
Rev Biomed 2002; 13:277-287.

Manejo de datos de radioinmunoanálisis.

Revisión

Jorge H. Alvarez-Cervera.

Laboratorio de Radioinmunoanálisis, Mérida, Yucatán, México.

RESUMEN.

Se describen diversos procedimientos utilizados para manejar datos de radioinmunoanálisis (RIA) y se presentan las bases del ventajoso y sencillo enfoque del Dr. Grafton Chase para el mismo fin. Entre las principales características de éste destacan el sistema interno de control de calidad que contiene, además de que no oculta errores experimentales pues no comprime las escalas de la curva de calibración, a la vez que permite identificar puntos sospechosos en ésta. Se comentan factores importantes del RIA relacionados con el manejo de los datos, como son las diferencias entre el RIA en equilibrio y el RIA secuencial, el concepto de sensibilidad del análisis, la especificidad del anticuerpo y la conveniencia de verificar la calidad del ensayo utilizando los patrones mismos con que se construye la curva de calibración en vez de emplear controles. Se presentan ejemplos con datos típicos proporcionados por fabricantes de reactivos y con datos obtenidos en el laboratorio. También se describe la aplicación del procedimiento del Dr. Chase al análisis inmunoradiométrico.

(Rev Biomed 2002; 13:277-287)

Palabras clave: Radioinmunoanálisis, RIA, IRMA.

SUMMARY.

Radioimmunoassay data handling.

Several procedures for radioimmunoassay (RIA) data handling are described and the basis of Dr. Grafton Chase's simple approach for the same purpose is also presented. The main features of this method are that it includes an internal quality control system, it does not hide experimental errors since it does not compress the scales of the standard curve, and it enables the identification of suspicious points in the curve. Important factors related to RIA data handling are presented such as: the differences between equilibrium RIA and sequential RIA, sensibility of the assay, antibody specificity, and the verification of quality in the assay using standards or calibrators instead of controls. Examples with typical data supplied by manufacturers of RIA reagents and with data obtained in the laboratory are shown. The use of Dr. Chase's approach in immunoradiometric assay is also described.

(Rev Biomed 2002; 13:277-287)

Key words: Radioimmunoassay, RIA, IRMA.

"No hay nada más gráfico que una gráfica para hacer notar algo gráficamente"
S.A. Rudin(1)

INTRODUCCIÓN.

La reducción de los datos experimentales de radioinmunoanálisis (RIA) o manejo de datos de RIA, como también se le llama, ha evolucionado mucho a través del tiempo ya que cuando Berson y Yalow, inventores del RIA, llevaron a cabo sus primeras investigaciones en este campo todavía no se difundía el uso de computadoras por lo que manejaron sus datos manualmente. A continuación se pretende hacer un pequeño homenaje al Dr. Grafton D. Chase, quien fuera uno de los pioneros de la radioquímica, y con este fin se expondrán las bases de su ventajoso y sencillo enfoque racional para manejar datos de RIA. Una de sus principales características es que contiene un sistema interno de control de calidad basado en diversos parámetros. El procedimiento todavía no alcanzaba una amplia difusión cuando falleció su autor y, quizás por costumbre, continúan siendo utilizados otros procedimientos que, con el mismo fin, fueron establecidos previamente (2-6).

En RIA se determina la concentración de un analito en función de la radiactividad medida o de una relación de ésta, pero con frecuencia se desconoce dicha función o no es tomada en cuenta al manejar los datos experimentales. Existe un convenio para representar de modo gráfico cualquier función del tipo $y = f(x)$, como la utilizada en RIA, que establece situar los valores de la variable independiente (x) en el eje X de un sistema de coordenadas cartesianas y los de la variable dependiente (y) en el eje Y .

El manejo de datos de RIA comenzó de modo empírico con gráficas trazadas en papel lineal, procedimiento ya no es de uso común porque se obtiene una gráfica muy curva, a la cual es difícil aplicarle un sistema de control de calidad. Además, el trazador radiactivo se desintegra con el transcurso del tiempo y la curva de calibración se desplaza hacia el eje de la concentración. La figura 1A muestra este desplazamiento mediante tres curvas patrón de tiroxina (T_4). La curva t_0 corresponde a los datos típicos proporcionados, como ejemplo, por un fabricante de materiales para RIA (7). La curva $T^{1/2}$ es la que se obtendría, con los mismos

datos, al decaer la radiactividad a la mitad y la curva $2T^{1/2}$ al reducirse a la cuarta parte. En un intento por compensar el efecto de la desintegración se introdujo la normalización B/B_0 , o sea, la radiactividad de la fracción unida del trazador (B) con relación a la radiactividad correspondiente a la concentración cero del analito (B_0). Esta normalización generalmente se expresa como un porcentaje. La figura 1B representa los datos de la figura anterior normalizados de este modo, con lo cual se convirtieron las tres curvas en una sola. Teóricamente no se modificaría la posición de la gráfica con el decaimiento, pero los reactivos se descomponen y esta normalización dificulta detectar el deterioro que sufren durante su envejecimiento y su manejo, pues la gráfica resultante también es muy curva.

Como el intervalo de valores de la concentración del analito puede ser muy amplio, en algunos casos resultaría demasiado largo el papel de gráficas requerido para representar todos los datos. Quizás por esto se comenzó a utilizar papel semilog, ya que la escala logarítmica comprime el eje correspondiente a esta escala. Lo que no está claro es por qué, en contra del convenio establecido se suele representar la concentración, o sea, la variable dependiente (y) en el eje X en vez del eje Y , como muestra la figura 2, en la cual se utilizaron los mismos datos iniciales de las gráficas anteriores. Por otro lado, llama la atención que las concentraciones de los patrones hayan sido escogidas por el fabricante casi de acuerdo con la serie exponencial de los números 1,2,3,4,5, elevados al cuadrado, que son, respectivamente, 1,4,9,16,25, quizás para que no parezcan tan mal distribuidos en

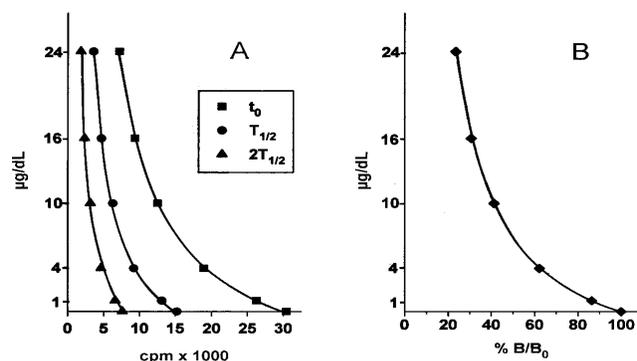


Figura 1.- RIA de T_4 representado en papel lineal.

Manejo de datos de radioinmunoanálisis.

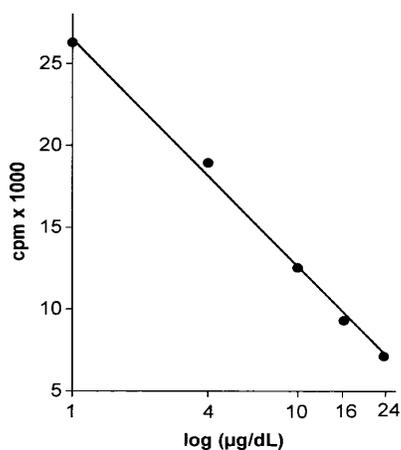


Figura 2.- RIA de T4 en papel semilogarítmico.

una escala logarítmica. Pero cada uno de estos valores excede al inmediato anterior por una cantidad cada vez mayor, en vez de estar espaciados uniformemente como, por ejemplo, 3,6,9,12,15,18... Quizás muchos laboratoristas desconfiarían de una balanza cuyas divisiones fueran 1,4,10,16,24..., pero aceptan, sin titubear, que las concentraciones de los patrones de T4 tengan estos valores, así como, también, tal vez por costumbre, aceptan algunos términos inexactos, confusos o ambiguos del RIA que se señalarán más adelante.

La compresión del eje X hace que, aparentemente, “se haga más recta la curva”, pero debe tenerse en cuenta que en esa escala no se representa la concentración sino su logaritmo. Sin embargo, al médico le interesa más conocer la concentración exacta de una sustancia importante para la salud de su paciente que su logaritmo. Otro inconveniente de la escala logarítmica es que al utilizarla se pierde un poco de información, pues no permite representar la concentración cero, ya que el logaritmo de cero no está definido y se considera que es menos infinito. Por esta razón, el primer punto de una gráfica de este tipo no corresponde al primer patrón, sino al segundo de la serie, cuya concentración es la inmediata superior a cero.

El Dr. Chase narraba el cuento de las gráficas semilog, aplicadas a un fenómeno experimental. Decía: "Los huesos hacen felices a los perros, los cuales expresan su felicidad por la rapidez con que mueven

la cola. En el caso de un perro lineal, el movimiento de la cola está en razón directa al número de huesos, o sea, “la dosis”, como le llaman los que saben de estas cosas. La figura 3A representa el efecto de la dosis mediante la línea punteada. Desde luego, sería aventurado mostrar demasiados huesos a la vez a un perro, pues el animal perdería la cuenta, por “saturación” y podría obtenerse una curva semejante a la línea continua. Algo similar le pasa a los contadores Geiger de radiación. Afortunadamente, se ha establecido de modo experimental, y sin lugar a dudas, que la respuesta de la cola es “casi” una función logarítmica de la dosis de huesos, según la gráfica 3B, que corresponde a un perro logarítmico. Este hecho es muy conocido en ciencias biológicas, y se usa frecuentemente para linealizar curvas de dosis/respuesta”. El cuento hace recordar que el RIA no es un fenómeno biológico sino un análisis químico y que la química es una de las ciencias exactas, aunque al practicarla cometamos errores y equivocaciones y hasta aceptemos algunas inexactitudes que estén de moda.

Otro sistema muy utilizado para graficar curvas patrón de RIA emplea papel logit-log, que muestra la figura 4, el cual tiene una escala logarítmica en el eje X y una escala probabilística en el eje Y, llamada logit, según la cual $\text{logit } y = \ln y/(1-y)$. En RIA $y = 100(B/B_0)$. En este sistema se llama “porcentaje de unión del trazador” o, más comúnmente, “por ciento de unión” a $100(B/B_0)$, término que se utiliza de manera ambigua, ya que el verdadero porcentaje de unión debe de ser calculado con respecto a la

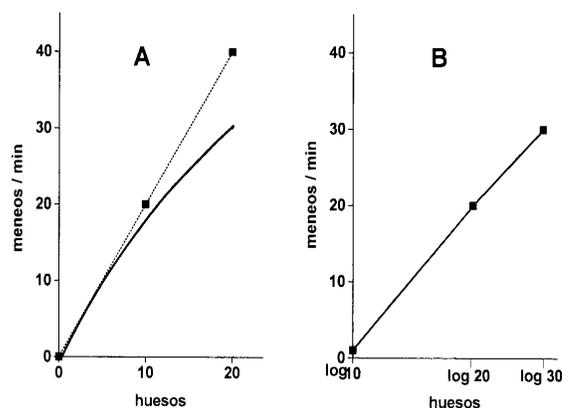


Figura 3.- Curvas de dosis/respuesta.

JH Alvarez-Cervera.

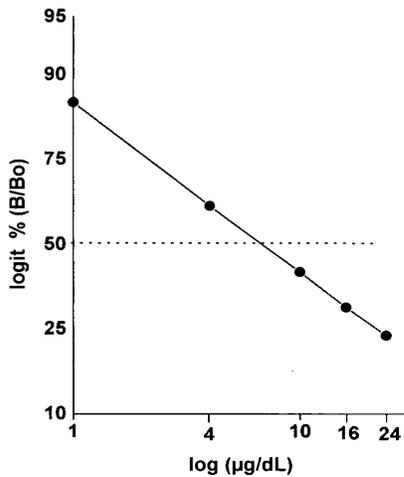


Figura 4.- RIA de T4 en papel logit-log.

radiactividad total (T) y es igual a $100(B/T)$.

Aunque podría parecer que el término RIA está relacionado con hacer reír, el radioinmunoanálisis no es un asunto jocoso a pesar de que en él se apliquen términos y se manejen conceptos de un modo que producen risa a químicos serios y a otras personas más, como sucede, por ejemplo, con la dosis, el por ciento de unión, considerar que es recta una línea curva, confundir la variable independiente x con la variable dependiente y , etc. No cabe duda de que el RIA es indispensable en muchos casos pues aunque sus resultados no siempre sean exactos son útiles. Sin embargo, es fácil y no consume más tiempo el obtener resultados más exactos.

El papel logit-log se utiliza en estadística para linealizar distribuciones simétricas, como las de curvas gaussianas (6), cuya forma recuerda a las puertas y ventanas ojivales de los edificios de estilo gótico. Pero las curvas patrón de RIA no son distribuciones simétricas y, sin embargo, con frecuencia se trazan en papel logit-log. A semejanza de la escala logarítmica, la longitud de las divisiones es diferente en cada intervalo de la escala logit, pero hay un eje de simetría en el punto que corresponde a 50%, ya que, para valores mayores de 50%, aumenta constantemente la longitud de las divisiones hacia 100% y para valores menores de 50%, también crece del mismo modo, pero en sentido contrario, hacia 0%. El sistema logit-log se utiliza con la intención de hacer más rectas las curvas de RIA, pero no siempre se obtienen resultados

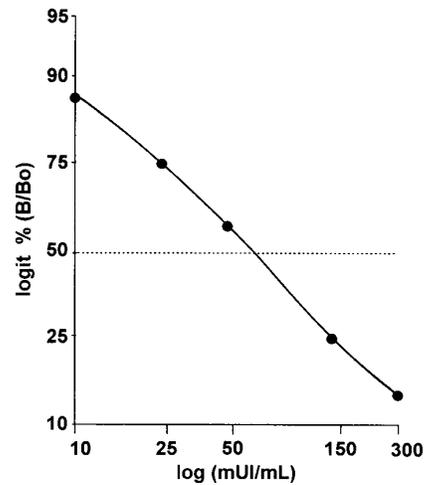


Figura 5.- Un RIA secuencial.

satisfactorios con él pues se produce una curva sinuosa. Se dice que funciona mejor con RIA en equilibrio que con RIA secuencial. Se entiende por RIA en equilibrio aquel en el cual reaccionan juntos los principales componentes del RIA: anticuerpo, analito y trazador, hasta que alcanzan el equilibrio químico, en tanto que en el RIA secuencial se efectúa una primera reacción entre el anticuerpo y el analito y una segunda cuando se agrega el trazador. Por lo tanto, son diferentes las reacciones químicas que se efectúan en estas dos variantes de RIA (6,8).

La figura 5 corresponde a los datos de un fabricante de reactivos para RIA secuencial de gonadotropina coriónica (9). Esta gráfica logit-log es una curva sinuosa y, si se traza una recta por sus puntos se pueden ocultar errores al utilizarla como curva de calibración. Pero el manejo de datos no debe ocultar desviaciones de los valores hallados experimentalmente, para tratar de obtener una línea recta, sino contribuir a determinar la concentración real del analito, que es el objetivo del RIA.

El RIA "ideal".

Comentaba el Dr. Chase que, en algunas ocasiones, se hacen determinadas suposiciones en las ciencias para simplificar un sistema sin sacrificar "excesivamente" la exactitud., como en el caso del RIA, el cual es un sistema más complejo que el establecido en los principios básicos generalmente aceptados:

Manejo de datos de radioinmunoanálisis.

1. El antígeno no marcado (**Ag**) y el antígeno marcado (**Ag***) son químicamente equivalentes.

2. Hay un exceso de **Ag+Ag*** con respecto al anticuerpo (**Ab**), pero sólo reacciona una molécula de antígeno por cada molécula de anticuerpo.

3. El anticuerpo es específico para el antígeno y no se efectúan otras reacciones que interfieran con la propiedad que tienen ambos de unirse entre sí.

4. Las reacciones de **Ag** y **Ag*** con **Ab** se efectúan totalmente, hasta saturar los sitios de unión de **Ab**.

Aunque en la práctica el RIA se aproxima a este modelo ideal, no hay que olvidar que no se efectúa en condiciones ideales en el laboratorio, ya que el antígeno marcado y el no marcado no son idénticos químicamente, debido a que el yodo radiactivo que se introduce para marcar a la mayoría de los analitos es un elemento extraño y, generalmente, no forma parte de las moléculas originales de ellos. Los procesos químicos a los cuales son sometidos los antígenos durante la marcación también pueden alterar sus propiedades. Además, en muchos casos, el anticuerpo no es totalmente específico para el antígeno. En ocasiones se utilizan antisueros que, como se sabe, contienen una mezcla de anticuerpos, en vez de un anticuerpo puro, y cada uno de éstos puede presentar diverso grado de especificidad con respecto al analito. Por último, debe tenerse en cuenta que los anticuerpos son bivalentes, o sea, que cada molécula tiene dos sitios de unión y que la afinidad de cada uno de ellos es diferente a la del otro. Por lo tanto, en RIA es común que se efectúen simultáneamente otras reacciones además de la reacción ideal que se lleva a cabo entre una molécula de antígeno y una de su anticuerpo específico.

De acuerdo con los principios básicos, la concentración total de antígeno (**Ag+Ag***) está en razón directa con el antígeno unido (**AgU**), y la radiactividad total del trazador (**T**) está relacionada del mismo modo con la radiactividad del trazador ligado (**B**): $(\text{Ag}+\text{Ag}^*)/(\text{AgU}) = \text{T}/\text{B}$. Al despejar se obtiene que: $\text{Ag} = (\text{AgU})\text{T}/\text{B} - \text{Ag}^*$, ecuación de una recta del tipo $y = mx + b$, en la que **b** es el intercepto en la parte negativa del eje **Y**, o sea, $y =$

$mx + (-b)$.

Si esta hipótesis es válida, al representar la concentración del antígeno en función de **T/B** debe de obtenerse una línea recta. Si fuera perfecta la correlación entre los valores de **T/B** y de la concentración de **Ag**, todos los puntos quedarían en la línea de regresión. En un análisis químico se notará mayor desvío o dispersión de los resultados a medida que la correlación sea menos perfecta. Por lo tanto, el índice de correlación es un buen indicador de la calidad del análisis ya que permite verificar si el valor de cada patrón, obtenido experimentalmente, corresponde a su valor especificado (10). Para comprobar este razonamiento, en el cuadro 1 se muestra una serie hipotética de seis tubos de ensayo. A cada uno se agrega, respectivamente, 0,3,6,9,12 ó 15 partes de antígeno, que corresponden a los patrones, y 6 partes de antígeno marcado. La cantidad total de antígeno (**Ag+Ag***) es de 6,9,12,15,18 ó 21 partes de antígeno, respectivamente. Se añaden 3 partes de anticuerpo a cada tubo y se dejan reaccionar hasta saturar sus sitios de unión. A continuación, se calcula la relación **T/B**, o sea, la cantidad total de antígeno entre la fracción de éste ligada al anticuerpo y se traza la curva patrón correspondiente.

Cuadro 1
Una serie hipotética.

Ag	Ag*	Ag+Ag*	Ab	T/B
0	6	6	3	2
3	6	9	3	3
6	6	12	3	4
9	6	15	3	5
12	6	18	3	6
15	6	21	3	7

La figura 6 ilustra la gráfica de la concentración del antígeno no marcado en función de **T/B**, o sea, que $y = f(x)$. Se puede observar que todos los puntos corresponden a una línea recta, cuyo índice de correlación es uno, lo cual sugiere que la hipótesis es válida y que concuerda con los principios básicos del RIA. Ya que la masa del trazador ideal es cero, la

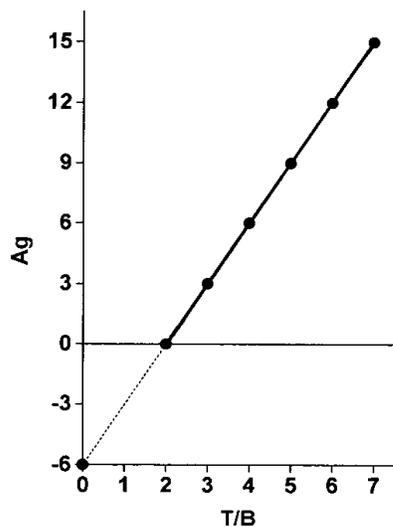


Figura 6.- Un RIA ideal.

recta debería de pasar por el origen. Pero los trazadores reales tienen masa y, como en este caso se agregaron 6 partes de antígeno marcado, el cual contiene determinada cantidad de materia, ésta corresponde a **b**, que es el intercepto en el eje **Y**. La pendiente **m** de la recta representa el cambio de **y** por cada unidad de **x**. En este ejemplo, la pendiente es constante en todo el intervalo de valores de los patrones, como es deseable en un análisis químico. Por definición, en química la pendiente representa la sensibilidad del análisis, o sea, la cantidad de respuesta por unidad de estímulo (11). En RIA corresponde a las unidades de respuesta obtenidas al medir la radiactividad por cada unidad de concentración del analito. Los Dres. Yalow y Berson también aceptaron esta definición (12), de modo que la pendiente es otro valioso parámetro en el control de calidad del análisis. El significado de sensibilidad ha sido motivo de muy amplio, amargo y enconado debate entre diversos investigadores destacados, como la Dra. Yalow, premio Nobel en medicina, y el Dr. Ekins, otro pionero del RIA. Para este último, y sus seguidores, la sensibilidad es sinónimo de “detectabilidad”, o sea, la concentración mínima que se puede medir del analito (12,13).

Otro aspecto importante del RIA es el de la unión inespecífica (NSB), o sea, la fracción de la radiactividad total que aparece en la fracción unida

pero que no se debe a la reacción específica entre el antígeno y el anticuerpo. Por un lado, existe la creencia de que puede realizarse una corrección automática de la NSB mediante la resta de un valor constante, el cual se obtiene con tubos de ensayo que contienen todos los componentes de la reacción, excepto el anticuerpo. Sin embargo, se ha demostrado que la NSB no es constante y que una de las razones de esto es la diferencia de composición que tienen el suero de los patrones y el suero de cada paciente (6). Además, en general, la NSB no afecta los resultados, porque es muy pequeña cuando se utilizan los materiales para RIA disponibles en la actualidad, pues comúnmente es del orden de uno por ciento. Por lo tanto, no es necesario tomarla en cuenta (7,14-6). Por otro lado, hay una confusión al calcular el porcentaje de unión, pues con frecuencia se le llama cuentas netas al resultado de restar las cuentas de la NSB a la radiactividad medida de cada uno de los tubos de patrones o muestras, o de restárselas al promedio correspondiente a cada pareja de tubos duplicados. Sin embargo, en la metodología de los trazadores radiactivos, como es el caso en RIA, no debería existir ninguna duda acerca de que las cuentas netas siempre son las cuentas obtenidas en la medición de un patrón o de una muestra menos las cuentas del fondo radiactivo.

Validación del modelo de RIA del Dr. Chase.

Para verificar la validez del razonamiento se aplicaron los mismos criterios de la hipótesis a los datos típicos de RIA de **T4** de ejemplos anteriores. Se calculó la relación **T/B** para cada patrón y mediante una calculadora se obtuvo un índice de correlación de **0.999**, el cual confirma que es correcto el modelo. Para corroborar esta validez, se aplicó el mismo tratamiento a los datos obtenidos en el laboratorio mediante un juego de reactivos para RIA de **T4** del mismo tipo y del mismo fabricante que en el ejemplo anterior. El cuadro 2 corresponde a la curva patrón que se obtuvo, cuyo índice de correlación $r_1 = 0.996$ sugiere que es confiable. Sin embargo, para verificar la calidad de los resultados se interpolaron los datos de cada uno de los patrones, como si fueran

Manejo de datos de radioinmunoanálisis.

problemas, con el fin de determinar experimentalmente su concentración y estimar el error que pudiera tener cada resultado. Las tres columnas de la izquierda de la tabla contienen los valores esperados (**E**) y obtenidos (**O**) y el porcentaje de error ($\% = 100(\text{O} - \text{E})/\text{E}$) de cada patrón, respectivamente. Esta información acerca del error experimental no es tan evidente en los sistemas que utilizan escalas logarítmicas. Para mejorar la exactitud del análisis, es válido desechar los datos de los puntos de concentración cero y uno, que son los que contienen un error experimental mayor pues, además, se encuentran fuera del intervalo de valores normales aceptado generalmente y, sin ellos, calcular una nueva curva de calibración. El nuevo índice de correlación es $r_2 = 0.999$. Las dos columnas del lado derecho del cuadro contienen los valores obtenidos mediante esta corrección y el porcentaje de error con respecto a los valores esperados. Se puede ver que el nuevo error estimado para los patrones de 4, 10, 16 y 24 es considerablemente menor.

Cuadro 2

Validación del modelo de RIA con datos del laboratorio.

E	O	%	O	%
0	-0.77	---	---	---
1	0.50	-50.00	---	---
4	4.92	23.00	3.70	-7.50
10	10.97	9.70	10.40	4.00
16	16.16	1.00	16.10	0.60
24	23.22	-3.25	23.80	-0.80
		$r_1 = 0.996$	$r_2 = 0.999$	

El procedimiento del Dr. Chase proporciona, además, información acerca de la calidad de los reactivos, pues un cambio en la pendiente, cuando se utiliza el mismo juego de reactivos en fechas diferentes, o cuando se comienza a utilizar un nuevo lote, es un aviso de que cambió la sensibilidad del análisis. Esto permite, por ejemplo, saber que los reactivos deben ser desechados antes de la fecha de caducidad, por

haberse degradado o, también, si pueden ser utilizados con confianza aún después de aquella fecha, sin pérdida de calidad en los resultados. El efecto del envejecimiento de los reactivos se ejemplifica con seis curvas patrón en el cuadro 3. Dichas curvas fueron obtenidas en fechas sucesivas con el mismo juego de reactivos para RIA de **T4**. El índice de correlación siempre fue **0.999**. El cuadro muestra el número de días transcurridos cuando se hizo cada una de las pruebas y los valores de la pendiente, que es la sensibilidad del análisis. Ésta fue disminuyendo con el transcurso del tiempo, desde 2.6 hasta 2.1 unidades de respuesta por unidad de estímulo, lo cual representa una disminución de la sensibilidad en 25 días de 20%, aproximadamente.

Cuadro 3

Envejecimiento de los reactivos.

Días	Pendiente
0	2.6
6	2.6
10	2.5
14	2.3
18	2.3
25	2.1

El análisis inmunorradiométrico.

En el análisis inmunorradiométrico (IRMA), muy semejante al RIA, se determina la concentración de un antígeno (**Ag**), mediante un anticuerpo radiactivo (**Ab***) el cual, además, es el trazador. Este se utiliza en exceso con respecto al antígeno y, después de que reacciona con el total de éste, se separa el anticuerpo marcado que quedó libre. Por lo tanto, en IRMA también se determina la concentración del analito en función de la radiactividad medida según $y = f(x)$, pero esta función es diferente a la del RIA, ya que el trazador unido está en razón directa de la concentración del antígeno, así como la radiactividad total (**T**) está relacionada con la fracción de la radiactividad unida (**B**): $\text{Ab}^*/\text{Ag} = \text{T}/\text{B}$. Al despejar, se obtiene que $\text{Ag} = (\text{B}/\text{T})\text{Ab}^*$. Esta última es la ecuación de una recta que pasa por el origen: $y =$

mx. Sin embargo, como en el caso del RIA, en la práctica del IRMA no existen condiciones ideales, por lo que el patrón de concentración cero siempre produce algunas cuentas (en el IRMA “ideal” no produciría ninguna cuenta), las cuales desplazan a la gráfica del origen de los ejes de coordenadas. Según la ecuación, la concentración del analito (**y**) es igual a la radiactividad del trazador unido (**x**) multiplicada por una constante (**m**), que es la pendiente de la recta, que, como en RIA, también corresponde a la sensibilidad del análisis. Dado que **T** es constante en todos los tubos de una serie de IRMA, basta con representar a las cuentas del trazador unido (**B**) en el eje **X** y a la concentración de los patrones en el eje **Y**.

Validación del modelo de IRMA.

Para verificar si es válido el razonamiento, se utilizaron datos típicos de IRMA de hormona estimulante de la tiroides “neonatal” (**TSH NEO**) proporcionados por un fabricante (17). El índice de correlación de **0.994** comprobó la validez del modelo. En el cuadro 4 se muestran los valores esperados (**E**, en microunidades internacionales por mililitro) y obtenidos (**O**, también en UI/mL) y el error estimado (%). Se observa una desviación en patrones de concentraciones altas. Con frecuencia se encuentra este “efecto de gancho” al medir concentraciones altas de algunas sustancias, lo que se ha explicado de manera poco convincente atribuyendo dicho fenómeno al “diseño intrínseco” del IRMA (17, 18), lo cual no justifica que sea baja la calidad de los reactivos. Para evitar el efecto de gancho se aconseja diluir las muestras con el patrón cero, no con agua destilada. Esto concuerda con la afirmación de que el efecto de gancho se debe a la presencia de unidores o ligantes de baja especificidad en la matriz de los patrones o de las muestras, los cuales compiten contra el anticuerpo (6).

Para comprobar una vez más el razonamiento, se manejaron del mismo modo los datos obtenidos en el laboratorio mediante un juego de reactivos para IRMA de **TSH NEO**. Se utilizaron tubos duplicados de cada patrón y los datos individuales que se obtuvieron (sin promediarlos) sirvieron para calcular

Cuadro 4
Validación del modelo de IRMA con datos del fabricante.

E	O	%
0	-3.45	---
10	8.13	-18.70
20	19.21	-3.95
40	41.54	3.85
80	92.39	15.49
160	152.18	-4.89

la línea de regresión. El cuadro 5 contiene los resultados encontrados. El índice de correlación $r_1=0.978$, por ser relativamente bajo, indica que algo no estuvo bien en el análisis, tal vez por un error cometido en el laboratorio. Al observar los resultados se encontró que uno de ellos fue considerablemente menor que el esperado (26.86 en vez de 33.00, o sea, un error de -18.61%. Después de desechar aquel punto, el nuevo índice de correlación fue $r_2=0.999$, que corresponde a una mejor curva de calibración. Los resultados obtenidos con ellas, que son más próximos a los esperados, se muestran en la columna de la extrema derecha. Esto demuestra que cada dato debe ser utilizado individualmente, no el promedio de los datos obtenidos con tubos duplicados, como se señala en algunos instructivos de trabajo (7,9,14-20). En ocasiones se obtienen resultados poco confiables si el intervalo de valores de la concentración de los patrones es muy amplio, como en el caso del IRMA de inmunoglobulina E (IgE), en el cual las concentraciones de los patrones son 0,3,10,100,300,600 y 1000 unidades internacionales por mililitro. La figura 7 muestra la curva patrón que se obtuvo con los datos típicos del fabricante (19). El índice de correlación de sólo **0.943** y la gran curvatura, hacen dudar de la calidad del análisis. Decía el Dr. Chase que, en casos como éste, existe la incertidumbre entre si el análisis es realmente “inmuno” o sólo es “radiométrico”, pues no corresponde al modelo propuesto y validado de IRMA. No cabe duda de

Manejo de datos de radioinmunoanálisis.

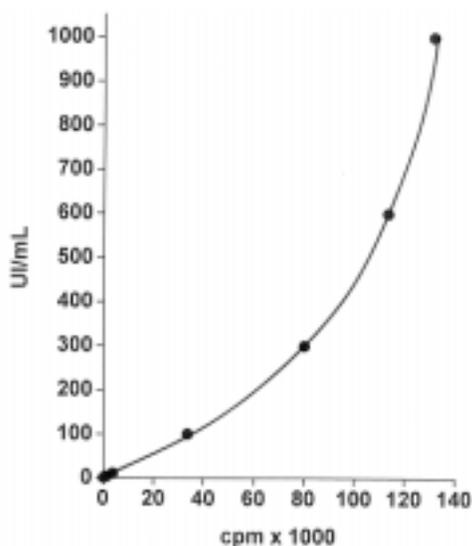


Figura 7.- IRMA de IgE.

que es radiométrico, pues debe medirse la radiactividad, pero no puede asegurarse que corresponda a una reacción inmunológica. Cuando experimentalmente se obtienen datos análogos a éstos, es un arte el encontrar un solo tipo de papel de gráficas adecuado para obtener una línea recta sin desechar algunos puntos y, a veces, se utilizan dos clases de papel para tratar de "linealizar" una parte de los datos en una de ellas y los demás en la otra. Esto no debe de ser aceptado, pues equivale a "usar dos pesas y dos medidas" en el análisis. En estos casos es común que la parte inferior de la curva, que es la más confiable, se represente en papel lineal y la superior en papel logit-log o log-log (19). Sin embargo, ni aun con esta treta se obtiene siempre una línea recta en las concentraciones más altas. Señalaba el Dr. Chase que se ha demostrado experimentalmente que si no se toma en cuenta la función $y = f(x)$, es posible construir una curva de calibración semejante a ésta, utilizando polvo de galletas de soda como ligante o unidor, el cual es más barato, abundante y de más fácil obtención, en vez de emplear un anticuerpo.

El uso de controles.

Algunas personas que efectúan pruebas de RIA o de IRMA consideran que es sospechosa la recomendación de no utilizar los patrones o

Cuadro 5
IRMA con datos del laboratorio.

Patrones	Resultados	
0.0	-0.86	-0.55
0.0	0.23	0.43
6.8	7.62	7.10
6.8	7.84	7.37
17.0	18.49	17.07
17.0	17.06	15.79
33.0	36.32	33.32
33.0	26.86	---
---	$r_1 = 0.978$	$r_2 = 0.999$

calibradores de un lote de reactivos con el trazador y el anticuerpo de otro lote diferente (20). Esto ocasiona que indebidamente se desconfie, pues se sospecha que el fabricante ajusta la concentración "nominal" de los calibradores o patrones para que la curva de calibración resultante sea una recta. Pero debe confiarse, indudablemente, en la concentración asignada a estas sustancias. Sin embargo, con frecuencia se utilizan "controles" de los analitos para verificar que la calidad de los resultados que se obtengan en el laboratorio sean confiables. ¿Serán más exactos los controles que los patrones o calibradores?

Los términos patrón y calibrador se usan indistintamente, pues dichos materiales sirven como puntos de referencia para calcular la concentración de una sustancia en una muestra problema. Sin embargo, técnicamente son diferentes. Un patrón contiene una cantidad "pesada" del analito mientras que un calibrador contiene una cantidad cuyo valor se ha determinado mediante análisis repetidos. El fabricante prepara tanto los patrones o calibradores como los controles a partir de sustancias muy puras, aceptadas internacionalmente. Los controles son tratados en el análisis como si fueran muestras problema y la dispersión de los resultados que se obtengan debe quedar comprendida dentro de los límites establecidos por el fabricante (21). Aunque,

JH Alvarez-Cervera.

por un lado, la idea parece buena, por el otro salta a la vista que es innecesario utilizar controles para verificar la calidad del RIA o del IRMA. Se vio anteriormente que al interpolar en la curva de calibración los datos obtenidos con cada uno de los patrones se puede determinar experimentalmente su concentración y compararla con el valor esperado. Además, se debe de ser cauteloso con el uso de controles, como se verá a continuación.

El criterio utilizado frecuentemente en química clínica para que un sistema analítico “esté bajo control”, fija límites de confianza de dos desviaciones estándar alrededor de cada punto de la curva patrón. Estos límites incluyen, aproximadamente, el 95% de los valores obtenidos al medir repetidamente una misma muestra. En estas condiciones, en un análisis “controlado”, uno de cada veinte resultados obtenidos al analizar sucesivamente la misma muestra, o sea, el 5%, puede quedar fuera de estos límites. Pero, también, de acuerdo con este criterio, uno de cada veinte resultados que reciba el médico, de un mismo tipo de estudio, puede estar fuera de dichos límites de confianza.

El cuadro 6 muestra, como ejemplo, un grupo de tres controles de concentraciones baja, media y alta de **TSH NEO, I, II y III**, respectivamente (17). La columna denominada Valores Esperados contiene los valores extremos que debe obtener el laboratorista para que se confirme la compatibilidad de sus resultados con los datos clínicos que posea el médico. La columna de la extrema derecha muestra el por ciento de error de los valores máximos y mínimos. De acuerdo con estos límites, se considera que los resultados son confiables aunque sean hasta 20% más altos o más bajos que los esperados, con lo cual se desperdician métodos tan sensibles como son el RIA y el IRMA. ¿Qué se pensaría en otra rama de las ciencias si se aplicara un criterio como éste? ¿Cómo reaccionaríamos si supiéramos que el resultado que nos dieron al analizar una muestra de nosotros mismos tuviera un error de 20%? ¿Beberíamos un vaso de agua con 20% de impurezas? ¿Quedaríamos satisfechos si el Banco nos pagara por nuestros ahorros 20% menos de lo acordado?

Revista Biomédica

Cuadro 6
Resultados obtenidos con controles.

	Valores Esperados μUI/mL	% Error
I	21.4 ± 4.4	±20.56
II	42.7 ± 7.7	±18.03
III	78.2±12.5	±15.98

CONCLUSIONES.

Los ejemplos anteriores muestran que puede efectuarse correctamente el manejo de datos de RIA y de IRMA de manera gráfica. Sin embargo, es obvio que el empleo de una pequeña calculadora electrónica es de gran utilidad y con ella, además, no se requiere utilizar papel de gráficas. No cabe duda de que el manejo de datos mediante una computadora ofrece aún más ventajas, pero no debe de olvidarse que la computadora en sí no garantiza la calidad de los resultados ya que ésta depende de la exactitud de la información que se le proporcione y del “software” que se utilice. Las características del enfoque del Dr. Chase para manejar datos de RIA y de IRMA son las siguientes:

Utiliza el índice de correlación de la curva patrón como indicador de la calidad del análisis.

Emplea la pendiente de la curva como otro parámetro importante para el control de calidad entre un lote de análisis y otro, pues representa la sensibilidad del análisis.

Identifica puntos sospechosos en la curva de calibración.

Hace innecesario el uso de controles, ya que la curva patrón informa acerca de la magnitud del error, al determinar experimentalmente la concentración de cada patrón o calibrador, lo cual ahorra tiempo, esfuerzo y costo.

Puede señalar cuándo desechar los reactivos por haberse degradado éstos.

*Manejo de datos de radioinmunoanálisis.***REFERENCIAS.**

- 1.- Rudin SA. The art of finding the right graph paper to get a straight line. En: Weber RL, editor. A random walk in science. The Institute of Physics, London: Crane, Rossak & Co.; 1973, p. 88-9.
- 2.- Chase GD. Some concepts of RIA theory, data reduction, and quality control. I. Basic approaches to data reduction. The Ligand Quarterly 1979; 2: 25-8.
- 3.- Chase GD. Some concepts of RIA theory, data reduction, and quality control. II. The "ideal" RIA. The Ligand Quarterly 1979; 2: 29-32.
- 4.- Chase GD. Some concepts of RIA theory, data reduction, and quality control. III. The Scatchard plot and the equilibrium model. The Ligand Quarterly 1979; 2: 30-4.
- 5.- Bremner WS, Chase GD. Some concepts of RIA theory, data reduction, and quality control. IV. Binding mechanisms and nonlinear Scatchard plots. The Ligand Quarterly 1980; 3: 21-3.
- 6.- Chase GD. Principles of RIA data management. En: Ashkar FS, editor. Radiobioassays, Vol. I, Boca Raton: CRC Press; 1983. p. 36-76.
- 7.- Anónimo. Total T4 C-A-C. PITK4-N. Los Angeles: Diagnostic Products; Dec. 4, 1998.
- 8.- Leiva WA. RIA test system quality control. 1097-RIA-77-1T. Irvine: Beckman Scientific Instruments Division, p. 14.
- 9.- Anónimo. HCG Double Antibody. PIKCGD-P. Los Angeles: Diagnostic Products; Oct. 31, 1997.
- 10.- Bauer EL. Manual de estadística para químicos. Madrid: Editorial Alhambra; 1974. p. 104-15.
- 11.- Horwit W. Analytical Food Chemistry, Section II. FDA Bylines N° 6. Washington (DC): U.S.Gov. Print. Off.; 1976. p. 283.
- 12.- Yalow RS, Berson SA. Introduction and considerations. En: Odell WD, Daughaday WH, editores. Principles of competitive protein-binding assays. Philadelphia: JB Lippincott; 1971. p. 1-24.
- 13.- Ekins R. Misunderstanding about assay sensitivity and precision. The Ligand Quarterly 1981, 4: 60-72.
- 14.- Anónimo. Progesterone C-A-C. PITKPG-G Los Angeles: Diagnostic Products; Nov. 11, 1998.
- 15.- Anónimo. Estradiol C-A-C. PITKE2-G. Los Angeles: Diagnostic Products; Mar. 17, 1997.
- 16.- Anónimo. Total testosterone C-A-C. PITUTT-B. Los Angeles: Diagnostic Products; Jan. 12, 1999.
- 17.- Anónimo. Neonatal TSH ImmuChem Coated Tube. 816941. Costa Mesa: ICN Biomedichals; Rev. B (3-93).
- 18.- Anónimo. TSH ImmuChem Coated Tube. 07815941.5. Costa Mesa: ICN Pharmaceuticals. QER NO.: 99-367; 10/1399.
- 19.- Anónimo. Total IgE IRMA C-A-C. PIIKIE-Q. Los Angeles: Diagnostic Products; Apr. 30, 1997.
- 20.- Anónimo. HCG IRMA C-A-C. PIIKCG-K. Los Angeles: Diagnostic Products; Dec. 24, 1997.
- 21.- Anónimo. Standards, controls and linearity reagents. Los Angeles: Sigma Diagnostics. Sin fecha.