica.

TABLA 1. Valores del X² (chi cuadrado)

| Grados de libertad | Probabilidad | | | | | | |
|--------------------|--------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 0.99 | 0.95 | 0.90 | 0.50 | 0.10 | 0.05 | 0.01 |
| 3 | 0.020 | 0.103 | 0.211 | 1.386 | 4.605 | 5.991 | 9.210 |
| 4 | 0.115 | 0.352 | 0.584 | 2.366 | 6.251 | 7.815 | 11.345 |
| 5 | 0.297 | 0.711 | 1.064 | 3.357 | 7.779 | 9.488 | 13.277 |
| 6 | 0.554 | 1.145 | 1.610 | 4.351 | 9.236 | 11.070 | 15.086 |
| 7 | 0.872 | 1.635 | 2.204 | 5.348 | 10.645 | 12.592 | 16.812 |
| 8 | 1.239 | 2.167 | 2.833 | 6.346 | 12.645 | 14.067 | 18.475 |
| 9 | 1.646 | 2.733 | 3.490 | 7.344 | 13.362 | 15.507 | 20.090 |
| 10 | 2.088 | 3.325 | 4.168 | 8.343 | 14.684 | 16.919 | 21.666 |
| 11 | 2.558 | 3.940 | 4.865 | 9.342 | 15.987 | 18.307 | 23.209 |
| 12 | 3.053 | 4.575 | 5.578 | 10.341 | 17.275 | 19.675 | 24.725 |
| 13 | 3.571 | 5.226 | 6.304 | 11.340 | 18.549 | 21.026 | 26.217 |
| 14 | 4.107 | 5.892 | 7.042 | 12.340 | 19.812 | 22.362 | 27.688 |
| 15 | 4.660 | 6.571 | 7.790 | 13.339 | 21.064 | 23.685 | 29.141 |
| 16 | 5.229 | 7.261 | 8.547 | 14.339 | 22.307 | 24.996 | 30.578 |
| 17 | 5.812 | 7.962 | 9.312 | 15.338 | 23.542 | 26.296 | 32.000 |
| 18 | 6.408 | 8.672 | 10.085 | 16.338 | 24.769 | 27.587 | 33.409 |
| 19 | 7.015 | 9.390 | 10.865 | 17.338 | 25.989 | 28.869 | 34.805 |
| 20 | 7.633 | 10.117 | 11.651 | 18.338 | 27.204 | 30.144 | 36.191 |
| 21 | 8.260 | 10.851 | 12.443 | 19.337 | 28.412 | 31.410 | 37.566 |
| 22 | 8.897 | 11.591 | 13.240 | 20.337 | 29.615 | 32.671 | 38.932 |
| 23 | 9.542 | 12.338 | 14.041 | 21.337 | 30.813 | 33.924 | 40.289 |
| 24 | 10.196 | 13.091 | 14.848 | 22.337 | 32.007 | 35.172 | 41.638 |
| 25 | 10.856 | 13.848 | 15.659 | 23.337 | 33.196 | 36.415 | 42.980 |
| 26 | 11.524 | 14.611 | 16.473 | 24.337 | 34.382 | 37.382 | 44.314 |
| 27 | 12.198 | 15.379 | 17.292 | 25.336 | 35.563 | 38.885 | 45.642 |
| 28 | 12.879 | 16.151 | 18.114 | 26.336 | 36.741 | 40.115 | 46.963 |
| 29 | 13.565 | 16.928 | 18.939 | 27.336 | 37.916 | 41.337 | 48.278 |
| 30 | 14.256 | 17.708 | 19.768 | 28.336 | 39.087 | 42.557 | 49.588 |

III. Porcentaje de L / U vs. la concentración del estándar (STD) en escala aritmética o logarítmica.

IV. Porcentaje de U / la radiactividad unida al antisuero en ausencia de estándar (U_o) vs. la concentración del estándar (STD) en escala aritmética o logarítmica.

V. Transformación logit (logit de U / U_o) vs. logaritmo natural o decimal de la concentración del estándar (STD).

VI. Análisis de cuatro parámetros en el cual los valores de U_o, pendiente, intercepto al 50% y unión no específica (UNE) son considerados en la representación de la curva dosis respuesta. Las expresiones gráficas que utilizaremos aquí son la V y la VI.

Transformación logit-log.

La linearización de la curva de dosis-respuesta facilita el procesamiento de datos. El método más utilizado y uno de los más prácticos es el introducido por Rodbard⁶ denominado transformación logit-log. Su importancia radica en que evita que aspectos subjetivos del laboratorista influyan en el trazado de la curva. La expresión gráfica requiere un eje de coordenadas en donde la radiactividad está en la ordenada que se designa como Y que se calcula como porcentaje de unión U / U_o.

para luego obtener su transformación logit (logit Y = Y') y la dosis está en la abscisa y se designa como X calculándose como su logaritmo decimal.

$$X = \log_{10} \text{ dosis. } Y = \frac{100(U-UNE)}{U_o - UNE} \quad (\text{Ecuación 1})$$

en donde,

UNE son los tubos que contienen la hormona marcada en ausencia de antisuero y estándar y que se miden después de haber sido procesados con todos los demás tubos del ensayo.

luego se obtienen logit Y (Y') que es igual a:

$$Y' = \text{Log}_n \left[\frac{Y}{100-Y} \right] \quad (\text{Ecuación 2})$$

A manera de ejemplo práctico, hagamos, paso a paso, todo el procedimiento de expresión de la curva estándar.

Una vez que han sido procesados y contados los estándares (STD) con sus respectivas réplicas se obtienen una serie de datos como se expresa en la tabla 2.

TABLA 2. Transformación logit-log de la curva estándar dosis-respuesta

| D = Dosis del estándar | U = CPM Unidas | X = Log ₁₀ D | X ² | Y = 100x $\frac{U-UNE}{U_o-UNE}$ | Y' = Logit Y = Log _e x $\frac{Y}{100 - Y}$ | Y _{ti} = Suma de Y' para cada dosis determinada | (Y') ² | XY' |
|------------------------------|----------------------|----------------------------|-----------------|--|--|--|-------------------|------|
| STD 1 | | | | | | Y' ₁ + Y' | | |
| STD 2 | | | | | | Y' ₂ v Y' ₂ | | |
| STD 3 | | | | | | Y' ₃ + Y' ₃ | | |
| STD 4 | | | | | | Y' ₄ + Y' ₄ | | |
| STD 5 | | | | | | Y' ₅ + Y' ₅ | | |
| | | ΣX | ΣX ² | ΣY | ΣY' | | ΣY' ² | ΣXY' |

En cada dosis del estándar, el número de réplicas se expresa como m que en este caso m = 2.

k es el número de dosis diferentes del estándar, en este caso k = 5.

n es el número de datos, n = km = 10.

Una vez se han obtenido estos valores se procede a hacer un gráfico en papel milimetrado la curva estándar extrapolando los valores de las dosis estándar colocando en la ordenada los logit Y y en la abscisa los valores de X.

Validación de la curva dosis respuesta linearizada

Al obtener la linearización de la curva por el método logit-log se procede al demostrar su linealidad. Para ello debe calcularse, en primer término, los coeficientes de regresión de la recta para obtener el valor de la pendiente que se designa como b y el valor del intercepto al origen que se designa como a.⁵

Para obtener b, se utiliza la fórmula:

$$b = \frac{\sum xy}{\sum x^2} \quad (\text{Ecuación 3})$$

en donde, $\sum xy = \sum XY' - \frac{(\sum X)(\sum Y')}{n}$
(Ecuación 4)

$$\sum X^2 = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Para obtener a se utiliza la fórmula:

$$a = \bar{Y} - b\bar{X} \quad (\text{Ecuación 6})$$

en donde,

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y'}{n} \quad \text{y} \quad \bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

Por lo tanto, para obtener el valor de la pendiente (b) y del intercepto (a) se requiere el cálculo y desarrollo de las ecuaciones de los coeficientes de regresión de la curva estándar dosis-respuesta como acabamos de ver.

El valor de b es, teóricamente, una constante igual a -2.303 en circunstancias ideales, o sea,

cuando el ligante marcado y el estándar tiene idéntica afinidad con el anticuerpo y este a su vez presenta idéntica avidéz por ambos ligantes y el sistema se encuentra en equilibrio⁷. Sin embargo, en la práctica se aceptan los valores comprendidos en el rango -2.303 ± 0.156 , es decir, entre -2.147 y -2.459. No debe olvidarse, aunque parezca elemental, que la pendiente es el ángulo que forma la curva linearizada con la horizontal o abscisa.

Si la dosis es expresada en log_e dosis, entonces la pendiente será igual a 1.

De otra parte, el intercepto al origen (a) es el punto en el cual la línea de regresión intercepta a la ordenada⁵.

Una vez que se han obtenido los valores de b y de a, se calculan los valores de S_{yx} y de F. El valor de S_{yx} describe la dispersión o error estándar de las estimaciones individuales alrededor de la línea de regresión al mejor ajuste de la línea recta.

Para obtener las dispersiones de (x) y de (y) empleamos la fórmula:

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n-1}}$$

en donde, X² es igual a la fórmula vista en el párrafo anterior.

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum y^2}{n-1}} \quad \text{en donde,}$$

$$\sum y^2 = \sum Y'^2 - \frac{(\sum Y')^2}{n} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Para obtener S_{yx} se emplea la fórmula:

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - (\sum xy) / \sum x^2}{n-2}} \quad (\text{Ecuación 8})$$

No olvidemos que n = k.m.

Un valor de S_{yx} menor 0.23 confiere validez a la curva dosis-respuesta desde el punto de vista de precisión.

Hasta ahora hemos visto que para la validación de la curva dosis-respuesta contamos con varios

critérios, siendo el primero de ellos que la pendiente se encuentre entre -2.147 y -2.459 lo cual es un estimativo de especificidad. Adicionalmente, la reproducibilidad del valor de b en una serie de RIAs es un parámetro muy importante en el control de calidad y que hace referencia directa a la precisión del RIA.

De igual manera otro criterio de validez de la curva estándar, en cuanto a precisión se refiere, es obtener un valor de S_{yx} menor de 0.23.

Sin embargo, es de mucha importancia obtener la evaluación estadística de la linealidad de la curva, lo cual puede obtenerse por diferentes métodos tales como la prueba del X^2 (chi cuadrado), el coeficiente de correlación, la prueba t, la prueba de los cuadrados mínimos o la prueba F de Dixon y Massey⁸ de la cual trataremos y que consiste en el cálculo de la relación de la varianza de las desviaciones de las respuestas medias al mejor ajuste de la línea de regresión (variación entre grupos) y la varianza de las réplicas dentro de la dosis (variación dentro de grupos)⁵.

El valor de F se obtiene:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (\text{Ecuación 9})$$

en donde S_1^2 = Varianza entre grupos y S_2^2 = Varianza dentro de grupos.

$$S_1^2 = \frac{YT/m - n(\bar{Y})^2 - (\sum xy)^2/\sum x^2}{n - k}$$

(Ecuación 10)

en donde,

$YT = \sum Y_i^2$ o sea la suma de Y' para cada dosis determinada (ver tabla 2). Todos los demás parámetros han sido mostrados en los párrafos anteriores.

$$S_2^2 = \frac{\sum y^2 + n(Y)^2 - YT/m}{k - 2} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Una vez obtenidos S_1^2 y S_2^2 se saca la

$$F \text{ calculada} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

y el valor obtenido se compara en las tablas de F tabulado al 95% de los límites de confianza (ver tabla 3) utilizando como grados de libertad $n - k$ para el denominador y $k - 2$ para el numerador lo cual se expresa: $(n-k, k-2)$. Si el valor obtenido de F es menor al tabulado al 95% de los límites de confianza, la diferencia entre las varianzas no es significativa, y por lo tanto la línea de regresión se puede considerar lineal.

Cálculo de muestras desconocidas

Una vez se haya valorado estadísticamente la curva estándar linealizada y aceptado como válida se procederá a calcular las muestras desconocidas utilizando los coeficientes de regresión de la curva linealizada a y b. Para ello, se calculará la concentración de hormona o dosis presente en el tubo de ensayo (X_e) utilizando la fórmula:

$$X_e = \text{antilogaritmo} \left[\frac{\text{logit } Y - a}{b} \right] \quad (\text{Ecuación 12})$$

Luego se calculará la concentración de la hormona en la unidad de volumen que se utilizará para expresarla (ml o dl) lo cual se denomina X_t y se expresa por la fórmula:

$$X_t = \frac{\text{Vol} \times X_e}{Q_a} \quad (\text{Ecuación 13})$$

donde, Vol. es la unidad de volumen y Q_a es la alicuota de la muestra empleada en cada tubo de ensayo.

Ocasionalmente Q_a puede también expresar a la alicuota del extracto resuspendido en *buffer* cuando se utiliza el método de extracción; a partir de la unidad de volumen (1 ml) de líquido biológico para el análisis expresado en porcentaje. Si, por ejemplo, se toma la unidad de volumen (1 ml.) de líquido biológico y se reseca y se resuspende en 0.6 ml. de *buffer* y de ello se utiliza para el análisis una alicuota de 0.2 ml tendremos que:

$$Q_a = \frac{0.2}{0.6} \times 100 = 33,33\%$$

entonces, X_t en estos casos se expresa:

$$X_t = \frac{100 \cdot X_e}{Q_a\%} \quad (\text{Ecuación 14})$$

TABLA 3. Valores de F al 95% de confianza

| | | k - 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Grados de libertad del numerador | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 12 | 15 | 20 | 30 | 60 | 120 | x |
| Grados de libertad del denominador | 1 | 161.4 | 129.5 | 215.7 | 224.6 | 230.2 | 234.0 | 236.8 | 238.9 | 240.5 | 241.9 | 243.9 | 245.9 | 248.0 | 250.1 | 252.2 | 253.3 | 254.3 |
| | 2 | 18.51 | 19.00 | 19.16 | 19.25 | 19.30 | 19.33 | 19.35 | 19.37 | 19.38 | 19.40 | 19.41 | 19.43 | 19.45 | 19.46 | 19.48 | 19.49 | 19.50 |
| | 3 | 10.13 | 9.55 | 9.28 | 9.12 | 9.01 | 8.94 | 8.89 | 8.85 | 8.81 | 8.79 | 8.74 | 8.70 | 8.66 | 8.62 | 8.57 | 8.55 | 8.53 |
| | 4 | 7.71 | 6.94 | 6.59 | 6.39 | 6.26 | 6.16 | 6.09 | 6.04 | 6.00 | 5.96 | 5.91 | 5.86 | 5.80 | 5.75 | 5.69 | 5.66 | 5.63 |
| | 5 | 6.61 | 5.79 | 5.41 | 5.19 | 5.05 | 4.95 | 4.88 | 4.82 | 4.77 | 4.74 | 4.68 | 4.62 | 4.56 | 4.50 | 4.43 | 4.40 | 4.36 |
| | 6 | 5.99 | 5.14 | 4.76 | 4.53 | 4.39 | 4.28 | 4.21 | 4.15 | 4.10 | 4.06 | 4.00 | 3.94 | 3.87 | 3.81 | 3.74 | 3.70 | 3.67 |
| | 7 | 5.59 | 4.74 | 4.35 | 4.12 | 3.97 | 3.87 | 3.79 | 3.73 | 3.68 | 3.64 | 3.57 | 3.51 | 3.44 | 3.38 | 3.30 | 3.27 | 3.23 |
| | 8 | 5.32 | 4.46 | 4.07 | 3.84 | 3.69 | 3.58 | 3.50 | 3.44 | 3.39 | 3.35 | 3.28 | 3.22 | 3.15 | 3.08 | 3.01 | 2.97 | 2.93 |
| | 9 | 5.12 | 4.26 | 3.86 | 3.63 | 3.48 | 3.37 | 3.29 | 3.23 | 3.18 | 3.14 | 3.07 | 3.01 | 2.94 | 2.86 | 2.79 | 2.75 | 2.71 |
| | 10 | 4.96 | 4.10 | 3.71 | 3.48 | 3.33 | 3.22 | 3.14 | 3.07 | 3.02 | 2.98 | 2.91 | 2.85 | 2.77 | 2.70 | 2.62 | 2.58 | 2.54 |
| | 11 | 4.84 | 3.96 | 3.59 | 3.36 | 3.20 | 3.09 | 3.01 | 2.95 | 2.90 | 2.85 | 2.79 | 2.72 | 2.65 | 2.57 | 2.49 | 2.45 | 2.40 |
| | 12 | 4.75 | 3.89 | 3.49 | 3.26 | 3.11 | 3.00 | 2.91 | 2.85 | 2.80 | 2.75 | 2.69 | 2.62 | 2.54 | 2.47 | 2.38 | 2.34 | 2.30 |
| | 13 | 4.67 | 3.81 | 3.41 | 3.18 | 3.03 | 2.92 | 2.83 | 2.77 | 2.71 | 2.67 | 2.60 | 2.53 | 2.45 | 2.38 | 2.30 | 2.25 | 2.21 |
| | 14 | 4.60 | 3.74 | 3.34 | 3.11 | 2.96 | 2.85 | 2.76 | 2.70 | 2.65 | 2.60 | 2.53 | 2.46 | 2.39 | 2.31 | 2.22 | 2.18 | 2.13 |
| | 15 | 4.54 | 3.68 | 3.29 | 3.06 | 2.90 | 2.79 | 2.71 | 2.64 | 2.59 | 2.54 | 2.48 | 2.40 | 2.33 | 2.25 | 2.16 | 2.11 | 2.07 |
| | 16 | 4.49 | 3.63 | 3.24 | 3.01 | 2.85 | 2.74 | 2.66 | 2.59 | 2.54 | 2.49 | 2.42 | 2.35 | 2.28 | 2.19 | 2.11 | 2.06 | 2.01 |
| | 17 | 4.45 | 3.59 | 3.20 | 2.96 | 2.81 | 2.70 | 2.61 | 2.55 | 2.49 | 2.45 | 2.38 | 2.31 | 2.23 | 2.15 | 2.06 | 2.01 | 1.36 |
| | 18 | 4.41 | 3.55 | 3.16 | 2.93 | 2.77 | 2.66 | 2.58 | 2.51 | 2.46 | 2.41 | 2.34 | 2.27 | 2.19 | 2.11 | 2.02 | 1.97 | 1.92 |
| | 19 | 4.38 | 3.52 | 3.13 | 2.90 | 2.74 | 2.63 | 2.54 | 2.48 | 2.42 | 2.38 | 2.31 | 2.23 | 2.16 | 2.07 | 1.98 | 1.93 | 1.88 |
| | 20 | 4.35 | 3.49 | 3.10 | 2.87 | 2.71 | 2.60 | 2.51 | 2.45 | 2.39 | 2.35 | 2.28 | 2.20 | 2.12 | 2.04 | 1.95 | 1.90 | 1.84 |
| | 21 | 4.32 | 3.47 | 3.07 | 2.84 | 2.68 | 2.57 | 2.49 | 2.42 | 2.37 | 2.32 | 2.25 | 2.18 | 2.10 | 2.01 | 1.92 | 1.87 | 1.81 |
| | 22 | 4.30 | 3.44 | 3.05 | 2.82 | 2.66 | 2.55 | 2.46 | 2.40 | 2.34 | 2.30 | 2.23 | 2.15 | 2.07 | 1.98 | 1.89 | 1.84 | 1.78 |
| | 23 | 4.28 | 3.42 | 3.03 | 2.80 | 2.64 | 2.53 | 2.44 | 2.37 | 2.32 | 2.27 | 2.20 | 2.13 | 2.05 | 1.96 | 1.86 | 1.81 | 1.76 |
| | 24 | 4.25 | 3.40 | 3.01 | 2.78 | 2.62 | 2.51 | 2.42 | 2.36 | 2.30 | 2.25 | 2.18 | 2.11 | 2.03 | 1.94 | 1.84 | 1.79 | 1.73 |
| | 25 | 4.24 | 3.39 | 2.99 | 2.76 | 2.60 | 2.49 | 2.40 | 2.34 | 2.28 | 2.24 | 2.16 | 2.09 | 2.01 | 1.92 | 1.82 | 1.77 | 1.71 |
| 26 | 4.23 | 3.37 | 2.98 | 2.74 | 2.59 | 2.47 | 2.39 | 2.32 | 2.27 | 2.22 | 2.15 | 2.07 | 1.99 | 1.90 | 1.80 | 1.75 | 1.69 | |
| 27 | 4.21 | 3.35 | 2.96 | 2.73 | 2.57 | 2.46 | 2.37 | 2.31 | 2.25 | 2.20 | 2.13 | 2.06 | 1.97 | 1.88 | 1.79 | 1.73 | 1.67 | |
| 28 | 4.20 | 3.34 | 2.95 | 2.71 | 2.56 | 2.45 | 2.36 | 2.29 | 2.24 | 2.19 | 2.12 | 2.04 | 1.96 | 1.87 | 1.77 | 1.71 | 1.65 | |
| 29 | 4.18 | 3.33 | 2.93 | 2.70 | 2.55 | 2.43 | 2.35 | 2.28 | 2.22 | 2.18 | 2.10 | 2.03 | 1.94 | 1.85 | 1.75 | 1.70 | 1.64 | |
| 30 | 4.17 | 3.32 | 2.92 | 2.69 | 2.53 | 2.42 | 2.33 | 2.27 | 2.21 | 2.16 | 2.09 | 2.01 | 1.93 | 1.84 | 1.74 | 1.68 | 1.62 | |
| 40 | 4.08 | 3.23 | 2.84 | 2.61 | 2.45 | 2.34 | 2.25 | 2.18 | 2.12 | 2.08 | 2.00 | 1.92 | 1.84 | 1.74 | 1.64 | 1.58 | 1.51 | |
| 60 | 4.00 | 3.15 | 2.76 | 2.53 | 2.37 | 2.25 | 2.17 | 2.10 | 2.04 | 1.99 | 1.92 | 1.84 | 1.75 | 1.65 | 1.53 | 1.47 | 1.39 | |
| 120 | 3.92 | 3.07 | 2.68 | 2.45 | 2.29 | 2.17 | 2.09 | 2.02 | 1.96 | 1.91 | 1.83 | 1.75 | 1.68 | 1.55 | 1.43 | 1.35 | 1.25 | |
| x | 3.84 | 3.00 | 2.60 | 2.37 | 2.21 | 2.10 | 2.01 | 1.94 | 1.88 | 1.83 | 1.75 | 1.67 | 1.57 | 1.46 | 1.32 | 1.22 | 1.00 | |

n = número de datos = K.M
 k = número de dosis diferentes
 m = número de réplicas en cada dosis.

Cuando en el método empleado se conoce el porcentaje de recuperación de la hormona estudiada entonces se determinará la concentración de la hormona presente en la unidad de volumen corregida que se denomina por la fórmula:

$$X_t \text{ corregido} = \frac{X_t \cdot 100}{\% \text{ de recuperación}} \quad (\text{Ecuación 15})$$

Modelo logístico de los cuatro parámetros

Es un método para expresar la curva dosis-respuesta propuesto por Rodbard⁹ que puede ser escrito como:

$$Y = (a - d) / \left[1 + (X/c)^b \right] + d \quad (\text{Ecuación 16}).$$

donde: Y = Respuesta
 X = Dosis
 a = Respuesta esperada cuando x = 0 o U₀
 b = Factor pendiente o exponente
 c = ED50, ID50 o punto medio, cuando Y = (a+d)/2
 d = Valor esperado cuando X = "infinito" o UNE.

Se ha encontrado que el modelo de la ley de acción de masas conduce en la mayoría de los casos a la predicción de una relación linear logit-log; sin embargo, esto no ocurre en todos los casos. La heterogeneidad del anticuerpo (que está siendo subsanada por la producción de anticuerpos monoclonales) y otras complicaciones conducen a cambios menores en la pendiente y a un pequeño grado de asimetría. Para corregir estas alteraciones y brindar un poco de flexibilidad a la curva es que se le han agregado parámetros adicionales a este método.

La curva resultante es suavizada, sigmoide y simétrica cuando se mira en términos de Y versus log X. Esta ecuación es algebraicamente equivalente con la relación logit-log vista previamente.

La flexibilidad agregada al método logístico de los cuatro parámetros permite describir el 95% de todos los RIAs y cerca del 99% de aquellos RIAs "optimizados".

Valoración de la precisión de un ensayo

La precisión es la capacidad de obtener repetidamente el mismo resultado de una misma muestra. Una variación en los resultados de una misma muestra indica que la prueba es imprecisa. El RIA es menos preciso que las determinaciones químicas debido a los múltiples componentes de un ensayo, y a la complejidad de las curvas estándares y a los rangos de concentración utilizados.

Debido a la gran importancia que un resultado puede tener para el manejo de un paciente, el laboratorista debe ser muy consciente de los límites de confianza de sus resultados, tanto en términos de variación intraensayo como interensayo, lo cual debería ser informado con el reporte del resultado (10).

Relación respuesta-error (RRE)

La relación respuesta-error (RRE) es una medida de la precisión total del ensayo y representada la relación entre la magnitud de la respuesta o resultado y el error medio o dispersión obtenido en esa respuesta.

Para el cálculo de la RRE de un ensayo es necesario obtener inicialmente la media de las cuentas por minuto (CPM) de cada grupo de réplicas del ensayo, excluyendo los tubos de las cuentas totales, así como un error, que no es otra cosa que la dispersión entre las réplicas de un mismo grupo, el cual puede expresarse como la desviación estándar (S) o la varianza (S₂) de cada grupo de réplicas. En el caso de muestras procesadas por duplicado, la S se obtiene:

$$S = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{2}} \quad (\text{Ecuación 17})$$

donde,

X₁ y X₂ son los resultados expresados en CPM de cada duplicado en cada grupo.

Cuando las muestras son analizadas por triplicado o por un número mayor de réplicas, habrá primero que calcular la media de las réplicas de cada grupo y luego se calculará S:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (\text{Ecuación 18})$$

donde,

X es el valor individual de cada réplica, \bar{X} es la

media en cada grupo de muestras y n es el número de réplicas utilizadas.

Una vez obtenidos estos valores se procederá a hacer los gráficos colocando en la abscisa el valor promedio de cada grupo de réplicas en CPM y en la ordenada el respectivo valor del error correspondiente a cada grupo, con lo cual se representa la RRE de cada muestra individual.

Utilizando los valores de las gráficas es posible calcular y trazar la línea de regresión resultante. La relación entre el error y la media de las CPM de cada réplica representa la RRE de la muestra individual.

$$RRE = \frac{S}{\bar{X}_{CPM}} \quad (\text{Ecuación 19})$$

Después de obtener la RRE individual debe obtenerse la RRE del ensayo y la RRE acumulada.

La RRE del ensayo (RRE-E) nos mostrará la relación entre el error medio de todo el ensayo con la magnitud promedio de todas las respuestas del ensayo expresadas en cuentas por minuto. Para su determinación será necesario calcular la magnitud de la respuesta media, o sea el promedio de todas las cuentas por minuto \bar{CPM} obtenidas en el ensayo (excluyendo solo los tubos de las cuentas totales) y el error medio de la respuesta EMR, el cual se obtiene extrapolando al eje de ordenadas el valor promedio de las CPM después de haber obtenido la línea de regresión.

Para obtener la línea de regresión podemos utilizar una lineal o logarítmica o exponencial o la potencial.

Para la regresión lineal utilizaremos la fórmula:

$$Y = a + bX \quad (\text{Ecuación 20}).$$

Para la regresión logarítmica:

$$Y = a + b \log_n X \quad (\text{Ecuación 21}).$$

Para la regresión exponencial:

$$Y = ae^{bx} \text{ o } \log_n Y = \log_n a + bx \quad (\text{Ecuación 22}).$$

Y para la regresión potencial:

$$Y = aX^b \text{ o } \log_n Y = \log_n a + b \cdot \log_n X$$

(Ecuación 23).

donde, X es la respuesta en \bar{CPM} y Y la dispersión o error correspondiente a X.

“a” es el intercepto y “b” la pendiente.

Habitualmente se utiliza la línea de regresión lineal para obtener la RRE-E. Los otros tipos de regresión se dejan para ensayos especiales en donde no se obtiene un coeficiente de correlación lineal, aceptable.

Su utilización demanda el empleo de calculadoras refinadas o de computadores.

Por el contrario, la regresión lineal es muy sencilla y para calcular el intercepto (a) y la pendiente (b) podemos utilizar las ecuaciones 3 y 4 ya mencionadas.

$$a = \frac{\sum Y - b \sum X}{n} \quad (\text{Ecuación 24})$$

$$b = \frac{n \sum XY - \sum X \cdot \sum Y}{n \cdot \sum X^2 - (\sum X)^2} \quad (\text{Ecuación 25})$$

Y el coeficiente de correlación será:

$$r = \frac{n \sum XY - \sum X \cdot \sum Y}{\sqrt{\left[n \cdot \sum X^2 - (\sum X)^2 \right] \cdot \left[n \cdot \sum Y^2 - (\sum Y)^2 \right]}}$$

(Ecuación 26)

Desde un punto de vista práctico podemos decir entonces, que para obtener la relación respuesta error del ensayo (RRE-E), una vez que se ha corrido el ensayo, previa validación de la curva dosis-respuesta, deberá buscarse en cada grupo de réplicas su dispersión y facilitar la determinación de la RRE-E como puede verse en la tabla 4.

Al disponer de esta información y habiendo obtenido la línea de regresión podremos obtener la magnitud de la respuesta media (CPM) la cual será igual a:

$$\bar{CPM} = \frac{\sum \bar{X}}{n} \quad (\text{Ecuación 27})$$

En donde n = al número de grupos de tubos.

TABLA 4. Relación respuesta error individual (RRE) para obtener la relación respuesta error del ensayo (RRE-E). Deben excluirse en esta tabla las cuentas totales (CT).

| Réplicas (tubos) | X_1 CPM | X_2 CPM | $\sum X$ | $\bar{X} = \frac{\sum X}{m}$ | $\sum X^2$ | $Y = S$ $S = X_1 - X_2 / \sqrt{2}$ | $\sum XY$ | $\sum Y^2$ |
|------------------|--------------|--------------|----------|------------------------------|------------|---------------------------------------|-----------|------------|
| 1 - 2 | | | | | | | | |
| 3 - 4 | | | | | | | | |
| 5 - 6 | | | | | | | | |
| $X_{n-1} - X_n$ | | | | | | | | |
| Suma | | | $\sum X$ | $\sum \bar{X}$ | $\sum X^2$ | $\sum Y$ | $\sum XY$ | $\sum Y^2$ |

m = número de réplicas

Con base en el valor obtenido por la magnitud de la respuesta media CPM, que corresponderá a (X) en la fórmula de regresión, obtendremos "Y" despejando la "X" en la misma fórmula que equivale al error medio de la respuesta (EMR).

Para establecer el valor de la RRE-acumulada (RRE-A) que servirá como parámetro de precisión en cada RIA, se utiliza la siguiente fórmula a partir del segundo análisis⁵:

$$RRE-A = \sqrt{\frac{n (RRE-A \text{ hasta el análisis previo})^2 + (RRE-E \text{ último})^2}{n + 1}}$$

(Ecuación 28).

en donde n = número de análisis previos.

La RRE es una medida de precisión muy importante que permite rechazar resultados individuales y aun análisis completos que se encuentren por fuera de la precisión establecida.

Como criterio de aceptación de muestras individuales se utiliza el valor obtenido de la RREA del último análisis multiplicado por 2. Para aceptar el ensayo completo se fija como límite de precisión el valor de la RREA hasta el análisis previo.

El perfil de imprecisión

Es uno de los parámetros de mayor utilidad en el control de calidad interno de un ensayo y refleja la imprecisión con que se está midiendo una sustancia.

El perfil de imprecisión es la expresión gráfica de la relación entre las dosis y la imprecisión asociada con su medición.

En todo inmunoanálisis debe tenerse en cuenta que la imprecisión en la estimación de la cantidad de una sustancia varía de acuerdo con la concentración (dosis) de ésta. A menor dosis, mayor imprecisión y viceversa.

El perfil de imprecisión permite determinar la dosis a partir de la cual la curva dosis-respuesta tiene una precisión aceptable; permite determinar la precisión con la cual se ha medido una muestra desconocida; facilita indentificar muestras cuyo coeficiente de variación entre sus réplicas sea dos o tres veces mayor que el observado a la dosis correspondiente y considerar su posible rechazo, y evaluar el efecto que sobre la precisión del RIA pueda causar cualquier modificación que se introduzca en el proceso ya sea por cambio en los reactivos, bien métodos o personas.

Para calcular el perfil de imprecisión para cada dosis de la curva dosis respuesta se procede de la siguiente manera⁵:

- Hacer gráfico de la curva dosis-respuesta (estándar) logit Y vs. \log_{10} dosis.
- Calcular la RRE-E descrita previamente.
- Calcular la media de las CPM en cada dosis, y multiplicarlas por el valor de la RRE-E y posteriormente por dos (2), para obtener dos (2) desviaciones estándar. Una vez obtenido este valor, deberá sumarse y sustraerse de la medida de las CPM en cada dosis, calcular el valor de Y y obtener el logit-Y.
- Dibujar en la gráfica de la curva dosis-respuesta linealizada, las dos desviaciones estándar (± 2 DE) del valor del logit Y en cada dosis, obteniéndose así los límites que comprenden al 95% de los valores de la curva.
- Calcular el valor X_e correspondiente a los límites calculados al 95% de confianza, siendo X_e la extrapolación a la abscisa de los dos (2) valores logit Y (± 2 DE) en cada dosis.
- La diferencia entre estos dos valores X_e dividida entre cuatro, proporcionará la desviación estándar para cada dosis (S).
- Calcular el coeficiente de variación para cada dosis:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 29})$$

donde, S es la desviación estándar de X_e en cada dosis y \bar{X} es la media de las CPM en cada dosis.

- Hacer gráfico de los coeficientes de variación obtenidos para cada dosis de los estándares contra las dosis respectivas expresadas en log 10.

Sensibilidad teórica

Es la dosis mínima diferente de cero¹¹. Para determinar se utilizan los tubos U_0 , que son aquellos que contienen la radioactividad unida al anti-suero en ausencia de estándar.

La sensibilidad teórica se obtiene con la fórmula:

$$Y_{st} = 100 - \left[\frac{t \cdot CV}{\sqrt{J}} \right] \quad (\text{Ecuación 30})$$

en donde: Y_{st} = es la sensibilidad teórica en el 100% de unión.

t = valor de t tabulado para J-1 grados de libertad (al 95% de confianza).

CV = Coeficiente de variación de U_0 (en CPM).

J = Número de tubos U_0 .

Esta dosis mínima detectable generalmente cae en la región de la curva linealizada de baja confiabilidad ($>90\%$ de unión, o sea $\logit Y > + 2.2$), dando como resultado la generación de valores imprecisos y poco confiables⁵. Por tal motivo se recomienda aceptar como dosis mínima detectable (sensibilidad práctica) a aquella cuyo porcentaje de unión (o logit Y) sea igual o menor al 90% (o a + 2.2) respectivamente. Todas las dosis debajo de este valor deberán ser informadas como igual o menor a la dosis mínima detectable.

Variación intraensayo

Es un indicador de la precisión y reproducibilidad en la medición de una manera a lo largo de un RIA⁵, generalmente se expresa como coeficiente de variación.

Debido al hecho de que la curva dosis-respuesta no es uniforme en su precisión, se recomienda utilizar en el RIA muestras controles con concentraciones baja, media y alta en replicados distribuidos en tres posiciones diferentes en el ensayo¹².

A cada uno de los grupos de muestras de control de calidad se debe calcular la media \bar{X} , la desviación estándar (S) y la varianza (S_2).

Se recomienda acumular un lote de 10 ensayos para el cálculo del coeficiente de variación intraensayo a partir de estos parámetros porque nada podría conseguirse con un solo ensayo en donde las muestras de concentración baja, media y alta son sólo tres concentraciones en duplicado o triplicado.

Por lo tanto, en cada ensayo se determinará para cada grupo de réplicas de las concentraciones baja, media y alta los parámetros mostrados en la tabla 5.

TABLA 5. Variación Intra-Ensayo. Muestras de control de calidad para cada una de las concentraciones. (Deberá hacerse una tabla para cada una de las concentraciones.)

| RIA | Réplicas | | | | | $\sum X^2 \text{ total} =$ | | CV = |
|-------|----------|-------|----------|----------------|------------|-----------------------------------|--|-------------------------|
| (No.) | X_1 | X_2 | $\sum X$ | \bar{X} | $\sum X^2$ | $\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{R}$ | $S = \sqrt{\frac{X^2 \text{ total}}{R - 1^*}}$ | $\frac{S}{\bar{X}} 100$ |
| 1 | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | |
| 10 | | | $\sum X$ | $\sum \bar{X}$ | | $\sum X^2 \text{ total}$ | | |

* Cuando R, que es el número de réplicas, no es mayor de dos no se le resta 1.

Para obtener entonces el \bar{X} general de los 10 ensayos se utilizará la fórmula:

$$\bar{X} \text{ general} = \frac{\sum \bar{X}}{m \cdot R} \quad (\text{Ecuación 31})$$

donde, m es el número de análisis.

Para obtener la desviación estándar general de los 10 ensayos (S general) utilizamos:

$$S \text{ general} = \sqrt{\frac{\sum X^2 \text{ total}}{m (R - 1)}} \quad (\text{Ecuación 32})$$

Por último, para obtener el coeficiente de variación general (CV general) utilizamos la fórmula:

$$CV \text{ general} = \frac{S \text{ general}}{\bar{X} \text{ general}} 100 \quad (\text{Ecuación 33.})$$

El cálculo del coeficiente de variación intraensayo en un lote de 10 ensayos utilizando alícuotas de una misma muestra nos brindará una información mucho más útil por provenir de un número mucho más significativo de muestras que el obtenido sólo de una muestra en duplicado o en triplicado.

Por otro lado, es recomendable calcular el coeficiente de variación de duplicados o réplicas individuales de las muestras desconocidas.

Se recomienda rechazar aquellos cuyo coeficiente de variación sea mayor del 10%. El número

TABLA 6. Variación inter-ensayo. Muestras de control de calidad para cada una de las concentraciones baja, media, y alta. Debe hacerse una tabla para cada una de las concentraciones.

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|------------|-----------|----------------|-----------------|------------------|------------|---|------------------|-----------------|--------------------------|-----------|-----------|----------|
| No. de RIA | \bar{X} | $\sum \bar{X}$ | $\bar{\bar{X}}$ | $\sum \bar{X}^2$ | SCA_{cu} | S | CV CMA_{ct} | CMA_{cu} F | SCA_{ct} CMA_{ct} | F_{obt} | F_{tab} | Decisión |
| 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | |

total de las muestras rechazadas en cada ensayo constituye un parámetro adicional en el control de calidad⁵.

Variación interensayo

Es el parámetro más importante en el control de calidad de un laboratorio de RIA. La variación interensayo es la medida de la reproductibilidad de una misma muestra a través de diferentes ensayos, generalmente se expresa en términos de coeficiente de variación.

Generalmente se utilizan las mismas muestras empleadas para el coeficiente de variación intraensayo de cada RIA. A lo largo de 10 o más ensayos se medirán por replicado alícuotas de las muestras con concentración baja, media y alta.

Para obtener el coeficiente de variación interensayo se determinará para cada grupo de réplicas de las concentraciones baja, media y alta los parámetros mostrados en la tabla 6.

La columna 1 es el número secuencial de ensayos.

En la columna 2 \bar{X} es el promedio de la muestra obtenido en cada ensayo.

En la columna 3 $\sum \bar{X}$ representa la suma de los \bar{X} de cada ensayo en forma progresiva.

En la columna 4 se expresa $\bar{\bar{X}}$ que es promedio de la muestra obtenido hasta el último ensayo realizado.

$$\bar{\bar{X}} = \frac{1}{N} \sum \bar{X} \quad (\text{Ecuación 34})$$

En la columna 5 representa $\sum \bar{X}^2$ que es la suma parcial del cuadrado del promedio obtenido en cada ensayo.

La columna 6 SCA_{cu} es la diferencia entre la sumatoria de los cuadrados de los promedios de la muestra obtenidos en cada ensayo y la sumatoria al cuadrado de los promedios divididos por el número de ensayos realizados hasta ese momento.

$$SCA_{cu} = \sum \bar{X}^2 - \frac{(\sum \bar{X})^2}{N} \quad (\text{Ecuación 35})$$

La columna 7 es la desviación estándar (S) de la medida de los N ensayos realizados hasta ese momento.

$$S = \sqrt{\frac{SCA_{cu}}{N-1}} \quad (\text{Ecuación 36})$$

La columna 8 es el coeficiente de variación de los N ensayos realizados hasta ese momento.

$$CV = CMA_{ct} = \frac{S}{\sum \bar{X}/N} \quad (\text{Ecuación 37})$$

La columna 9 es el cuadrado medio acumulado (CMA_{cu}) debido a la suma de los cuadrados (SCA_{cu} de la columna 6) tomado para los N ensayos efectuados hasta ese momento, pero divididos por N-1 grados de libertad.

$$CMA_{cu} = \frac{SCA_{cu}}{N-1} \quad (\text{Ecuación 38})$$

La columna 10 expresa el cuadrado de la media actual (CMA_{ct}). Es el cálculo de la suma de los cuadrados debido exclusivamente al ensayo actual (SCA_{ct}). Se obtiene de restar el valor de la columna 6 (SCA_{cu}) correspondiente el ensayo actual N el valor de SCA_{cu} inmediatamente inferior (N-1) de la misma columna.

$$SCA_{ct} = SCA_{cu}(N) - SCA_{cu}(N-1) \quad (\text{Ecuación 39}).$$

Por solo existir un grado de libertad el SCA_{ct} es igual al cuadrado de la media actual CMA_{ct} .

La columna 11 es el cálculo estadístico del F obtenido para el análisis de varianza respectiva. Recordando lo mencionado al hablar de la ecuación 9 obtendremos:

$$F = \frac{SCA_{ct}(N)}{CMA_{cu}(N-1)} \quad (\text{Ecuación 40})$$

en donde, SCA_{ct} se toma del valor correspondiente al ensayo N en la columna 10 y CMA_{cu} se toma del valor correspondiente al ensayo inmediatamente anterior (N-1) en la columna 9. El valor resultante de la ecuación (40) será la F calculada:

En la columna 12 se colocará el valor de F de las tablas calculado al 95% de los límites de confianza para (N, N-1). Ver tabla 3 y su explicación.

El valor obtenido en la columna 11 (F calculada) deberá ser menor al obtenido en la tabla 3 F(N-1, N). En caso positivo se aceptará esa muestra de control de calidad para concentración especificada. En caso contrario será rechazada.

Como vemos en la explicación anterior, en este método se utiliza la varianza CMA_{cu} como el reflejo del error promedio acumulado a través de varios análisis. El cuadrado de la media actual (CMA_{ct}) es igual a la diferencia de las dos últimas sumas acumuladas de los cuadrados (SCA_{cu}). Por medio de este cálculo se obtiene el valor de F, el cual es comparado con su valor tabulado al 95% de confianza de 1 y N-1, indicando de esta manera si la última medición oscila dentro de la variación habitual⁷.

Gráficas de control de calidad

Todo laboratorio deberá mantener un control gráfico de todos los parámetros importantes en el control de calidad a lo largo de todos los ensayos. Se recomienda llevar gráficas de cada una de las concentraciones de las muestras de control, de la pendiente, del intercepto, del intercepto al 50%, del porcentaje de UNE, etc. y mostrando la dispersión hacia arriba y hacia abajo dividida en ± 1 , 2 y 3 desviaciones estándares.

Al evaluar el control de calidad de un ensayo, algunos investigadores (5) recomiendan que un ensayo deberá ser rechazado cuando los tres (3) grupos de control de calidad (concentración baja, media y alta) se encuentren fuera de una desviación estándar, cuando dos grupos se encuentren fuera de dos (2) desviaciones estándares o uno solo se encuentre por fuera de las tres desviaciones estándar.

Rangos de normalidad

Todo laboratorio debe establecer sus propios rangos de normalidad. Esto ocasionalmente es muy difícil de conseguir, porque con frecuencia los resultados de personas sanas pueden superponerse con los de los enfermos. Muchos factores pueden afectar un resultado tales como la edad, ejercicio físico, dieta, sexo, raza, problemas intercurrentes en el individuo no relacionados con la sustancia que se está midiendo, ausencia de estudios longitudinales en una misma persona, variaciones circadianas, efectos de la postura o de estados fisiológicos como el embarazo. Todos estos factores deben ser determinados y estandarizados.

Para determinar los rangos de normalidad de una prueba pueden emplearse varios métodos.

Determinación de la media \pm SD

El más usado pero no el más preciso, es establecer la media y la desviación estándar de una muestra lo suficientemente grande de controles sanos y definir la población normal por medio del uso del 95% de los límites de confianza. Sin embargo, este método tiene sus inconvenientes por cuanto los datos en endocrinología no están "normalmente" distribuidos y generalmente están "sesgados a la derecha" conformando una distribución "log-normal"³.

Otro problema que se enfrenta con este enfoque es la superposición de datos a ambos extremos de la distribución normal entre población sana y enferma. Esto ha conducido a la utilización de los otros enfoques.

Enfoque bayesiano

Es una técnica utilizada frecuentemente en la cual un laboratorio intenta colocar los resultados en dos (2) categorías, normales o anormales (enfermedad).

El teorema de Bayes maneja la posibilidad de que dos eventos sucederán concurrentemente, esto es que en presencia de un resultado existe una posibilidad finita de que existe enfermedad. Para utilizar este método se requiere que la especificidad y sensibilidad de la prueba así como la prevalencia de la enfermedad en la población sean conocidas. Usando tales datos se podrá obtener tasas predictivas verdaderas para cualquier resultado de laboratorio¹³.

Para utilizarse este método deben seleccionarse muestras de dos (2) poblaciones, una de controles sanos y otra de enfermos que han sido clasificados así por un método uniforme pero diferente a la prueba que será evaluada. Una vez tenidas las dos muestras se les practica la prueba que será evaluada. Si la prueba consiste en positividad para los pacientes y negatividad en los sanos tendremos la posibilidad de cuatro (4) resultados: verdaderos positivos, falsos positivos, falsos negativos y verdaderos negativos, los cuales serán colocados en la llamada tabla binaria (ver tabla 7).

$$S = \frac{A}{A + C} \quad (\text{Ecuación 41})$$

TABLA 7. Tabla binaria y simplificación del teorema de Bayes.

| | | Enfermos | Controles |
|--------|----------|--------------------------|--------------------------|
| Examen | Positivo | Verdaderos Positivos (A) | Falsos Positivos (B) |
| | Negativo | Falsos Negativos (C) | Verdaderos Negativos (D) |
| | | Sensibilidad | Especificidad (E) |

$$E = \frac{D}{B + D} \quad (\text{Ecuación 42})$$

$$\text{Valor predictivo (+) VP (+)} = \frac{A}{A + B}$$

(Ecuación 43).

$$\text{Valor predictivo (-) VP (-)} = \frac{D}{C + D}$$

(Ecuación 44).

Relación de probabilidad o índice de probabilidad (IP)

$$IP = \frac{\frac{A}{A + C}}{\frac{B}{B + D}} \quad (\text{Ecuación 45})$$

Obtenidos los verdaderos y falsos positivos y verdaderos y falsos negativos se procede a determinar la sensibilidad y la especificidad de la prueba.

La sensibilidad se obtiene determinando la proporción de enfermos que tienen el examen positivo (ecuación 41, en la tabla 7). De igual manera la especificidad consiste en determinar la proporción de controles normales que tienen el examen negativo (ecuación 42, tabla 7). De otra parte, utilizando la misma información es posible calcular el valor predictivo positivo o negativo que se define como la probabilidad de que un paciente tenga la enfermedad cuando un examen es positivo o negativo (ver ecuaciones 43 y 44 en la tabla 7).

El índice o relación de posibilidades expresa cuantas veces es más probable que el resultado positivo provenga de un enfermo que de un control.

Para profundizar en este tema se recomienda una excelente revisión publicada recientemente¹⁴.

Determinación de los percentiles 5 y 95

Aunque la evaluación de una prueba con el enfoque bayesiano es superior, es con frecuencia difícil de utilizar para un laboratorio clínico. Por el contrario, la determinación de la media \pm SD para obtener los límites de confianza es una prueba muy sencilla de hacer, pero ofrece la dificultad de que la mayoría de los datos en endocrinología no tienen una distribución simétrica gaussiana. Como ya se dijo antes estos están sesgados a la derecha y a menudo conforman una distribución log-normal cuando no hay valores indetectables o iguales a cero.

El problema del no gaussianismo o no normalidad de la distribución puede ser manejada con métodos estadísticos no paramétricos estimando los percentiles 1 y / o 5 superior e inferior de la distribución.

Estos métodos generalmente requieren muestras de gran tamaño. También puede enfocarse el problema con métodos cuasi-paramétricos asumiendo que la distribución es localmente gaussiana en las colas. En este caso se extrapola la función de la distribución acumulativa en papel probit, se ajusta una línea recta separada para las regiones inferior o superior y estimar los percentiles 1 y 5 por interpolación si es posible o por extrapolación si es necesario³.

Un tercer enfoque es obtener el gaussianismo por transformación de los datos, ya sea por logaritmos, raíz cuadrada, raíz cúbica, raíz a la n , o bien cualquier otra transformación simple hasta obtener una normalidad óptima (por ej. $\log X + C$ o $\sqrt[n]{X + C}$ ¹⁵). La normalidad así obtenida será probada por cálculo de momentos, inspección de la función de distribución y su representación en papel probit y cálculo de los criterios de Kolmogorov-Smirnov o el Shapiro Wilk.

Cuando se buscan rangos de pruebas dinámicas llamadas también pruebas provocativas o de estímulos deberá buscarse la normalidad para los resultados basales como para cada uno de los tiempos de la prueba en forma independiente.

La obtención de los rangos de normalidad debería ser realizada con la ayuda de un estadístico o utilizando un programa de computador inteligente¹⁶, el cual puede ser utilizado para estimar los percentiles de la distribución al aumentar el tamaño de la muestra.

Otro de los problemas, al cual tiene que enfrentarse un laboratorio para establecer sus rangos de normalidad, es los bajos grados de libertad especialmente en las pruebas de estímulo en niños normales y el otro es la no uniformidad de la varianza, esto es, la variación en la dispersión en los valores obtenidos en cada uno de los tiempos de una prueba de estímulo.

Para incrementar los grados de libertad se ha propuesto³ utilizar como un todo los valores obtenidos en los diferentes tiempos de una prueba de estímulo, lo cual incrementa considerablemente los grados de libertad en forma proporcional al número de tiempos que presente la prueba.

Cuando en las pruebas de estímulo hay uniformidad de varianza entre los valores de los diferentes tiempos para obtener el rango suavizado en cada tiempo todo lo que hay que hacer es sacar un promedio de las varianzas o de las desviaciones estándar de los diferentes tiempos. Sin embargo, en la mayoría de las pruebas de estímulo hay sistemáticamente una no-uniformidad de la varianza y a medida que aumenta el nivel de una hormona así aumenta su variabilidad. Algunas veces esta no uniformidad es eliminada por la misma transformación utilizada para obtener el gaussianismo (Por ej. logarítmica), pero a menudo el problema permanece. Una forma bastante sensible de examinar los datos consiste³ en:

1. Calcular la media (\bar{Y}) y la desviación estándar (S_y) entre los sujetos en cada tiempo de la prueba.
2. Extrapolar (S_y) vs. (\bar{Y}) en un eje de coordenadas.
3. Examinar el patrón de extrapolación para determinar si existe una relación sistemática entre S_y y \bar{Y} .
4. Si existe una relación deberá caracterizarse, ya sea al ojo o por computador. Usualmente se encuentra una relación muy simple tal como S_y a \bar{Y} o S_y a $\sqrt{\bar{Y}}$, etc.
5. Conocida la relación podrá predecirse qué desviación estándar habrá en cualquier punto de un tiempo dado en una prueba dinámica, con base en una relación continua y suavizada entre S_y y \bar{Y} .

Importancia de las pruebas hormonales de estímulo

Las pruebas hormonales de estímulo tienen varias ventajas sobre las dosificaciones basales tales como que al ser dinámicas evalúan el comportamiento de las hormonas y glándulas endocrinas a un estímulo dado. También permiten establecer una apreciación indirecta de la reserva funcional de una glándula y la estimación indirecta del *turnover* (ciclo metabólico) de una hormona.

Tienen además como ventaja las pruebas de estímulo que, al elevar a una hormona en respuesta al estímulo, este nivel hormonal más alto generalmente queda en una región buena del RIA, con lo cual se obtiene un coeficiente de variación mucho más pequeño y por lo tanto una mayor precisión de la prueba.

Referencias

1. YALOW, R.S. and BERSON, S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.* 39: 1157 - 1175, 1960.
2. EKINS, R.P. The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin. Chim. Acta.* 1960. p. 453 - 459
3. RODBARD, D. Interpretation of endocrine provocative test: Statistical considerations. In: LARON, Z. and TKVA, P. Evaluation of growth hormone secretion. *Pediat. Adolesc. Endocr. Karger, Basel.* 1983. P. 181 - 193. V.12.
4. EASON, C.S. and WALASKI, S.L. Numerical procedures needed for radioimmunoassay. In: MOSS, JR. A.J. et al. *Practical radioimmunoassay.* Saint Louis: The C.V. Mosby company 1976 p. 77 - 99.
5. BEDOLLA TOVAR, N. et al. Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis. I. Guía para la evaluación de resultados. *Rev. Invest. Clin. (Mex)* 36: 179 - 192, 1984.
6. RODBARD, D. and HUTT, D.M. Statistical analysis of radioimmunoassays and immunometric (labelled antibody) assays. In: *Radioimmunoassay and related procedures in medicine.* Vol. I. Vienna: International Atomic energy agency. 1974, p. 165 - 188.
7. CEKAN, S.Z. Reliability of steroid radioimmunoassay. *Acta univ. Upsalien.* 14: 1 - 48, 1976.
8. DIXON, W.J. and MASSEY, F.J. *Introduction to statistical analysis.* 3 ed. New York: MacGraw-Hill, 1969.
9. ROBDARD, D. Lessons from the computerization of radioimmunoassays: An introduction to the basic principles of modeling. In: RODBARD, et al. *Computers in endocrinology, (serona symposium)* New York: Raven Press Vol. 15, 1984.
10. NABARRO, J.D.N. Radioimmunoassay and saturation analysis. *BR. Med. Bull.* 30: 1 - 2, 1974.
11. EKINS, R.P. Quality control and assay design. In: *Radioimmunoassay and related procedures in medicine.* 1977. Int. Atomic energy agency. Vienna. Vol. II. 1978. p. 39 - 56.
12. JEFFCOATE, S.L. The use of quality control within a laboratory. In: *Radiosimmunoassay and related procedures in medicine:* 1977. Int. Atomic energy agency, Vienna, Vol. II 1978. p. 57 - 59.
13. BOYD, CH. M.; SLAYDEN, J.E. and VANDERGRIF, J.F. Quality Control and normal ranges. In: MOSS, J.R., A.J., et al. *Practical radioimmunoassay,* S. Louis, Mo: C.V. Mosby 1976, p. 105 - 116.
14. MORILLO, L.E. Métodos para la evaluación de una prueba diagnóstica. *Acta Med. Col.* 11: 297 - 305, 1986.
15. HARRIS, E.K. and DEMETS, D.L. Effects of intra and inter-individual variation on distributions of single measurements. *Clin. Chem.* 1972. p. 244 - 249.
16. SAS INSTITUTE INC. *Sas User's Guide. Basics,* 1982 Edition. Cary, N.C.: Sas Institute 1982, p. 923.