

MX 9500017
INIS-mf-14598



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERÍSTICAS DE CALIDAD DE REACTIVOS
PARA EL RADIOINMUNOANÁLISIS DE TIROXINA
Y TIROTROFINA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
CARLOS EDUARDO VERDEJA IBARRA



MEXICO, D. F.



1984

CIUDAD UNIVERSITARIA



FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios
Profesionales
Exp. Núm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Cefe de la División de Estudios Profesionales
Universidad Nacional Autónoma de México.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo
revisado el trabajo de tesis que realiza el pasante _____

Carlos Eduardo Verdeja Ibarra
con número de cuenta 8128210-4 con el título: _____
Características de calidad de reactivos para el radioinmunoanálisis de tiroxina y tirotropina.

Consideramos que reúne _____ los méritos necesarios para que pueda conti-
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de _____
Biólogo.

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

FIRMA

M. en C. Fernando Zambrano Achirica
Director de Tesis

Dr. René Cárdenas Vázquez

M. en C. Luisa Alba Lois

Dra. Judith Guzmán Rincón
Suplente

Biól. Abel Martínez Ocampo
Suplente

Ciudad Universitaria, D.F., a 18 de Mayo de 1994

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de radioinmunoanálisis del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares bajo la supervisión del M. en C. Fernando Zambrano A. Mis mas sinceras gracias a él, y de una manera especial a la Q.F.B. Consuelo Lavalley E. y a las personas que laboran en este laboratorio: Q. Baldomero D., Q.F.B Guillermina Ferro F. y a la M. en C. Judith Lezama C.; así como a los técnicos Ma de la Paz Gonzalez V. y a Betriz Rivera A.

*A mis padres, porque no es fácil decir,
ni siquiera mencionar, todo lo que he
recibido de ellos, que ha sido inmenso
y bueno.*

*A mis hermanos, por su paciencia y
carinho.*

*A Alberto, por mostrarme que la vida
es un ciclo lleno de sorpresas increi-
bles y maravillosas.*

INDICE

I INTRODUCCION.

9

- 1 Hormonas.
- 1.1 Forma de actuación de la señal y receptores.
- 2 Sistema endócrino.
- 2.1 Funciones del sistema endócrino.
- 3 Relaciones reguladoras entre las glándulas endócrinas.
- 3.1 Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.
- 3.1.1 Hipotálamo.
- 3.1.2 Hipófisis.
- 3.1.3 Tiroides.
- 4 Hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.
- 4.1 La tirotropina, una hormona hipofisiaria.
- 4.2 Hormonas tiroideas.
- 4.2.1 Tiroxina (T4).
- 4.2.1.1 Forma de actuación de la tiroxina.
- 4.2.2 Triyodotironina (T3).
- 5 Transtornos en la tiroides.
- 5.1 Hipertiroidismo.
- 5.2 Hipotiroidismo.
- 5.3 Tiroiditis.
- 5.4 Bocio.
- 6 El Radioinmunoanálisis.
- 7 Bases y desarrollo del radioinmunoanálisis.
- 8 Partes que componen un radioinmunoanálisis.
- 8.1 Radiotrazador.

- 8.1.1 Características del radionúclido.
- 8.1.2 Isótopos usados en el RIA.
- 8.1.3 Actividad específica.
- 8.1.4 Marcaje de la molécula.
- 8.1.5 Purificación de la molécula marcada.
- 8.2 Anticuerpos.
 - 8.2.1 Afinidad.
 - 8.2.2 Especificidad.
 - 8.2.3 Título.
- 8.3 Sistema de separación.
 - 8.3.1 Métodos de separación.
 - 8.3.2 Sistema de separación por doble anticuerpo.
- 8.4 Calibradores.

II OBJETIVOS.

30

III CONTROL DE CALIDAD EN EL RADIOINMUNOANALISIS. 32

- 1 Concepto de control de calidad.
- 2 Control de calidad interno y externo.
 - 2.1 Control de calidad externo.
 - 2.2 Control de calidad interno.
- 3 Objetivos de un control de calidad interno.
- 4 Control de calidad interno, control de calidad intra e inter-ensayo.
- 5 Control de calidad intra-ensayo.
 - 5.1 Parámetros de la curva.
 - 5.1.1 Cuentas totales.
 - 5.1.2 Unión máxima (U_0).
 - 5.1.3 Unión no específica (UNE).
 - 5.1.4 Porcentaje de unión al 50%.

- 5.1.5 Porcentaje de unión al 80 y 20 por ciento.
- 5.1.6 Pendiente.
- 5.2 Muestras de control de calidad.

- 6 Pruebas estadísticas usadas en el control de calidad intra-ensayo.
 - 6.1 Desviación estandar del calibrador.
 - 6.2 Coeficiente de variación entre duplicados.
- 7 Control de calidad inter-ensayo.
 - 7.1 Muestras de control de calidad.
 - 7.2 Cartas de control de Shewart.
 - 7.3 Coeficiente de variación entre datos.

- 8 Pruebas de calidad de los estuches integrados.
 - 8.1 Estadística básica.
 - 8.2 Reactividad cruzada.
 - 8.3 Prueba de paralelismo a desconocidos.
 - 8.4 Prueba de recuperación.
 - 8.5 Coeficiente de variación intra e inter-ensayo a 3 niveles de dosis.
 - 8.6 Sensibilidad.
 - 8.7 Rango normal de estudio.
 - 8.8 Efectos de variables como tiempo, temperatura, etc.
 - 8.9 Correlación clínica.

IV MATERIALES Y METODOS.

39

- 1 Equipo y materiales utilizados.

- 2 Reactivos utilizados.
 - 2.1 Reactivos para el RIA de tiroxina.
 - 2.1.1 Protocolo para el RIA de tiroxina.
 - 2.1.2 Cálculo de resultados.
 - 2.2 Reactivos para el RIA de tirotropina.
 - 2.2.1 Protocolo para el RIA de tirotropina.
 - 2.2.2 Cálculo de resultados.

- 3 Protocolo de las pruebas efectuadas a los reactivos destinados a T4.
 - 3.1 Prueba de recuperación.
 - 3.2 Prueba de paralelismo.
 - 3.3 Efectos de variables.
 - 3.3.1 Prueba de variación del tiempo de centrifugado.
 - 3.3.2 Variación en la temperatura de centrifugado.
 - 3.4 Reactividad cruzada.
 - 3.5 Variación inter-ensayo.
 - 3.6 Variación intra-ensayo.
 - 3.7 Parámetros de la curva.
 - 3.8 Mínima dosis detectable.

- 4 Protocolo de las pruebas efectuadas a los reactivos para TSH.
 - 4.1 Prueba de recuperación.
 - 4.2 Prueba de paralelismo.
 - 4.3 Prueba de reactividad cruzada.
 - 4.4 Efectos de variables.
 - 4.4.1 Efecto de variar el tiempo de incubación.
 - 4.4.2 Efecto del cambio de matriz en la elaboración de los reactivos.
 - 4.4.3 Efecto del cambio de matriz en la mínima dosis detectable.
 - 4.5 Variación intra-ensayo.
 - 4.6 Variación inter-ensayo.
 - 4.7 Parámetros de la curva.
 - 4.8 Mínima dosis detectable.

V RESULTADOS Y DISCUSION.

48

- 1 Resultados obtenidos para las pruebas efectuadas en los reactivos para T4.
 - 1.1 Recuperación.
 - 1.2 Paralelismo.
 - 1.3 Efecto de variar el tiempo de centrifugado.
 - 1.4 Efecto de variar la temperatura de centrifugado.
 - 1.5 Reactividad cruzada.
 - 1.6 Variación inter-ensayo.

1.7	Variación intra-ensayo.
1.8	Parámetros de la curva.
1.9	Mínima dosis detectable.
2	Resultados obtenidos para las pruebas efectuadas en los reactivos para TSH.
2.1	Recuperación.
2.2	Paralelismo.
2.3	Reactividad cruzada.
2.4	Efecto de variar el tiempo de incubación en los datos obtenidos en la mínima dosis detectable.
2.5	Efecto del cambio de matriz.
2.6	Efecto del cambio de matriz en la mínima dosis detectable.
2.7	Variación inter-ensayo.
2.8	Variación intra-ensayo.
2.9	Parámetros de la curva.
2.10	Mínima dosis detectable.

VI CONCLUSIONES.	67
-------------------------	-----------

VII COMENTARIOS FINALES.	69
---------------------------------	-----------

VIII BIBLIOGRAFIA.	70
---------------------------	-----------

I INTRODUCCION.

I Hormonas.

Todo ser vivo debe su existencia al funcionamiento armónico de las partes que lo forman, lo que es resultado de una comunicación adecuada entre las mismas. A nivel celular, en todos los organismos multicelulares se ha desarrollado un gran sistema de comunicación que coordina el desarrollo, la diferenciación y el metabolismo de cada una de las células que forman los diversos tejidos y órganos.

La comunicación entre las células esta mediada por diversas moléculas que son sintetizadas en la célula que emite el mensaje y posteriormente vertidas al exterior de la misma para viajar a las células blanco, las que reciben la señal gracias a receptores específicos.

Dependiendo de la distancia que deba viajar la señal, estas pueden ser clasificadas como parácrinas, autócrinas y endócrinas. En las parácrinas, la célula emisora esta cercana a la célula receptora y el efecto de la señal se manifiesta únicamente en una célula o grupo de células adyacentes. Este seria el caso de la conducción del impulso nervioso de una neurona a otra, que es mediado por los neurotransmisores (Darnell *et al.*, 1991).

En las señales autócrinas, la célula responde a sustancias que ella misma libera. Mientras que en las endócrinas, las células de los órganos endócrinos liberan **hormonas** (del griego excitar o remover) que son moléculas que funcionan como señales y que actúan a distancia de las células emisoras en un grupo de células blanco, las hormonas son transportadas a través del torrente sanguíneo hasta su sitio de acción (Ville *et al.*, 1978; Darnell *et al.*, 1991).

Las hormonas pueden ser clasificadas en tres tipos: (1) hormonas peptídicas, que incluyen a todas las hormonas del hipotálamo y la hipófisis; (2) hormonas con función amina, estas incluyen a la adrenalina y a las hormonas tiroideas y (3) hormonas esteroides, que son liposolubles y comprenden a las hormonas adrenocorticales, los andrógenos y estrógenos (Lenhinger, 1988).

De una manera general, la comunicación por medio de señales extracelulares normalmente involucra seis pasos: (1) la síntesis de la molécula mensajera, (2) liberación de la misma por parte de la célula emisora; (3) transporte hacia la célula blanco; (4) detección de la señal por receptores específicos; (5) cambios en el metabolismo celular disparados por el complejo receptor-sígnal y (6) remoción de la señal al terminar la respuesta de la célula (Darnell *et al.*, 1991).

1.1 Forma de actuación de la señal y receptores

Como ya se ha mencionado, la célula al recibir una señal específica cambia su actividad para responder a ésta. En algunos casos, la señal origina que se desencadene la actividad de una o varias enzimas, que actúan modificando las condiciones físicas y químicas de la misma. En otros casos, lo que se altera es el patrón de la expresión genética. Por lo general esta es la forma en la que actúan las moléculas poco solubles en agua, pero solubles en lípidos.

Para registrar la señal, la célula cuenta con receptores específicos. Estos pueden encontrarse en la superficie celular, en el citosol o bien en el núcleo. Además, cada célula puede tener uno o más receptores para diferentes tipos de moléculas. Es necesario mencionar dos aspectos importantes de esta relación ligando-receptor, y es que existe una especificidad de unión, ya que un solo tipo de ligando puede unirse a solo un tipo de receptor; así como un efecto específico, pues solamente un ligando puede desencadenar un tipo de cambio en el comportamiento celular. Utilizando este tipo de propiedades ligando-receptor, es como se han desarrollado los ensayos de radio-receptores como un método para la cuantificación de ligandos (Darnell *et al.*, 1991; Lenhinger, 1988).

2 Sistema endócrino.

Una glándula es una especialización del epitelio cuya función es la secreción. Normalmente estas secreciones difieren de la linfa, plasma y el líquido tisular por las sustancias presentes en ellas. Así, el sudor, la leche, las hormonas, las enzimas y las mucinas son secreciones glandulares. Las glándulas, de una manera general, pueden clasificarse en **exócrinas** y **endócrinas**. Las primeras poseen conductos que conectan sus células secretoras con las superficies epiteliales de las cuales derivan; mientras que las últimas no presentan conductos y vierten sus secreciones, las hormonas, directamente a la sangre. Debido a esto, las secreciones son difundidas a todo el cuerpo, lo que ocasiona que se tengan dificultades en precisar sus funciones de una manera exacta (Darnell *et al.*, 1991; Crouch, 1978).

Existe una diversidad de glándulas dispersas a través de todo el cuerpo. Estas se encuentran asociadas de manera estrecha a otros sistemas y tienen diversos orígenes embriológicos, por lo que desde este punto no existe justificación para considerarlas como partes de un sistema anatómico. Pero, a medida que se conocen sus funciones, se ha descubierto que forman un grupo integrado de órganos, cuyas secreciones se controlan unos a otros así como a otros tejidos y órganos del cuerpo, por lo que es en este punto donde se encuentra la justificación para llamarlas **sistema endócrino** (Crouch, 1978) Fig (1).

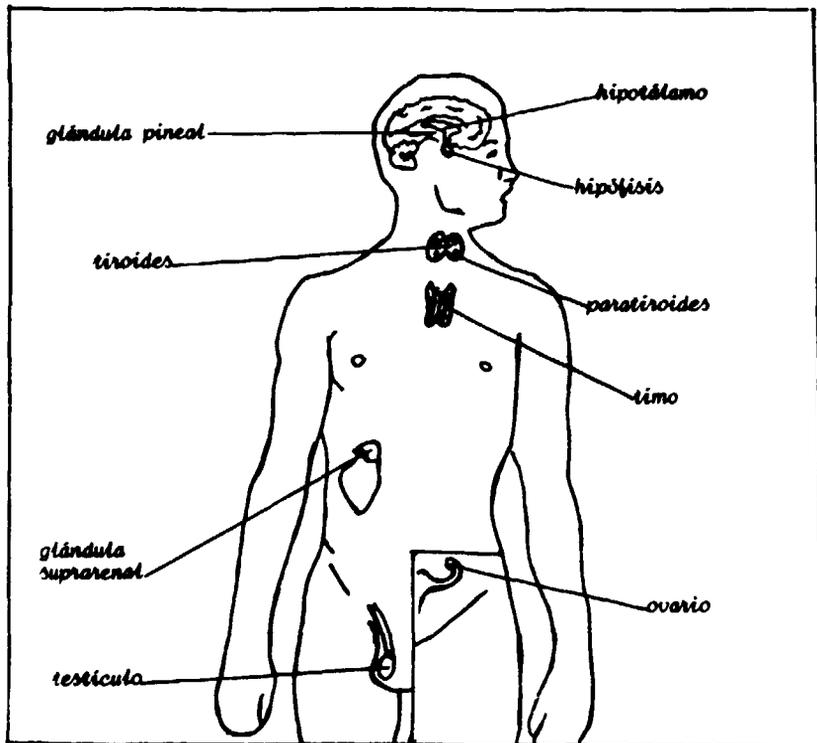


fig (1) Localización de algunas glándulas en el cuerpo humano.

2.1 Funciones del sistema endócrino.

Las funciones del sistema endócrino pueden, de una manera general, resumirse de la siguiente manera:

- 1.-Se encarga de la integración funcional de diversos tejidos y órganos del cuerpo, particularmente con aquellos que tienen que ver con los procesos metabólicos.
- 2.-Tiene que ver con el desarrollo y crecimiento del cuerpo como un todo.
- 3.-Esta presente en el desarrollo, crecimiento y regulación de gónadas y órganos sexuales secundarios.
- 4.-Participa en la regulación de sales presentes en el cuerpo, así como la regulación de las tasas de metabolismo y catabolismo de grasas, proteínas e hidratos de carbono (Crouch, 1978).

3 Relaciones reguladoras entre las glándulas endocrinas.

3.1 Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.

3.1.1 Hipotálamo.

Para que exista un óptimo funcionamiento del sistema endócrino, es necesario que se dé una adecuada comunicación entre las glándulas que lo forman así como un centro de coordinación. Este último papel es llevado a cabo por el hipotálamo, que se encuentra localizado en la base del cerebro, por delante del quiasma óptico y es la parte más vascularizada del cerebro. Mide aproximadamente dos centímetros y su peso es de alrededor de 4g (Crouch, 1978).

El hipotálamo recibe e integra señales que provienen del sistema nervioso central y como respuesta a estas produce un cierto número de hormonas reguladoras hipotalámicas, que son enviadas a la glándula hipófisis (pituitaria), localizada inmediatamente por debajo de esta (Crouch, 1978; Lenhinger, 1988).

Las hormonas hipotalámicas intervienen en las funciones de tipo neurovegetativo y contribuyen a la regulación de la temperatura corporal. A diferencia de otras hormonas, las hormonas secretadas por el hipotálamo no son vertidas al torrente sanguíneo, sino que se vierten a una serie de vasos que las llevan directamente a la glándula hipofisiaria (Crouch, 1978).

Las hormonas del hipotálamo son polipéptidos relativamente cortos. van de 3 a 15 restos aminoácidos. De todas las hormonas conocidas, estas son las que se segregan en menor cantidad, ya que, a manera de ejemplo, solamente fue posible aislar un miligramo de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) a partir de cuatro toneladas de tejido hipotalámico de cerdo tras años de trabajo. Por este logro y por demostrar su estructura química, Roger Guillemin y Andrew Schally recibieron el premio Nobel en 1977 junto con Rosalyn Yalow, quien perfeccionó el método de radioinmunoensayo, muy adecuado para la cuantificación de hormonas cuyas concentraciones en sangre son muy bajas (Lenhinger, 1988).

3.1.2 Hipófisis

La hipófisis tiene el tamaño aproximado de un chícharo y descansa en la silla turca del esfenoides. En su parte superior se encuentra unida al hipotálamo por un tallo, el infundíbulo. Tiene un doble origen aunque procede de la misma capa germinativa, el ectodermo. La parte anterior, la adenohipófisis, deriva de un divertículo del ectodermo del techo del estomodeo (bolsa de Rathke); mientras que la parte posterior, la neurohipófisis, es un divertículo del hipotálamo. La irrigación de la hipófisis es abundante, pues existen de 18 a 20 ramificaciones superiores e inferiores que llegan a ella procedentes de la carótida (Crouch, 1978; Ham et al, 1988).

La hipófisis responde a las hormonas que secreta el hipotálamo de dos maneras, secretando o inhibiendo sus propias hormonas. La secreción de las hormonas hipofisiarias puede darse en su parte anterior o posterior, dependiendo del tipo de hormona hipotalámica que la haya estimulado.

Entre las hormonas que segrega la adenohipófisis se encuentran las llamadas hormonas trópicas o tropinas que son polipéptidos relativamente grandes, cuyos pesos moleculares van de 4500 daltons, que es el caso de la corticotropina, a 34000 dalto. de la hormona foliculo-estimulante (FSH) (Lenhinger, 1988).

Entre las tropinas están la ya mencionada corticotropina, la tirotrópina (TSH), la hormona foliculo estimulante (FSH), la hormona leutinizante LH, la prolactina, y la somatropina. En cuanto a la neurohipófisis, esta se encarga de secretar dos hormonas características, la oxitocina y la vasopresina, péptidos de nueve residuos que se forman a partir de precursores más largos (Lenhinger, 1988). Fig (2).

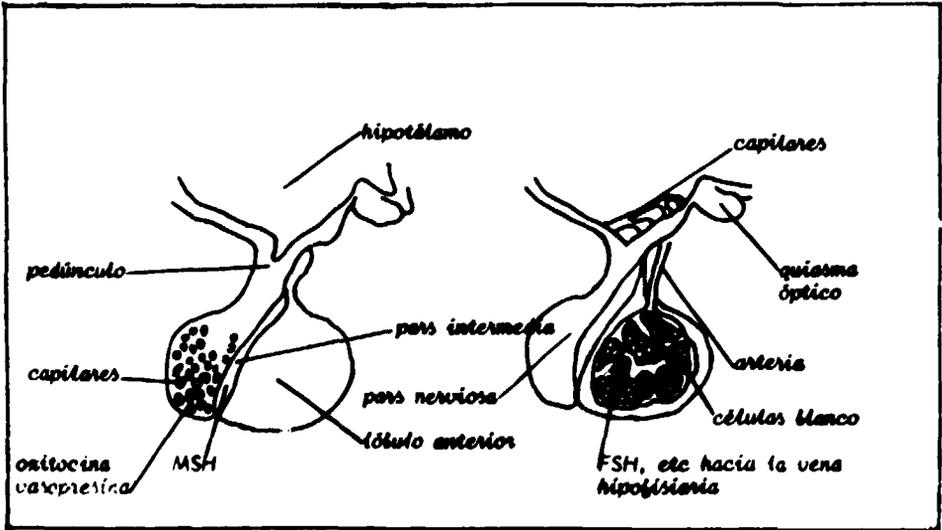


Fig (2) La hipófisis y sus partes.

3.1.3 La tiroides.

La tiroides es la más grande de las glándulas endócrinas, pues tiene un peso que puede ir entre los 20 y 30 g. Esta localizada en la región del cuello, a la altura del segundo o tercer disco de la tráquea. Consta de dos lóbulos que se unen por medio del istmo (Ham *et al.* 1988).

Es una de las glándulas más vascularizadas del cuerpo, ya que recibe la sangre por medio de dos arterias tiroideas, una superior y otra inferior. Es drenada por las venas tiroideas inferior, media y superior. Su inervación proviene de la porción cervical del tronco simpático, sus fibras parasimpáticas del vago (Crouch, 1978); (Ham *et al.*, 1988).

Microscópicamente, la tiroides esta formada por grupos de folículos asociados estrechamente con capilares sanguíneos y linfáticos. Las paredes de los folículos son de epitelio cúbico simple o columnar con microvellosidades, el cual descansa en una capa fina de tejido conectivo. Los folículos están llenos de un coloide cuyo principal componente es la tiroglobulina, glucoproteína con un peso molecular aproximado de 660,000 daltons. La tiroglobulina constituye el centro de almacenamiento de las hormonas de la tiroides (Ham *et al.*, 1988; Crouch, 1978).

Las hormonas de la tiroides estimulan el catabolismo de la glucosa, grasas y proteínas ya que provocan un aumento en los niveles de las enzimas que catalizan estas reacciones metabólicas, como son las hexoquinasas del hígado y las enzimas mitocondriales de la fosforilación oxidativa. Fig (3)

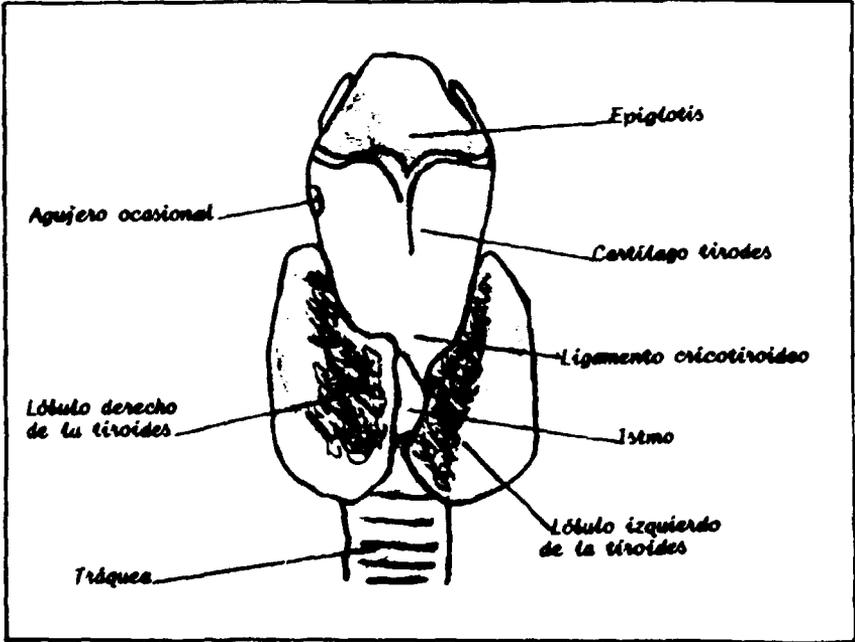


Fig (3) La tiroides y algunas de sus partes.

4 Hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.

4.1 La TSH, una hormona hipofisiaria.

La técnica del radioinmunoanálisis ha sido un vehículo que ha permitido obtener nueva información sobre conceptos relacionados con la fisiología y patofisiología de las hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.

La hormona estimulante de la tiroides (TSH), también conocida como tirotropina, ocupa una posición central en dicho eje. La TSH es sintetizada por la hipófisis anterior y es una hormona glucoproteica compuesta por dos sub-unidades diferentes, conocidas como alfa y beta. Tiene un peso molecular de 28,000 daltons. Ya que la subunidad alfa es sustancialmente parecida a otras en su secuencia, se cree que es la subunidad beta la que confiere a la hormona su especificidad de acción (Freeman *et al.*, 1977).

La TSH estimula la producción de las hormonas tiroideas tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). Es de opinión general que estas últimas ejercen una inhibición por retroacción de la secreción hipofisiaria de la TSH. Esta respuesta se halla modulada por el hipotálamo. Cuando la circulación de las hormonas tiroideas en la sangre disminuye por debajo de un valor crítico, el mecanismo de retroacción, que funciona a nivel hipofisiario, provoca un incremento de la TSH. La mayor producción de TSH estimula la actividad de la tiroides y provoca una liberación de las hormonas tiroideas. El aumento en la concentración de estas hormonas en la sangre es registrado por la hipófisis; que actúa produciendo un intermediario proteico que interfiere con el estímulo de la hormona liberadora de tirotropina (TRH). La TRH es producida por el hipotálamo y regula la secreción de la TSH (Crouch, 1978).

Los detalles de la acción de las hormonas tiroideas a nivel hipofisiario y su relativa importancia en la supresión de la secreción de la TSH aun no es clara. Fig (4).

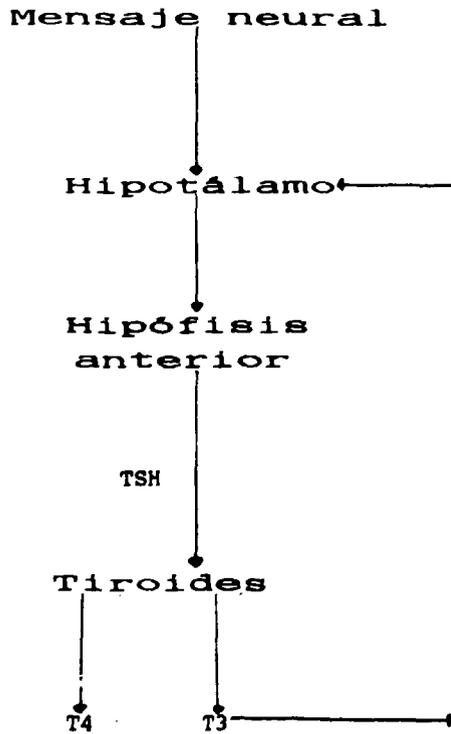


Fig (4). Esquema de la regulación hipotálamo-hipófisis-tiroides.

4.2 Hormonas tiroideas.

Se ha mencionado que la tiroglobulina es el principal componente del coloide localizado en los folículos de la tiroides. La tiroglobulina es la molécula base a partir de la cual se sintetizan las hormonas tiroideas T4 y T3. Los pasos implicados en su síntesis son:

- 1) Captación del yodo y su transformación a una forma activa.
- 2) Unión de la forma activa del yodo con las tirosinas presentes en la tiroglobulina para formar yodotirosina.
- 3) Acoplamiento de los residuos de yodotirosilo para formar las yodotironinas: tiroxina y triyodotironina.
- 4) Proteólisis de la tiroglobulina con liberación de T4 y T3 (Crouch, 1978).

4.2.1 Tiroxina.

La tiroxina o tetrayodotironina, junto con la triyodotironina, es una hormona que se produce en la glándula tiroides como respuesta a la secreción de TSH. Tan pronto es sintetizada es vertida al torrente sanguíneo. Por ser una molécula poco soluble en agua es transportada unida a proteínas. De esta manera, aproximadamente un 70% del total en sangre esta ligada a la globulina fijadora de tiroxina (TBG), un 20% a la prealbúmina fijadora de tiroxina (TBPA) y un 10% a la albúmina (Crouch, 1978).

Su vida funcional en el torrente sanguíneo es de algunos días y sus efectos en las células blanco pueden ir de horas a días. Su concentración total en el suero varia aproximadamente entre 5.5 y 12.5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (72 a 163 nmol/l) y aunque esta enlazada a proteínas en su mayor parte, un pequeño porcentaje permanece libre, entre 0.002 y 0.004%, es esta pequeñísima fracción la que se considera biológicamente activa (Crouch, 1978).

4.2.1.1 Forma de actuación de la tiroxina.

Al llegar a la célula blanco, la hormona cruza la membrana plasmática y se une a receptores localizados en el núcleo o citosol. Estos complejos hormona receptor tienden a acumularse en el núcleo; en este sitio se unen a ciertas secuencias del ADN provocando un incremento o decremento del rango de transcripción de los genes adyacentes. Estos complejos receptor-ligando incluso pueden afectar la estabilidad de la secuencia del ARNm. Como resultado principal de estas interacciones, se produce un cambio en la velocidad metabólica

basal (Darnell et al, 1991). La velocidad metabólica basal constituye una medida del consumo de oxígeno de un individuo en estado de reposo después de doce horas de haber consumido alimentos en proporción con el área de la superficie de su cuerpo. Esta se expresa como una desviación porcentual del valor medio de individuos del mismo sexo, peso y estatura (Lenhinger, 1988).

4.2.3 Triyodotironina

La triyodotironina, al igual que la T4, es vertida inmediatamente tan pronto se produce su síntesis. Esta se encuentra ligada en su mayor parte a la TBG, aunque es probable que también se una a la TBPA y a la albúmina; aunque su afinidad a estas es inferior a la que presenta la T4.

Su vida media biológica o de recambio, es de un día. Esto se ha atribuido principalmente a la unión menos firme que tiene a las proteínas plasmáticas.

Su concentración total en sangre varía de 100 a 220 ng/dl (1.5 a 3.4 nmol/l) y su fracción libre es entre un 0.2 y 0.4%. Se ha calculado que entre un 65 y 75% del efecto metabólico total en el hombre de las hormonas tiroideas se debe a la T3. Algunos investigadores creen que la T4 realmente es una prohormona que ha de convertirse en T3 para producir sus efectos; aunque existen pruebas de que la T4 tiene una actividad hormonal intrínseca (Henry, 1984).

5 Transtornos en la tiroides.

Los transtornos que se presentan en la tiroides pueden clasificarse, de acuerdo a una base funcional en dos tipos: hipotiroidismo e hipertiroidismo. Estos transtornos pueden tener su origen por un bocio, una tiroiditis o un tumor en la tiroides (Henry, 1984).

5.1 Hipertiroidismo.

Este término se utiliza para referirse a los transtornos que se presentan en el organismo por una exposición excesiva a las hormonas tiroideas. Entre los síntomas que se presentan están: intolerancia al calor, taquicardia, palpitaciones, pérdida de peso, debilidad, inestabilidad emocional, temblor y aumento de la presión sanguínea.

La enfermedad de Graves es el síndrome clínico asociado más comúnmente al hipertiroidismo. Este puede tener una, dos o la totalidad de las siguientes manifestaciones: hipertiroidismo con bocio difuso, oftalmopatía infiltrativa y dermatopatía infiltrativa (mixedema pretibial).

Esta enfermedad es aproximadamente 5 veces más común en mujeres que en hombres y se manifiesta normalmente entre la tercera y cuarta década de vida; aunque esto no excluye la posibilidad de que se presente a cualquier edad.

Normalmente, una persona presenta síntomas de hipertiroidismo con un aumento en el tamaño de la tiroides.

Otras causas de hipertiroidismo incluyen tumores hipofisarios secretores de TSH y carcinomas de la tiroides. También se ha descrito un síndrome de hipertiroidismo inducido por la TSH posiblemente debido a anomalías en los mecanismos de retroacción hipofisaria (Gershengorn, 1975).

En la mayoría de los pacientes con hipertiroidismo se aprecian concentraciones elevadas de T4, T4 libre y T3 total. Los valores séricos de la TSH se mantienen dentro de los límites normales.

Otro de los síntomas que pueden asociarse al hipertiroidismo es la tiroiditis subaguda, en la cual los pacientes suelen experimentar malestar, ligero aumento de la temperatura, dificultad de deglutir alimentos y en general, aunque no siempre, reblandecimiento de la tiroides (Henry, 1984).

5.2 Hipotiroidismo.

El hipotiroidismo ocurre cuando existe una falta de acción de las hormonas tiroideas en los tejidos. Los síntomas pueden incluir voz ronca, sensibilidad al frío, piel seca y debilidad muscular. La sintomatología puede variar dependiendo de la gravedad del mismo.

El coma del mixedema es un estado avanzado de la deficiencia de la hormona tiroidea y se caracteriza por un estupor progresivo, hipotermia e hiperventilación. Se asocia con acidosis respiratoria, hiponatremia e hipoglucemia. El cretinismo es el término que se emplea para describir el fallo funcional de la tiroides en los recién nacidos, se caracteriza por un retraso mental (Henry, 1984).

Para reducir al mínimo o prevenir esto último, es esencial un diagnóstico y tratamiento temprano de estos pacientes. El diagnóstico depende de ordinario de la detección de los niveles anormalmente bajos de las hormonas tiroideas en la circulación y, en pacientes con hipotiroidismo primario, de niveles elevados de TSH (Henry, 1984).

La causa más común de hipotiroidismo es debida al fallo de la propia tiroides, de forma que no secreta cantidades adecuadas de hormona. Este tipo de hipotiroidismo recibe el nombre de hipotiroidismo primario. El hipotiroidismo primario se asocia normalmente con una atrofia de la glándula (Henry, 1984).

Otra causa del hipotiroidismo es cuando se produce una lesión destructiva en la hipófisis. En este caso, se presenta un hipotiroidismo secundario. Una enfermedad hipotalámica puede conducir a una mala liberación de TSH, que puede provocar también hipotiroidismo (Henry, 1984).

El nivel sérico de la TSH es el índice más sensible del fallo de la tiroides. Los niveles séricos elevados son útiles para diagnosticar un hipotiroidismo primario, especialmente en pacientes con valores bajos de T4 libre. En pacientes con fallo hipotalámico o de la hipófisis anterior, las concentraciones séricas de TSH no suelen aumentar (Henry, 1984).

5.3 Tiroiditis.

Este término se emplea para designar a un grupo de trastornos inflamatorios de la tiroides que pueden clasificarse en crónicos y agudos.

Existen dos tipos de tiroiditis crónica: el estruma de Riedel, un tipo raro de tiroiditis esclerosante crónica, y la tiroiditis de Hashimoto. Los pacientes que la padecen suelen presentar una tiroides agrandada, pero por lo demás, no existen mayores síntomas (Henry, 1984).

La tiroiditis supurativa aguda es debida a una infección bacteriana severa de la tiroides. Esta puede reconocerse por signos de inflamación y dolor agudos. Otro tipo de tiroiditis es la subaguda, en la que la tiroides puede aparecer agrandada y blanda. Esta parece estar relacionada con una infección viral.

La tiroiditis normalmente se caracteriza por un eutiroidismo, aunque también puede asociarse a hipertiroidismo y, en algunos casos, conducir a un hipotiroidismo (Henry, 1984).

5.4 Bocio.

El bocio ocurre cuando se presenta un aumento anormal en el tamaño de la glándula tiroidea. Se acepta que se trata de un bocio cuando la glándula aumenta al doble de su tamaño o bien alcanza un peso de 40g o más.

El paciente con bocio puede presentar eutiroidismo, hipotiroidismo o hipertiroidismo. El eutiroidismo es un estado en el cual en el cuerpo circulan las concentraciones adecuadas de las hormonas tiroideas.

Existen diferentes tipos de bocio, entre ellos está el bocio no tóxico, el bocio hereditario o dishormonogénico y el síndrome de Pendred.

El bocio no tóxico describe un aumento del tamaño de la glándula que no comporta una mayor producción de las hormonas tiroideas. La causa más corriente de este es la deficiencia en la dieta de yodo.

El bocio hereditario es una alteración provocada por anomalías en los diferentes pasos en la síntesis de la hormona tiroidea.

El síndrome de Pendred es una combinación de bocio y sordera secundaria como resultado de un defecto en la unión del yodo con la tirosina presente en la tiroglobulina. Por último, los pacientes con problemas en la síntesis de las hormonas tiroideas pueden presentar cretinismo bocioso (Henry, 1984).

6 El radioinmunoanálisis.

El radioinmunoanálisis es una técnica que surge como respuesta a la necesidad de cuantificar la concentración de hormonas peptídicas en el plasma, como son las hormonas tiroideas y esteroides.

Estas hormonas mostraban dos problemas para su cuantificación: (1) se presentan en concentraciones tan bajas que las técnicas entonces existentes no eran las más apropiadas para medirlas y (2) en el plasma se encuentran porciones de proteínas con estructuras similares a ellas. Por lo anterior, era necesario desarrollar una técnica que fuese suficientemente sensible, así como específica y reproducible (Freeman et al., 1975).

No fue sino hasta 1959 cuando Salomon Berson junto con Rosalyn Yalow crearon una técnica que resolvió el problema, el radioinmunoanálisis, mejor conocida por sus siglas como RIA (Lenhinger, 1988).

Con el desarrollo del RIA se obtuvieron las siguientes ventajas:

1) Sensibilidad.

Antes del desarrollo del RIA la capacidad de cuantificación utilizando otros procesos fisicoquímicos estaba en un rango comprendido entre los 10^{-4} a los 10^{-9} mol/l. Con el RIA se pueden cuantificar concentraciones que van desde 10^{-6} mol/l hasta 10^{-12} mol/l.

2) Especificidad.

Ya que en el RIA se emplean anticuerpos y utilizando la especificidad de estos, la capacidad de cuantificar una sustancia, y no otra con una estructura parecida, es muy alta.

3) Sencillez.

Actualmente, esta técnica se presenta de una manera muy accesible para su uso en todos los laboratorios, siempre y cuando cuenten con un equipo mínimo para su realización.

4) Versatilidad.

El RIA se puede aplicar tanto a grandes como a pequeños volúmenes de muestra, así como a toda una serie de estas.

5) Reproducibilidad.

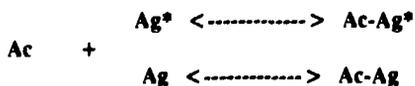
Cuando se producen anticuerpos en condiciones óptimas la especificidad es tan alta, que los resultados prácticamente son reproducibles (Freeman *et al.*, 1975; Edwards *et al.*, 1982).

Por todo lo anterior, el RIA es un método analítico con gran proyección, ya que puede emplearse en Veterinaria, Medicina y otras áreas en donde sea importante no solo la cuantificación de compuestos orgánicos, con concentraciones muy bajas, sino además, tener la seguridad que lo que se está midiendo realmente es lo que interesa (Margani *et al.*, 1989).

Actualmente no existe una metodología única para el RIA, ya que cada metabolito exige un cierto tipo de tratamiento especial, lo que se refleja en ciertas modificaciones a la técnica, no obstante todas ellas están bajo los mismos principios.

7 Bases y desarrollo del RIA.

El RIA se basa en la competencia entre un antígeno marcado radiactivamente (Ag*) con otro no marcado (Ag) de la misma naturaleza, por los sitios de unión a un anticuerpo (Ac), formando así complejos antígeno-anticuerpo. Los antígenos son moléculas que provocan la formación de anticuerpos en diversos seres vivos. Para el propósito, el Ac no distingue entre el antígeno marcado y el que no lo está. Esta reacción puede esquematizarse como sigue:



La cantidad de Ag^* que se une al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del antígeno no marcado (Margani *et al.*, 1989)

La unión del antígeno no es permanente, ya que obedece a un equilibrio químico, por lo que existe una velocidad de formación de complejos así como una velocidad de disociación.

El RIA tiene su principio en la ley de acción de masas, la cual dice que "la velocidad de una reacción es proporcional a la concentración molecular de cada una de las sustancias reaccionantes" (Babor *et al.*, 1980)

Una vez que se llega al equilibrio, se emplea un método que permita separar la fracción libre de Ag de los complejos formados (Ag^*-Ac o $Ag-Ac$). Hecho esto, se toma la fracción unida y se determina la cantidad de Ag^* presente. Esto se realiza midiendo la cantidad de radiactividad que emite el complejo formado, también puede medirse la emisión de la fracción libre.

Haciendo competir el Ag^* con calibradores de diferente concentración y llevando a cabo los pasos ya descritos; es posible realizar una gráfica en donde se tiene: emisión del complejo Ag^*-Ac vs concentración de los calibradores. En el RIA, un calibrador es una preparación del Ag a una concentración conocida.

La gráfica obtenida de esta manera se conoce como "curva de desplazamiento". Teniendo esta y por interpolación de la proporción de Ag^* unido al anticuerpo, en presencia de una muestra de suero de concentración desconocida, puede deducirse la concentración del mismo.

La forma de elaborar la curva dosis respuesta tiene varias modalidades ya que se pueden representar las variables como logaritmo, inversa del valor o bien de una manera directa. Se debe mencionar que la forma más práctica de hacerla es utilizando la forma logit-log. La ventaja radica en que al obtenerse una línea recta se evitan los errores que por observaciones subjetivas pueden presentarse al trabajar con una curva. Además, el uso de esta forma de representación permite obtener parámetros que se emplearán en el control de calidad como son pendiente, unión, al 20, 50 y 80 por ciento. (Odell *et al.*, 1983).

8 Componentes de un Radioinmunoanálisis.

El RIA se compone básicamente de cuatro elementos: radiotrazador, anticuerpos, sistema de separación y calibradores. Las características de estos son:

8.1 Radiotrazador.

Un radiotrazador es una molécula a la que se le ha incorporado un isótopo radiactivo por métodos fisicoquímicos.

La preparación de este para el RIA involucra: (1) evaluación de la utilidad que el compuesto marcado puede dar al ensayo, (2) selección del radionúclido, (3) forma en que se va a incorporar a la molécula y (4) purificación de la molécula ya marcada (Freeman *et al.*, 1975).

8.1.1 Características del radionúclido.

Idealmente, las características que debe cumplir el radionúclido son: (1) tener una vida media moderada, (2) poder unirse fácilmente al antígeno, (3) su forma de conteo debe ser eficiente y (4) debe de presentar una existencia isotópica alta (Early *et al.*, 1985).

8.1.2 Isótopos usados en el RIA

Los radioisótopos más empleados en el radioinmunoanálisis son: ^3H , ^{14}C , ^{75}Se , ^{59}Fe , ^{57}Co y los isótopos del Yodo ^{131}I y ^{125}I que son emisores gamma.

Por la facilidad de obtención, la sencillez de su empleo y su vida media, que es de 60 días, el ^{125}I es utilizado para el marcaje de las hormonas tiroideas y TSH.

8.1.3 Actividad específica.

Es de tomar en cuenta además la actividad específica de la molécula marcada, ya que la sensibilidad del ensayo depende en gran medida del radionúclido usado. La actividad específica se refiere a la actividad expresada en milicurios por masa del elemento. Un curie equivale a 3.7×10^{10} desintegraciones por segundo (Todd *et al.*, 1984).

Cuando se utilizan radiotrazadores con una actividad baja, es necesario aumentar la concentración molar de los mismos, lo que trae consigo una disminución en la sensibilidad (Freeman *et al.*, 1975; Todd *et al.*, 1984). Esto se debe a que se pueden tener concentraciones del trazador mayores a la concentración mínima del analito a cuantificar, para compensar así la actividad baja. Por esto, es deseable que la cantidad de radiotrazador deba ser igual o menor a la cantidad de analito que la prueba pueda medir (Odell *et al.*, 1983). Por lo contrario, una excesiva actividad causa una radiólisis rápida de la molécula. La radiólisis es la destrucción de la molécula por la emisión del radionúclido incorporado (Freeman *et al.*, 1975).

8.1.4 Marcaje de la molécula.

Las formas de incorporar un radioisotopo a una molécula son: (1) Síntesis química, donde la molécula es producida a partir de elementos más simples, conteniendo estos uno o varios elementos radiactivos. (2) síntesis biológica, en este caso la molécula es sintetizada por un sistema biológico, *in vivo* o *in vitro*, a partir de precursores marcados y (3) reacciones de intercambio, en la cual se sustituye uno o varios átomos de la molécula por radioisótopos.

Para el marcaje de las hormonas tiroideas, el método empleado es el de yodación, específicamente el método de cloramina T. La cloramina T es un potente agente oxidante capaz de convertir el yoduro a una forma más reactiva. Su principal desventaja es que es tan oxidante que puede oxidar a la molécula marcada, lo que provoca pérdida de la actividad inmunológica (Garza et al. 1993).

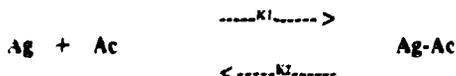
8.1.5 Purificación de la molécula marcada.

Realizado el marcaje, es necesario separar las moléculas marcadas de las que no lo están. El método de purificación a emplear depende de las propiedades de la molécula y de su susceptibilidad a la degradación. Entre los métodos usados están: la diálisis, filtración en gel, cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel y la cromatografía líquida de alta eficiencia (Freeman et al. 1975).

8.2.0 Anticuerpos.

Los anticuerpos confieren al RIA la propiedad de especificidad y las características que deben de poseer son: tener alta afinidad por el antígeno, (el cual es una molécula que provoca la aparición de anticuerpos), presentar una especificidad alta y un título adecuado (Early et al. 1985:).

El proceso de unión de un antígeno (Ag) a un Ac puede esquematizarse de la siguiente forma:



$$K_a = K_1/K_2$$

Donde:

K_1 = constante de asociación.

K_2 = constante de disociación.

K_a = constante de afinidad.

8.2.1 Afinidad.

La afinidad es la medida de la fuerza con la que el anticuerpo se une al antígeno. Una alta afinidad mejora sustancialmente la sensibilidad y hace que se llegue más rápido al equilibrio. El equilibrio en una reacción química se alcanza cuando la velocidad de disociación del producto es igual a la velocidad de formación del mismo.

La constante afinidad (K_a) de un anticuerpo puede calcularse utilizando el análisis de Scatchard.

8.2.3 Especificidad.

El término se refiere a la capacidad que tiene un anticuerpo de unirse a una sustancia y no a otra con una estructura parecida. También puede ser definida como el grado de reactividad cruzada con otra molécula relacionada estructuralmente con la molécula a cuantificar (Early et al, 1985)

8.2.2 Título.

El título se define como la dilución final del antisuero (suero con Ac), en el medio de incubación, en la que se va a llevar a cabo el enlace del Ag^* en ausencia del no marcado y que va a permitir una sensibilidad y precisión óptima (Odell et al, 1983). Por lo general, la dilución final del antisuero es igual a la concentración que va a ser empleada en el análisis. Normalmente la concentración usada va a ser aquella en la que se observa una unión del Ag^* al Ac del 30 al 70 por ciento de la concentración inicial de Ag^* , aunque la más empleada es al 50% (Early et al, 1985).

Ya que en el RIA el Ag^* compete con el Ag por el Ac, debe de existir un exceso de Ag^* en relación con el Ac, como resultado de esto, el Ag efectivamente compete con el Ag^* por los sitios de unión (Odell et al, 1983).

8.3 Sistema de separación.

La reacción Ag-Ac, ya esquematizada, es una reacción de equilibrio. Al llegar a este, existirá una cantidad de Ag y Ac que no formaron complejos Ag-Ac.

En el RIA se presenta una reacción de este tipo en la que es necesario separar la fracción unida de la libre, ya que esta última es la que se va a emplear.

Es importante una buena separación, ya que si no se realiza adecuadamente lleva a resultados erróneos. Es de destacar que la separación es la mayor fuente de error, por lo que el método a emplear debe de ser evaluado con cuidado. Las características con las que debe de cumplir son: sencillez, precisión, no afectar al equilibrio y ser económica. (Odell et al, 1983).

En la práctica no existe un método ideal, ya que cada una de las técnicas que se han desarrollado presentan sus limitaciones. No obstante, todas ellas se basan en la diferencia de tamaño entre el analito libre y el complejo Ag-Ac.

8.3.1 Métodos de separación.

Los métodos de separación mas empleados son:

Cromato-electroforesis.

Filtración en gel.

Inmunoprecipitación.

Separación química.

Técnicas de adsorcencia

Fase solida.

Anticuerpos polimerizados.

8.3.2 Sistema de separación por doble anticuerpo.

En el caso de los reactivos para RIA de las hormonas tiroideas elaborados en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), el método empleado es el de inmunoprecipitación, en el cual se emplea un Ac contra el primer anticuerpo al cual se une el Ag este o no marcado.

Este método es también llamado sistema de separación por doble anticuerpo. Es fácil de realizar y pueden procesarse un buen número de muestras en poco tiempo (Odell *et al.*, 1983).

8.4 Calibradores

Como ya se ha dicho, un calibrador es una preparación patrón que se emplea de referencia para la elaboración de la curva de desplazamiento, así como para los controles de calidad. El calibrador debe poseer una concentración exacta (Odell *et al.*, 1983).

II OBJETIVOS.

Por sus cualidades, el radioinmunoanálisis es empleado por un buen número de personas relacionadas con actividades científicas o de laboratorio; no obstante de presentar un cierto inconveniente, su costo. Este varía considerablemente dependiendo de diversos factores, como son: naturaleza del compuesto a cuantificar, el número de pasos de separación y purificación, el origen del anticuerpo, etc. Algunos investigadores reportaban costos, en 1984, de 10 a 30 dólares en los EU; aunque otros reportaban que este variaba de uno a 85 dólares por prueba o ensayo (Albertini *et al*, 1984)

Actualmente, los reactivos destinados al radioinmunoanálisis en nuestro país, en su gran mayoría, para cualquier tipo de hormona o analito, son importados; representando esto un aumento en el precio de su realización.

Conscientes de ello, en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares se desarrollaron reactivos para el radioinmunoanálisis de las hormonas tirotrópica, tirotrópica neonatal, tiroxina y triyodotironina.

El presente trabajo fue desarrollado en dicho instituto y tuvo como finalidad el determinar las características de calidad de los estuches destinados al RIA de la hormona tiroidea tiroxina (T4) y la hipotalámica tirotrópica (TSH); aplicando las pruebas de calidad que recomienda la Organización Mundial de la Salud (OMS) para precisar si estos se encuentran dentro de los rangos recomendados por dicho instituto

Para lograr lo anterior, el trabajo abordó los siguientes puntos:

Pruebas de calidad. Las siguientes pruebas se aplicaron a ambos estuches, variando el protocolo de estas pruebas de acuerdo a las características de los reactivos.

- A) Pruebas de recuperación.
- B) Pruebas de paralelismo.
- C) Reactividad cruzada

Determinación de valores específicos.

- A) Variación intra-ensayo.
- B) Variación inter-ensayo.
- C) Parámetros de la curva.
- D) Mínima dosis detectable.

Efectos de variaciones en el protocolo en el resultado de las pruebas.

Estas pruebas permiten observar el resultado de las pruebas bajo ciertas modificaciones en el protocolo, lo que da una idea de la confiabilidad de los mismos. Las pruebas a los estuches de T4 fueron:

- A) Prueba de variación en el tiempo de centrifugado.
- B) Prueba de variación de la temperatura de centrifugado.

Pruebas en TSH. La prueba realizada en TSH fue la de variar el tiempo de incubación.

Pruebas de optimización

Las dos siguientes pruebas, que solo se aplicaron a los estuches de TSH, no son propiamente pruebas de calidad, sino de optimización, ya que estaban encaminadas a determinar el efecto de variar uno de los componentes, sero-albumina bovina, con los que se elaboran dichos estuches. Lo anterior con el fin de ver si era posible reducir la cantidad de dicho componente o bien si era posible cambiarlo por otro más accesible. Las pruebas que se realizaron fueron:

A) Efecto del cambio de matriz, así como el de la concentración de la Sero-albumina bovina en los parámetros de la curva.

B) Efecto de los cambios anteriores en la mínima dosis detectable.

III CONTROL DE CALIDAD EN EL RIA.

1 Concepto de control de calidad.

El concepto de control de calidad (CC) tiene su origen en la industria donde los productos deben cumplir con las especificaciones de cada línea de producción. Los que no cumplen con estas son inmediatamente descartados procurando así obtener uniformidad en la calidad de los mismos (Odell *et al.*, 1983).

Aunque lo anterior es lo más deseable, no siempre resulta posible hacer esto, ya que existen otros productos en los que se ven involucradas sustancias de origen biológico para su elaboración, por lo que no es posible lograr que presenten idénticas características, pues son bien conocidas las diferencias que existen en los sistemas biológicos.

En este tipo de productos, el control de calidad va dirigido a lograr que el producto se comporte de una manera constante o estable dentro de un rango ya establecido. En este caso, la calidad esta equiparada con la constancia (Odell *et al.*, 1983).

2 Control de calidad interno y externo.

Teniendo presente lo anterior, el CC en el RIA tiene como "objetivo primario, mantener y mejorar la calidad de un RIA para contribuir al diagnóstico de un paciente o al seguimiento de una investigación o tratamiento (Garza *et al.*, 1993). El CC consta, a grandes rasgos, de dos partes; un control de calidad externo y uno interno.

2.1 Control de calidad externo.

El control de calidad externo (CCE) es llevado a cabo por una agencia nacional, regional o internacional con el objeto de comparar los resultados de un grupo de laboratorios participantes para evaluar la reproducibilidad y la desviación (Garza *et al.*, 1993). En el CCE se emplean patrones internacionales de referencia; el empleo de estos y el sometimiento a programas externos de control constituyen medidas adicionales para mejorar las prestaciones de los RIAs. (Margani *et al.*, 1989).

2.2 Control de calidad interno.

Un CC involucra una serie de procedimientos que se inician antes de la realización de la prueba misma como son revisión de reactivos, equipo, etc. Esta revisión se continúa con un monitoreo de los resultados para evaluar y validar el ensayo. Todo lo anterior está comprendido dentro del control de calidad interno (CCI).

3 Objetivos de un control de calidad interno.

El control de calidad interno, busca evaluar los siguientes puntos básicos:

Exactitud. -La exactitud es el grado de coherencia entre el valor obtenido a través del análisis y la concentración verdadera de la muestra.

Precisión.- Dispersión de una misma muestra alrededor de su promedio

Reproducibilidad.- Consistencia de los resultados a lo largo del tiempo.

Especificidad.- Capacidad de un Ac de unirse exclusivamente a un analito y no a otro con una estructura parecida.

Sensibilidad.- Mínima dosis detectable estadísticamente diferente de cero.

Confiabilidad.- Es la validez del resultado obtenido que involucra a todos los puntos anteriores (Garza *et al.*, 1993).

4 Control de calidad interno, control de calidad intra e inter-ensayo.

El CCI consta de dos partes: (1) la evaluación intra-análisis, conocida también como control de calidad intra-ensayo, que evalúa solamente la prueba realizada, siendo su objetivo principal determinar si un análisis es rechazado o no, además de que a largo plazo identifica y elimina errores que conducen a una desviación y a poca reproducibilidad con respecto a los anteriores (Garza *et al.*, 1992) y (2) la evaluación inter-análisis o control de calidad inter-ensayo, en la que se compara una prueba con otra y es punto de partida para establecer valores medios que sirven de base para la comparación con nuevos resultados (Hunter *et al.*, 1983).

5 Control de calidad intra-ensayo.

Los puntos que se evalúan para llevar a cabo un control de calidad intra-ensayo son los siguientes:

5.1 Parámetros de la curva.

La curva dosis-respuesta es más que un vehículo para la cuantificación de muestras desconocidas, ya que puede ser empleada para evaluar la calidad del ensayo. A partir de la curva linealizada, pueden obtenerse algunos parámetros que dan una información inmediata, o bien tras un tratamiento matemático, de la calidad de la prueba (Anderson, *et al* 1982). Se han sugerido varios parámetros, pero los comúnmente utilizados son los siguientes:

5.1.1 Cuentas totales. Es la actividad total del radiotrazador empleado, utilizándose para expresarlo las cuentas por minuto, (cpm) (Garza *et al*, 1993)

5.1.2 Unión máxima (U₀). Se determina dividiendo las cuentas por minuto (cpm) del calibrador cero entre el total de cpm. La U₀ representa la máxima capacidad de unión del Ac en la prueba y varía en función de la concentración del Ac. La U₀ puede ser empleada para monitorear la inmunorreactividad y estabilidad del trazador (Anderson, *et al* 1982).

5.1.3 Unión no específica (UNE). Esta es definida como cualquier unión que ocurre en ausencia del Ac. La UNE se calcula dividiendo las cpm obtenidas en un tubo conteniendo solamente el calibrador cero, trazador y agente de separación, entre el total de las cpm. Se acepta como normal un valor menor al 10% de las cuentas totales para la mayoría de los RIAs. La UNE es un indicador de la integridad de la separación ya que si esta es incorrecta, tiende a aumentar (Anderson, *et al* 1982).

5.1.4 Porcentaje de unión al 50%. Este punto representa la concentración donde la unión es del 50% con el calibrador cero. Este punto es usualmente asociado con la máxima precisión y concentración óptima de predicción (Anderson *et al*, 1982).

5.1.5 Porcentaje de unión al 80 y 20%. Estos puntos representan el rango funcional del ensayo; fuera de estos, el ensayo pierde precisión. La concentración al 90% es usada, para hacer una estimación de la mínima dosis detectable (Anderson *et al*, 1982).

5.1.6 Pendiente. Este es un aspecto muy importante, ya que la pendiente da una idea de la precisión del ensayo, pues un ensayo con una pendiente pronunciada resulta en un ensayo mejor y más preciso. Normalmente, el valor de la pendiente en un RIA es de -2.303, aceptándose oscilaciones de ± 0.56 (Anderson *et al.*, 1982)

5.2.0 Muestras de control de calidad.

Los controles de calidad son muestras conteniendo el antígeno a cuantificar a una concentración conocida. Normalmente se utilizan tres controles; a concentraciones baja, media y alta del analito en cuestión. Los controles de calidad se emplean para evaluar la variación intra-análisis, que es un indicador de la precisión y reproducibilidad en la medición de una misma muestra a lo largo del RIA (Bedolla *et al.*, 1984).

6 Pruebas estadísticas usadas en el control de calidad intra-ensayo.

6.1 Desviación estandar del calibrador.

La desviación estandar del calibrador es una medida de la dispersión de un grupo de valores alrededor de una media. A partir de esta, y utilizando la media de los datos, es posible obtener el coeficiente de variación; el cual se expresa como un porcentaje y es el resultado de dividir la desviación del calibrador entre la media, multiplicando el valor obtenido por cien.

6.2 Coeficiente de variación entre duplicados.

Es usado frecuentemente como una medida estandar de la variancia. Su valor principal radica en que relaciona la desviación del calibrador y el nivel al que se han hecho las medidas. Los valores aceptados en los laboratorios usualmente van del 5 al 20%. (Odell *et al.*, 1983; Barnell, 1985)

7 Control de calidad inter-ensayo.

El control de calidad inter-ensayo evalúa la reproducibilidad de un análisis respecto a los anteriores e identifica y elimina errores que inducen a una desviación. Una desviación ocurre cuando se tienen resultados alrededor de un valor el cual esta alejado del correcto (Bedolla *et al.*, 1984; Garza *et al.*, 1993)

Para precisar la reproducibilidad han de tomarse en cuenta los controles de calidad o bien realizar pruebas estadísticas junto con la elaboración de cartas de Shewart que permiten tener un conocimiento preciso de como se está comportando el sistema en el tiempo. Esto va a permitir en mediano o largo plazo determinar los valores promedio del sistema y corregir los posibles errores que se presenten.

Los elementos dentro de un control de calidad inter-ensayo trabajados son los siguientes:

7.1 Muestras de control de calidad.

Estas muestras juegan un papel muy importante; ya que a partir de estas se construyen las cartas de control de calidad y se determinan los coeficientes de variación inter-análisis.

7.2 Coeficiente de variación entre datos.

Realizando un coeficiente de variación entre los mismos tipos de datos obtenidos en diferentes RIAs, es posible determinar aquellos que deben ser rechazados.

8 Pruebas de calidad de los estuches integrados.

El CCI no solo califica un ensayo y sirve de base para el establecimiento de valores medios, también es punto de partida para la determinación de las características de calidad del estuche utilizado. Entendiendo por estuche, a la totalidad de reactivos destinados a un RIA elaborados por un fabricante.

Asegurar la calidad de un RIA es algo sumamente importante, debe de existir la seguridad que el estuche o kit comercial que se está empleando presenta resultados correctos, ya que de no ser así, podrían causar problemas serios al paciente (Early et al, 1985).

Todos los fabricantes de estuches para RIA deben acompañar en su producto los resultados de una serie de pruebas de calidad recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), estas son:

8.1 Estadística básica. Esta incluye: desviación calibrador, rango de detección, pendiente e intercepciones en la curva (Early et al, 1985).

8.2 Reactividad cruzada. La especificidad del Ac es determinada usando esta prueba en la que se compara la concentración del antígeno original al 50% de desplazamiento con la concentración, también al 50%, de otra curva en la que emplean para su realización una serie de concentraciones de otro antígeno relacionado con el original y en la cual se emplea el mismo Ac. La reactividad cruzada se expresa como porcentaje y se obtiene de la siguiente manera:

(Concentración del Ag original al 50% de desplazamiento / Concentración del Ag parecido al 50 % de desplazamiento) X (100)

(Early et al, 1985).

8.3 Pruebas de paralelismo de desconocidos. Es un análisis para probar si los reactivos son capaces de mostrar la dilución de un suero desconocido. Además sirve para evaluar la especificidad y si alguna sustancia presente en el suero causa interferencia inmunológica afectando el resultado del ensayo (Early et al, 1985).

8.4 Pruebas de recuperación. La recuperación es la habilidad para detectar el 100% de una cantidad de analito agregado a un suero. Esta se lleva a cabo agregando cantidades conocidas de antígeno a una solución salina o suero, haciéndola así equivalente a una concentración de suero de paciente. Este preparado se utiliza para evaluar la eficiencia del estuche en la determinación de sustancias específicas (Early et al, 1985)

8.5 Coeficientes de variación intra e inter-ensayo a tres niveles de dosis. La precisión o reproducibilidad es el error asociado con los resultados. Esta indica que tan confiable es el resultado obtenido y da una idea de la sensibilidad y el grado de diferenciación entre dos resultados. Usualmente dos tipos de parámetros de precisión son usados, la precisión intra e inter-ensayo. Estas se expresan como coeficientes de variación, el coeficiente de variación intraensayo es una medida del error causado por la técnica y la reproducibilidad de los instrumentos usados; mientras que el coeficiente de variación inter-ensayo da una medida de la variabilidad o error asociado con los resultados día a día (Early et al, 1985).

8.6 Sensibilidad. Mínima dosis detectable por el estuche diferente a cero (Early et al, 1985)

8.7 Rango normal de estudio.

8.8 Efectos de variables como tiempo, temperatura, etc.

8.9 Línea de Scatchard y constantes de equilibrio.

8.10 Correlación clínica. Es la habilidad para diagnosticar la enfermedad de los pacientes correctamente (Early *et al.*, 1985).

Aunque las anteriores son las pruebas recomendadas, existen ciertos parámetros que son claves y deben ser precisados, estos son: especificidad, sensibilidad, precisión, recuperación y rango normal (Early *et al.*, 1986).

IV MATERIALES Y METODOS.

1 Equipo y materiales utilizados:

Tubos de polipropileno de 12 X 75 mm

Micropipetas automáticas tipo Eppendorf de punta desechable con capacidades de 50-250 μ l, de 200-100 μ l y de 10-50 μ l.

Pipeta repetitiva tipo Socorex con una capacidad de 10 a 5000 μ l.

Agitador tipo vórtex

Centrífuga refrigerada o no con capacidad de alcanzar velocidades de 1000g.

Contador gamma con detector de centelleo tipo pozo ajustado para 125 I.

Equipo para Baño María para ser usado a 37 °C

Gradillas.

Papel logit-log.

Agua destilada o desionizada

2 Reactivos utilizados.

2.1 Reactivos para el RIA de tiroxina.

Amortiguador de fosfatos 0.5M, con 1.5 mg/ml de ácido 3-anilino-1-naftaleno sulfónico (ANS).

Anticuerpos anti-T4 de Sigma.

Radiotrazador 125 I-T4 del ININ.

Calibradores de tiroxina (ININ), con las siguientes concentraciones:

- A- 0 $\mu\text{g}/\text{dl}$ B- 1.5 $\mu\text{g}/\text{dl}$**
C- 3.0 $\mu\text{g}/\text{dl}$ D- 6.0 $\mu\text{g}/\text{dl}$
E- 12.0 $\mu\text{g}/\text{dl}$ F- 24.0 $\mu\text{g}/\text{dl}$

Sueros de control de calidad, con concentración baja, media y alta de Tiroxina (ININ).

Solución precipitante conteniendo polietilenglicol al 4.5% y 100 μl de Ac de borrego contra Ac de conejo por mililitro de solución (ININ).

2.1.1 Protocolo para la realización del RIA de Tiroxina.

1)-Marcar los tubos de polipropileno de la siguiente manera: tubos de unión no específica (UNE), tubos 1 y 2; unión máxima (Uo), tubos 3 y 4; calibradores (U), tubos del 5 al 14; muestras de control de calidad (bajo, medio y alto), tubos 15 a 20; desconocidos, tubos 21 en adelante.

Es necesario pipetear con cuidado y correr las muestras de la curva calibrador, controles y desconocidos por duplicado.

2)-Reconstituir con un mililitro de agua destilada los calibradores y pipetear 20 μl del calibrador A en los tubos de UNE y Uo, 20 μl para el resto de los calibradores, controles y desconocidos en los tubos correspondientes.

3)-Pipetear 300 μl de amortiguador a todos los tubos.

4)-Pipetear 100 μl del anticuerpo contra T4 en todos los tubos excepto en los de UNE.

5)-Pipetear 100 μl de radiotrazador ^{125}I -T4 a todos los tubos.

6)-Agitar en vórtex.

7)- Tomar cuatro tubos al azar y contar la radiactividad presente en cada tubo utilizando para ello el contador gamma. Estos datos servirán para calcular las cuentas totales (CT)

8)-Incubar 45 minutos a 37°C

9)- Agregar 1000 μl de la solución precipitante.

10)-Mezclar en vórtex.

11)-Decantar o aspirar el sobrenadante.

12)-Contar el botón de los tubos durante un minuto.

13)-Realizar los cálculos correspondientes.

2.1.2 Cálculo de resultados.

Anotar, en el formato para el reporte de resultados, el número de cuentas por minuto (CPM) que se obtuvieron para cada tubo.

Restarle a todos los tubos de calibradores, controles de calidad y desconocidos, el promedio de CPM de los tubos de la UNE, para obtener el promedio de cuentas netas (X-UNE). En el caso de la unión máxima, obtener un promedio de cuentas netas de los dos tubos.

Dividir la cantidad de cuentas netas de los calibradores, controles y desconocidos (U), entre el promedio de cuentas netas de U_o (tubos 3 y 4). Multiplicar el número obtenido por 100 para obtener el % de U/U_o para cada muestra.

$$\% \frac{U}{U_o} = \frac{cpmU - cpmUNE}{cpmU_o - cpmUNE} \times 100$$

Graficar el % de U/U_o para cada calibrador versus las concentraciones de los calibradores en $\mu\text{UI/ml}$, de preferencia en papel logit-log y trazar manualmente la línea de mejor ajuste.

Las concentraciones de T4 en los controles y en las muestras desconocidas se pueden obtener directamente por interpolación en la curva calibrador.

El % de unión máxima se obtiene dividiendo el promedio de cuentas netas de la unión máxima, entre el promedio de cuentas totales netas por 100.

$$\%U_o = \frac{cpmU_o}{cpmCT} \times 100$$

El % de unión no específica se calcula dividiendo el promedio de cuentas de UNE, entre el promedio de cuentas totales netas por cien.

$$\%UNE = \frac{cpmUNE}{cpmCT} \times 100$$

Se recomienda tratar todos los tubos en las mismas condiciones, trazar una curva patrón para cada análisis. Además, el tiempo para dispensar cada reactivo (anticuerpo, muestras de control, calibradores, desconocidos, ¹²⁵I-T4 y segundo anticuerpo) no debe pasar de 10 minutos.

2.2.0 Reactivos para el RIA de Tirotropina.

Calibradores de TSH (ININ) conteniendo las siguientes concentraciones:

A- 0 UI/ml B- 0.9 UI/ml
C- 3 UI/ml D- 7.5 UI/ml
E- 15 UI/ml F- 30 UI/ml
G- 60 UI/ml

Anticuerpos anti-TSH Sigma

Radiotrazador ^{125}I -TSH (ININ)

Solución precipitante conteniendo polietilenglicol al 8% y 100μ de anticuerpo contra Ac de conejo obtenido a partir de borrego; por cada $500\mu\text{l}$ de solución, así como controles de calidad con concentraciones baja, media y alta de TSH (ININ).

2.2.1 Protocolo para la realización del RIA de TSH.

- 1) Reconstituir los reactivos con agua destilada de la siguiente manera: calibradores y muestras de control de calidad $1000\mu\text{l}$, excepto el calibrador A con $2,000\mu\text{l}$, radiotrazador y primer anticuerpo con $1,000\mu\text{l}$, para lo cual se recomienda juntar todo el material liofilizado, quitar cuidadosamente las tapas y mezclar suavemente sin que se forme espuma. Dejar los frascos el tiempo suficiente hasta que alcancen la temperatura ambiente.
- 2) Marcar los tubos de polipropileno de la siguiente manera: Tubos 1 y 2, unión no específica (UNE); tubos 3 y 4, unión máxima (Uo); tubos 5 al 16, calibrados (U); tubos 17 al 22; muestras de control de calidad (bajo, medio y alto: CCA, CCB y CCC); desconocidos, tubos 23 en adelante.
- 3) Pipetear $100\mu\text{l}$ del calibrador A para la UNE y para la unión máxima y el mismo volumen para el resto de calibradores, controles y desconocidos, en los tubos correspondientes.
- 4) Pipetear $100\mu\text{l}$ de primer anticuerpo anti-TSH a todos los tubos excepto para los de UNE, a los que se les agregan $100\mu\text{l}$ de amortiguador.
- 5) Mezclar los tubos con ayuda de un vórtex.
- 6) Incubar los tubos a 37°C en baño María durante 90 minutos (no usar incubadora ni platina de calentamiento).
- 7) Pipetear $100\mu\text{l}$ de ^{125}I -TSH.

- 8) Mezclar los tubos con ayuda de un vórtex y contar la radiactividad presente en cuatro tubos al azar para obtener los datos de cuentas totales.
- 9) Incubar los tubos a 37°C en baño María durante 90 minutos.
- 10) **AGITAR SUAVEMENTE** el frasco de solución precipitante hasta que la misma sea homogénea, posteriormente pipetear 500 μ l.
- 11) Mezclar los tubos con ayuda de un vórtex.
- 12) Centrifugar los tubos a 2,000 rpm a 4°C por 15 minutos.
- 13) Decantar los tubos de 2 a 3 minutos y quitar las gotas residuales.
- 14) Contar los tubos durante 60 segundos.
- 15) Calcular los resultados obtenidos.

2.2.2 Cálculo de resultados.

Los resultados obtenidos se trabajan de la misma manera que en el caso de T4

3 Protocolo de las pruebas efectuadas a los reactivos para el RIA de T4.

3.1 Prueba de recuperación.

A un suero hipotiroideo se le agrega una cantidad conocida de la hormona de interés, se realiza el análisis y se determina la concentración final hallada. Esta debe coincidir con la concentración teórica esperada. Posteriormente, a la concentración se le resta el valor de la concentración inicial, obteniendo así, la cantidad agregada al suero hipotiroideo. Por último se compara este resultado con el resultado teórico y se expresa como un porcentaje.

3.2 Prueba de paralelismo.

En esta prueba se realizan una serie de diluciones de un suero hipertiroideo con el fin de determinar si los reactivos para el RIA de T4 son capaces de mostrar la dilución del suero y la inmunoreactividad de los mismos. El procedimiento es el siguiente:

Se toma un suero hipertiroideo, con una concentración de $18 \mu\text{g/dl}$ y se diluye con suero libre de hormonas tiroideas para obtener concentraciones de 7.89, 6.42, 5.53, 3.27 y $1.8 \mu\text{g/dl}$. Estas concentraciones son las que se observan normalmente en los adultos, a excepción de las dos últimas, que son concentraciones hipotiroideas.

Se llevaron a cabo doce mediciones para cada dosis y se obtuvo la media para cada una de ellas. Cabe mencionar que en ninguno de los casos el coeficiente de variación debe ser mayor al 10% para cada concentración empleada.

Finalmente, se comparan los valores medios encontrados con los esperados para cada una de las dosis, se obtuvo el coeficiente de variación así como el porcentaje de lo observado entre lo esperado.

3.3 Efectos de variables.

3.3.1 Prueba de variación del tiempo de centrifugado.

El proceso de separación en el RIA es una fase muy importante, ya que una mala separación causa errores en la cuantificación del analito. Normalmente, el tiempo empleado en la centrifugación es de 30 minutos. Para determinar el efecto de reducir este tiempo en los resultados, se hicieron pruebas en las que se emplearon 30, 20 y 10 minutos de centrifugado. Para poder evaluar las variaciones encontradas, se optó por comparar los resultados registrados en los controles de calidad de los tiempos de 20 y 10 minutos con los de 30. El número de tubos utilizados para cada tiempo fue de diez y el coeficiente de variación no fue mayor al 10%

3.3.2 Variación en la temperatura de centrifugado.

Normalmente, la temperatura empleada en el proceso de centrifugado es de 4°C . Para ver si existían variaciones significativas en los resultados empleando una temperatura mayor, se procedió a realizar pruebas con dichas temperaturas tomando como punto de referencia los controles de calidad.

Lo anterior se realizó debido a que pueden existir lugares en los cuales no se cuente con centrifuga refrigerada; por lo que era necesario el precisar si esto afectaba o no los resultados obtenidos.

La temperatura elegida para trabajar fue de 22°C , ya que se consideró a esta temperatura como una temperatura media ambiental. Se llevaron a cabo 2 pruebas por duplicado, los resultados se compararon con los obtenidos a 4°C determinándose posteriormente el coeficiente de variación que existía entre ellos.

3.4 Prueba de reactividad cruzada.

En esta prueba se determina la eficiencia del primer anticuerpo para unirse exclusivamente al antígeno de interés y no a otro con una estructura parecida. La prueba de reacción cruzada se realizó empleando las hormonas T2 y T3 a concentraciones de 24000, 2400, 240, 24 y 12 $\mu\text{g}/\text{dl}$. Debe mencionarse que las concentraciones empleadas son mayores a las que normalmente se observan en el cuerpo humano. Fueron elegidas estas hormonas por su parecido estructural a la T4.

Hecho lo anterior, se realizan las gráficas y se determina la concentración correspondiente al 50% unión. Establecido este valor, se realizan los cálculos correspondientes ya mencionados.

3.5 Variación inter-ensayo

Para determinar si existía una buena reproducibilidad en los resultados de los ensayos, se llevaron a cabo 10 de ellos en diferentes días durante un período de un mes. Se utilizaron los 3 controles de concentraciones baja, media y alta. Posteriormente se obtuvo la media de cada uno de ellos, así como el coeficiente de variación promedio. Todos los ensayos son por duplicado.

3.6 Variación intra-ensayo.

Para establecer cual es la variación intra-ensayo en los reactivos, se utilizan los controles de calidad. En un mismo ensayo, se toman 10 tubos de cada uno de los controles y se procesan como desconocidos. Obtenido el resultado se obtiene la media, desviación estandar y el coeficiente de variación; este último no debe ser mayor al 10% para ser calificado como aceptable.

3.7 Parámetros de la curva.

Los parámetros obtenidos de la curva son: Unión al 20, 50 y 80% así como la pendiente. Para obtener los valores de los parámetros anteriormente dichos, se tomaron, los valores encontrados en diez diferentes pruebas, calculandose la media, desviación estandar y el coeficiente de variación en cada uno de los grupos de datos.

3.8 Mínima dosis detectable.

La prueba se realizó midiendo la concentración de veintiseis tubos de unión máxima. Esta cantidad es mayor a la recomendada en la bibliografía, la que consigna como mínimo diez tubos (Early et al. 1985). Estos tubos se procesan en un ensayo normal tomándolos como desconocidos.

De los resultados encontrados se obtiene la media de las cuentas netas (previa sustracción de las cpm obtenidas en los tubos de unión no específica) y su desviación estandar. A la media se le resta una o dos desviaciones estandar, ya que se considera como la mínima dosis detectable a aquella en la cual la concentración es dos desviaciones estandar por debajo de la media o bien aquella en la cual la concentración representa el 95% de la unión máxima.

4 Protocolo de las pruebas efectuadas a los reactivos de TSH.

4.1 Prueba de recuperación.

A tres diferentes sueros con concentraciones de 30, 20 y 10 $\mu\text{UI/ml}$ de la hormona de interés se le agregaron 2.1 $\mu\text{UI/ml}$ de hormona de TSH. El número de tubos empleados para cada caso fue de diez. Posteriormente se realiza el procedimiento y los cálculos ya explicados para esta prueba en T4.

4.2 Prueba de paralelismo.

En este caso, se tomo un suero hipertiroideo con una concentración de 60 $\mu\text{UI/ml}$ y se diluyo con suero libre de hormonas tiroideas, obteniéndose así concentraciones de 50, 40, 30, 20m y 10 $m\mu\text{UI/ml}$. El número de tubos empleados para cada caso fue de diez. Los cálculos ha realizar son los mismos que se hicieron en la prueba de T4.

4.3 Prueba de reactividad cruzada.

En este caso, la prueba se efectua de la misma manera que en T4, no obstante, por problemas en el suministro de las hormonas con las que se lleva a cabo la prueba, los resultados tomados son los que estipula el fabricante.

4.4 Efectos de variables.

4.4.1 Efecto de variar el tiempo de incubación

Para determinar el comportamiento de los reactivos variando el tiempo de incubación del ensayo, se realizaron pruebas utilizando 60 minutos, 90 y 120 minutos de incubación. El número de ensayos realizados para cada tiempo de incubación fue de doce, cada uno por duplicado. En cada uno de los grupos en análisis, se obtuvo la media, desviación estándar y el coeficiente de variación. Se presenta también el efecto de la incubación en la mínima dosis detectable, la forma de realización de esta última parte es la que ya se describió para T4.

4.2.2 Efecto del cambio de matriz en la elaboración de los reactivos.

Más que una prueba de calidad, esta prueba se realizó con el fin de determinar si era posible optimizar el uso de la seroalbúmina bovina. La prueba consistió en comparar tres estuches, uno de los cuales había sido elaborado utilizando suero humano al 50% como matriz. Mientras que en los otros dos se empleó SAB (sero-albumina bovina) en una concentración del 2% y 0.5% respectivamente, la primera de ellas es la normalmente empleada.

Se realizaron dos ensayos con cada uno de los diferentes tipos de estuche; en cada caso se obtuvo la media de los valores obtenidos en cuanto a calibradores, unión máxima, unión no específica, pendiente, etc. para cada tipo de estuche. En cada caso se obtuvieron las respectivas curvas dosis-respuesta así como el coeficiente de variación de cada tipo de dato.

4.2.3 Efecto del cambio de la matriz en la mínima dosis detectable

Otra de las pruebas consistió en determinar la mínima dosis detectable para cada uno de los distintos estuches. El protocolo para su realización es el mismo que el usado en el caso de T4, aunque en este caso, el número de tubos empleados fue de diez.

4.4 Variación intra-ensayo.

El protocolo de esta prueba, así como el de las siguientes, es el mismo que se empleó para la hormona T4.

4.5 Variación inter-ensayo.

4.6 Parámetros de la curva.

4.7 Mínima dosis detectable.

V RESULTADOS Y DISCUSION.

1 Resultados obtenidos para las pruebas efectuadas en los reactivos para T4.

1.1 Recuperación

Como puede observarse en la tabla 1.1 , el porcentaje de recuperación es bastante aceptable, con excepción de un valor, con el que se trabajó a una concentración menor a la unidad ($0.75\mu\text{g/dl}$), lo que debió traer problemas en su manipulación y medición.

Concentración inicial $\mu\text{g/dl}$	T4 agregado $\mu\text{g/dl}$	Concentración encontrada $\mu\text{g/dl}$	Concentración esperada $\mu\text{g/dl}$	T4 recuperado $\mu\text{g/dl}$	Porcentaje de recuperación
1.5	0.75	2.42	2.25	0.92	122.6
1.5	1.9	3.53	3.4	2.03	106.8
1.5	11.25	12.8	12.75	11.3	100.4

(Tabla 1.1) Esta tabla muestra que la recuperación en todos los casos fue del cien por ciento, aceptando una variación del 100 10% . Abreviaturas; $\mu\text{g/dl}$: microgramo/decilitro.

1.2 Paralelismo.

Puede observarse en la tabla 1.2 que solo uno de los valores es ligeramente mayor al 10% en el coeficiente de variación entre los duplicados. No obstante lo anterior, los resultados no difieren significativamente de los esperados; lo que indica que los reactivos son capaces de registrar y mostrar la dilución del suero.

Concentración esperada ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	Concentración observada ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	% entre lo observado y esperado	coeficiente de variación. %
7.89	7.63	96.7	2.5
6.42	6.1	95	6.7
5.53	5.68	102.7	11.4
3.27	3.37	103.2	6.56
1.8	1.85	102.7	7.4

(Tabla 1.2) En la última columna de esta tabla se observa que solo uno de los valores presenta una variación en lo que respecta a los duplicados del mismo grupo mayor al valor medio 10. Abreviaturas; $\mu\text{g}/\text{dl}$: microgramos/decilitro.

1.3 Tiempo de centrifugado.

En la tabla 1.3 puede verse los resultados obtenidos, mientras que en la 1.4 se presenta el porcentaje de variación de los valores encontrados en los tiempos de 10 y 20 minutos respecto a los de 30 minutos, que es considerado como el tiempo mas adecuado.

De acuerdo a la tabla 1.4, las variaciones mayores se presentaron en el tiempo de 10 minutos; además, se encontraron coeficientes de variación entre los duplicados mayores al 10 % en este tiempo para cada concentración.

Con estos resultados puede decirse que el tiempo de centrifugado tiene un efecto notorio en los valores encontrados para cada concentración, no obstante lo anterior, podría no verse afectada la interpretación general de los resultados; ya que aunque existen variaciones entre los controles del mismo tipo y estas son significativas en su mayoría, caen dentro de los rangos que se reportan en la bibliografía.

Por ejemplo, aunque las variaciones que se observan entre los controles bajos van de 3.7 a 4.6 $\mu\text{g/dl}$ estos entran dentro de un valor hipotiroideo (menor a 4.5 $\mu\text{g/dl}$). En los siguientes casos sucede lo mismo, se encontraron variaciones que entran dentro de los rangos reportados (eutiroides de 4.5-11.5 $\mu\text{g/dl}$; hipertiroides mayor a 11.5 $\mu\text{g/dl}$).

Control	30 minutos ($\mu\text{g/dl}$)	20 minutos ($\mu\text{g/dl}$)	10 minutos ($\mu\text{g/dl}$)	Valor esperado ($\mu\text{g/dl}$)
bajo	3.7	4.4	4.6	3.48
medio	9.2	10.7	7.6	5.38
alto	17.2	18.2	17	16.5

(Tabla 1.3).

tiempo	control	% var. Respecto al valor a 30 minutos.
20 min.	bajo	19
	medio	16
	alto	6
10 min.	bajo	24
	medio	17
	alto	1

(Tabla 1.4) En la tabla 1.3 se presentan los resultados encontrados para cada tiempo y para cada tipo de control, mientras que en la 1.4 se puede ver el porcentaje de variación en los controles de los tiempos de 10 y 20 minutos con respecto al de 30 minutos, que es el considerado como mas adecuado. Abreviaturas: $\mu\text{g}/\text{dl}$: microgramos/decilitro.

1.4 Temperatura de centrifugado.

Los resultados obtenidos en los controles se resumen en la tabla 1.5. En dicha tabla también se comparan los resultados hallados a 22°C con aquellos encontrados a 4°C que es la temperatura normalmente usada. De acuerdo a los resultados, es posible el llevar a cabo el centrifugado utilizando una temperatura mayor a 4°C, ya que al parecer este no afecta de manera significativa a los resultados. Es necesario mencionar el caso del calibrador alto, cuyo valor obtenido a una temperatura de 22 grados difiere en un 18.6% a la encontrada a 4 grados. En este caso aunque existe esta variación en el resultado, los valores caen en la categoría de hipertiroideos, por lo que puede considerarse la diferencia encontrada como aceptable.

Temperatura	control	Valor prom. obs. µg/dl	Valor a 4C° µg/dl	Diferencia obs/esp. %
22°C	bajo	3.7	3.7	0
	medio	9.55	9.2	3
	alto	14	17.2	18.6

(Tabla 1.5) En esta tabla pueden verse los valores hallados para los controles bajo, medio y alto en diferentes ensayos llevados a cabo con temperaturas de 22°C y de 4C° durante el proceso de centrifugado. Esta última temperatura es considerada en el protocolo como la más adecuada. Abreviaturas: µg/dl: microgramos/decilitro.

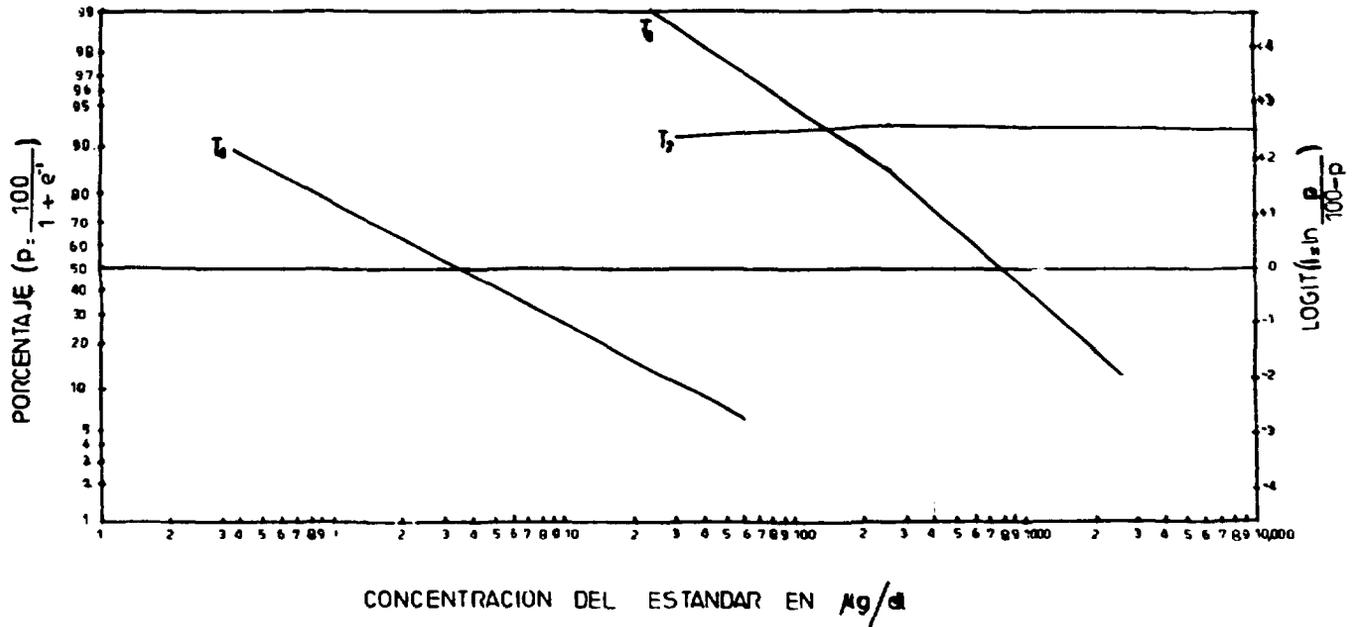
1.5 Reactividad cruzada.

De acuerdo a la tabla 1.6 y a la gráfica que a continuación se presentan, la reactividad cruzada del Ac para T4 con otro antígeno se presenta solo para T3 y, es tan baja, que puede afirmarse que el anticuerpo empleado se une exclusivamente a T4, lo que se traduce en una especificidad adecuada del mismo.

Hormona	Concentración al 50% en $\mu\text{g}/\text{dl}$	% de reactividad cruzada.
T2	0	0
T3	760	0.46
T4	3.5	100

(Tabla 1.6) Abreviaturas: $\mu\text{g}/\text{dl}$: microgramos/decilitro.

RADIOINMUNOANALISIS DE I_6 REACTIVIDAD CRUZADA



1.6 Coeficiente de variación inter-ensayo.

Basados en los resultados obtenidos, existe una buena reproducibilidad ya que tanto la desviación estandar como el coeficiente de variación son bajos, pues se admite una variación para esta prueba del 15%. Por lo que puede concluirse que con estos reactivos se puede obtener resultados confiables así como reproducibles. Esto puede observarse en la tabla 1.7:

Control	Valor esperado. $\mu\text{g/dl}$	Valor medio encontrado. $\mu\text{g/dl}$	Desviación estandar.	Coeficiente de variación. (%)
alto	16-19	16.15	0.57	3.6
medio	7-8	5.3	0.3	5.2
bajo	3-4	3.5	0.3	9

(Tabla 1.7) El coeficiente de variación se refiere a los encontrados entre los duplicados a la misma dosis. Abreviaturas: $\mu\text{g/dl}$: microgramos/decilitro.

1.7.0 Coeficiente de variación intra-ensayo.

Los coeficientes de variación encontrados para los controles se presentan en la tabla 1.8.

Control	Media encontrada en $\mu\text{g/dl}$.	Valor esperado. $\mu\text{g/dl}$	Desviación estandar	Coeficiente de variación.
Bajo	3.51	3-4	0.307	8.7
Medio	5.42	7-8	0.315	5.8
Alto	16.5	16-19	0.971	5.9

(Tabla 1.8) El coeficiente de variación se refiere a los encontrados entre los duplicados a la misma dosis. Abreviaturas: $\mu\text{g/dl}$: microgramos/decilitro.

Como puede verse en la tabla anterior, el valor del coeficiente de variación para todos los casos no fue mayor al 10%, lo que indica que existe una variación intra-ensayo adecuada por lo que los resultados pueden catalogarse de reproducibles.

1.8.0 Parámetros de la curva.

En la tabla 1.9, se observan coeficientes mayores al 10 por ciento en la unión al 20 y 80 por ciento, lo anterior es justificable si se toma en cuenta que los anteriores valores son los límites de confiabilidad del ensayo, pues si se observa el valor al 50% este es bajo. Pese a estos valores los coeficientes de variación no sobrepasan por mucho el valor límite.

Parámetro	Media	Desv. est.	C.V.
U20	16.5	2.12	12.8
U50	3.67	0.23	6.4
U80	0.82	0.10	12.8
Pendiente	-2.16	0.41	1.9

(Tabla 1.9) Abreviaturas: $\mu\text{g}/\text{dl}$, microgramos/decilitro; Desv. est., desviación estandar; C.V., Coeficiente de variación.

1.0.9 Mínima dosis detectable.

La tabla 1.10 muestra que la mínima dosis detectable para el estuche de reactivos se encuentran en un rango semejante al de los reactivos comerciales.

Media	Media menos K D.E.	Unión/Unión máxima (%)	Concentración aparente	Sensibilidad aproximada
18042	1	96	0.7 $\mu\text{g}/\text{dl}$	
18042	2	92	0.35 $\mu\text{g}/\text{dl}$	0.35 $\mu\text{g}/\text{dl}$

(Tabla 1.10) De acuerdo a la bibliografía, se considera la mínima dosis detectable a la media de por lo menos 10 uniones máximas menos dos desviaciones estandar por debajo de esta. También puede considerarse a la mínima dosis detectable como aquella observada al 95% de unión. (Early et al, 1985)

2.0.0 Resultados obtenidos para las pruebas efectuadas en los reactivos para TSH.

2.1.0 Recuperación.

Los resultados encontrados indican una buena recuperación ya que en ningún caso lo recuperado es mayor al 110 % Esto puede verse en la tabla 2.1

Concentración inicial $\mu\text{UI/ml}$	T4 agregado $\mu\text{UI/ml}$	Concentración encontrada $\mu\text{UI/ml}$	T4 recuperado $\mu\text{UI/ml}$	% recuperado
30	2.1	33	3	103
20	2.1	23	3	104.5
10	2.1	12.5	3	104

(Tabla 2.1). Abreviaturas: $\mu\text{U/ml}$, micro unidades internacionales/mililitro.

2.2.0 Paralelismo.

En esta prueba al igual que ocurre en el caso de T4, los resultados están dentro de lo esperado a excepción de un dato que es ligeramente mayor a la media $\pm 10\%$ lo que pudo deberse a algún error durante la realización de la prueba (Tabla 2.2).

Concentración esperada en $\mu\text{UI/ml}$	Concentración observada en $\mu\text{UI/ml}$	% entre lo observado y esperado	coeficiente de variación. %
50	50.8	101.6	2.1
40	45.3	113.2	3.6
30	29.5	98	6.1
20	20.1	100.5	7.5
10	9.8	98	6.7

(Tabla 2.2). Solo un dato, correspondiente a la concentración de 30 $\mu\text{UI/ml}$ es mayor al valor medio 10%

2.3.0 Reactividad cruzada.

Los resultados que se presentan son los estipulados por el fabricante, ya que no fue posible realizarlo por falta de las hormonas folículo estimulante (FSH) y leuteinizante (LH). Tabla 2.3

Hormona	% de reactividad cruzada.
FSH	< 0.001
LH	< 0.001
TSH	100.9

(Tabla 2.3). De acuerdo al fabricante, no se presenta una reactividad cruzada del anticuerpo con otras hormonas relacionadas estructuralmente con la TSH.

2.4.0 Efecto de la variación del tiempo de incubación sobre diversos parámetros y en la mínima dosis detectable.

En los diversos parámetros estudiados, solo en un dato se presenta una variación mayor al 10% sin embargo, los resultados muestran que en general, no se registra una variación considerable (tabla 2.4). En cuanto a la mínima dosis detectable, puede verse en las tablas 2.5, 2.6 y 2.7 que el tiempo más adecuado de incubación es el de una hora y media mientras que el de una hora es el menos indicado; quizá debido a que a este tiempo aún no se llega al equilibrio. En el protocolo, el tiempo recomendado es el de una hora treinta minutos.

CONCEPTO	Tiempo de incubación.			
	1 Hr	1.5 Hr	2 Hrs	CV
Unión no específica CPM	603	493	521	10.6
Unión máxima CPM	6991	7827	7520	5.6
Calibrador B	87	92	93	3.5
Calibrador C	75	74	75	7.7
Calibrador D	63	61	63	1.8
Calibrador E	47	43	42	5.3
Calibrador F	31	27	26	9.4
Calibrador G	17	16	15	6.2
Control bajo $\mu\text{Ci/ml}$	58	60	57	2.6
Control medio $\mu\text{Ci/ml}$	13.5	11	10.3	14.5
Control alto $\mu\text{Ci/ml}$	15.4	15	13.8	5.6
Cuentas totales CPM	18803	19005	19093	0.7
Unión al 20%	51	46.6	44	7.4
Unión al 50%	13	11.8	12	6.2
Unión al 80%	3.2	2.8	3.1	6.8
Unión máxima (%)	37	41	39.2	5.1
Unión no específica (%)	3.1	2.6	2.6	9.7
Procentaje	-2.28	-2.28	-2.4	2.9

(Tabla 2.4). Abreviaturas: $\mu\text{Ci/ml}$, micro unidades internacionales/mililitro; CPM, cuentas por minuto; CV, coeficiente de variación entre los tres datos.

Tiempo de 2 horas. Media \pm D.E	Media menos X desviación estandar.	CPM	% de unión	Concentración aparente. En μ UI/ml
7668 \pm 378	1	7290	95.06	0.72
	2	6912	90.1	1.3
	3	6534	85.2	2.3

(Tabla 2.5)

Tiempo de 1 hora. Media \pm D.E	Media menos X desviación estandar	CPM	% de unión	Concentración aparente en μ UI/ml
6862 \pm 308	1	6553	95.4	1
	2	6244	90.9	1.9
	3	3935	86.4	2.9

(Tabla 2.6)

Tiempo de 1.5 hrs. Media \pm D.E	Media menos X desviación estandar	CPM	% de Unión	Concentración aparente en μ UI/ml
7784 \pm 156	1	7627	97	0.48
	2	7470	96	0.62
	3	7314	94	0.9

(Tabla 2.7) Es considerada en la bibliografía como la mínima dosis detectable a aquella que se observa al 95% de unión, o bien la que se obtiene de la media de un mínimo de diez uniones máximas menos dos desviaciones estandar por debajo de esta. De acuerdo a esto, el tiempo de incubación más adecuado es el de una hora treinta minutos. Abreviaturas: D.E, desviación estandar.

2.5.0 Efecto del cambio de matriz.

En la tabla (2.8) se registran los valores hallados para controles, calibradores, pendientes, etc. encontrados a diferentes concentraciones de la matriz original y con una matriz diferente, los valores se expresan como porcentajes de unión en los calibradores. En la tabla se observa un aumento considerable de la unión no específica, lo que puede deberse a problemas en la separación. En el caso de las uniones, los valores discordantes se presentan con SAB al 0.5%, no obstante esto, en los controles, aunque existen pequeñas variaciones, estos caen en los rangos reportados para hipo. eu e hipertiroideos.

Concepto	Con SAB al 2%	Con SAB al 0.5%	Suero Humano al 50%
UNE	496 cpm	1195 cpm	822 cpm
Unión Máxima	8705 cpm	9260 cpm	8857
Calibrador B	91.3%	86%	89%
Calibrador C	79%	74%	79%
Calibrador D	71%	54%	64%
Calibrador E	52%	36%	46%
Calibrador F	35%	21%	32%
Calibrador G	16%	13%	14%
Control bajo	52 μ UI/ml	42 μ UI/ml	56 μ UI/ml
Control med.	14.2 μ UI/ml	10.2 μ UI/ml	12 μ UI/ml
Control alto	13.8 μ UI/ml	6.4 μ UI/ml	11.3 μ UI/ml
Unión al 20%	59 μ UI/ml	35 μ UI/ml	51.5 μ UI/ml
Unión al 50%	14 μ UI/ml	7.9 μ UI/ml	13.4 μ UI/ml
Unión al 80%	3.4 μ UI/ml	1.8 μ UI/ml	3.2 μ UI/ml
Ctas. Tot.	20163	20296	20602

(Tabla 2.8). Abreviaturas: μ UI/ml, micro unidades internacionales/mililitro.; Ctas Tot., Cuentas totales; UNE, unión no específica; SAB, seroalbúmina bovina.

2.6.0 Efecto del cambio de matriz en la mínima dosis detectable.

Las siguientes tablas (2.10, 2.11 y 2.12) muestran el efecto del cambio de matriz en la mínima dosis detectable.

SAB	Media \pm D.E.	Media menos X desviación calibrador.	Porcentaje de Unión	Concentración aparente
al		1	92	1.6
0.5%	7171 \pm 573	2	98	3.5
		3	83	4.2

(Tabla 2.10). Abreviaturas: SAB, seroalbúmina bovina; D.E., desviación estándar.

SAB	Media \pm D.E.	Media menos X desviación calibrador.	Porcentaje de Unión	Concentración aparente
al		1	96	0.4
2%	5650 \pm 207	2	92	0.88
		3	88.9	1.2

(Tabla 2.11)

Suero Humano	Media \pm D.E.	Media menos X desviación estándar.	Porcentaje de Unión	Concentración aparente
al		1	97	0.38
50%	5650 \pm 226	2	94.8	0.90
		3	91.1	0.92

(Tabla 2.12)

2.7.0 Coeficiente de variación inter-ensayo.

Como puede apreciarse en la siguiente tabla (2.13), solo uno de los controles es ligeramente mayor al 10% en el coeficiente de variación que se da como tolerancia para aceptar la prueba. Este valor encontrado en el control medio quizá pudo deberse a algún error en alguno de los procesos de realización en el ensayo.

Control	Valor medio encontrado. $\mu\text{UI/ml}$	Desviación. estandar.	Coefficiente de variación. (%)
alto	57	4.27	7.5
medio	10.3	1.13	11.6
bajo	13.8	1.22	8.9

(Tabla 2.13)

2.8.0 Coeficiente de variación intra-ensayo.

Tomando en cuenta que en este tipo de prueba puede aceptarse un coeficiente de variación hasta del 15% vemos que estos resultados son bastante aceptables (Tabla 2.14).

Control	Media encontrada en $\mu\text{g/dl.}$	Desviación estandar	Coefficiente de variación.
Bajo	56.3	2.8	4.9
Medio	11.4	1.1	9.8
Alto	14.5	1.1	7.5

(Tabla 2.14)

2.9.0 Parámetros de la curva.

Los resultados encontrados en los parámetros de la curva son aceptables, pues todos caen por debajo de una variación del 10% (Tabla 2.15).

Parámetro	Media	Desv. est.	C.V.
U20	46.6	4.35	9.3
U50	11.5	0.74	6.5
U80	2.83	0.24	8.6
Pendiente	-2.28	0.107	4.6

(Tabla 2.15). Abreviaturas: Desv. est., desviación estandar; U20, U50 y U80, unión al 20, 50 y 80 por ciento; C.V., coeficiente de variación.

2.10.0 Mínima dosis detectable.

En este caso la mínima dosis detectable es la misma que puede verse en la tabla en la que se utilizó una concentración de SAB al 2%

Media	Media menos X D.E.	Unión/Unión máxima (%)	Concentración aparente	Sensibilidad aproximada
	1	97	0.48 μ UI/ml	
7784	2	96	0.62 μ UI/ml	0.62 μ UI/ml

VI CONCLUSIONES

Pruebas de calidad.

De acuerdo a los resultados encontrados en los estuches de RIA de TSH y de T4, los reactivos se encuentran dentro del rango que recomienda la OMS y lo que se observan en los estuches comerciales. En la prueba de recuperación para T4, solo un dato fue mayor a lo esperado, en un 12.6% al límite aceptable. Lo anterior podría deberse al hecho de que se trabajó una cantidad menor a un $\mu\text{g/dl}$, lo que debió traer problemas en la manipulación y medición. No obstante, a medida que aumenta la cantidad de hormona agregada, los resultados se acercan más al 100% de recuperación, lo que refleja el comportamiento normal en el RIA.

En general, se puede concluir que los resultados encontrados muestran que los reactivos están dentro del rango aceptable del $100 \pm 10\%$, por lo que cumplen con las especificaciones recomendadas.

Determinación de valores.

Al igual que en el caso anterior, la mayoría de los valores encontrados estuvieron dentro del rango del $100 \pm 10\%$, a excepción de un dato en los parámetros de la curva de T4, en el que se observa una variación del 12% y otro en la variación inter-ensayo de TSH a nivel de dosis media, en la cual la variación fue del 11.6%. Aun así, puede afirmarse que ambos tipos de estuche, están dentro de los rangos aceptados.

Efectos de variables en los estuches de T4.

Tiempo de centrifugado. De acuerdo a la tabla 1.4 el tiempo de centrifugado tiene un efecto notorio en los valores encontrados; no obstante, la interpretación de los mismos no se ve afectada, por las razones ya discutidas anteriormente.

Temperatura de centrifugado. Observando la tabla 1.5, es posible llevar a cabo el centrifugado utilizando una temperatura mayor a 4°C , sin afectar los resultados significativamente.

Efectos de variables en los estuches de TSH.

Efecto de variar el tiempo de incubación. Los datos indican que no se registra una variación considerable entre los valores obtenidos para calibradores, controles y demás datos; siendo la excepción la mínima dosis detectable, en la cual una incubación de una hora provoca una disminución en la sensibilidad. Esto puede ser debido a que a este tiempo aún no se llega totalmente al equilibrio.

Debe mencionarse que pérdida de sensibilidad, no es considerable, por lo que es posible disminuir el tiempo a una hora.

Optimización.

Cambio de matriz. De acuerdo a las tablas 2.10 - 2.12, se observa que el usar una matriz de suero humano al 50% como posible sustituto del SAB al 2% es mejor que el empleo de este a una concentración menor ya que así se obtiene una sensibilidad mayor. Es necesario recordar que la SAB al 2% es la concentración normalmente empleada para la elaboración de la matriz.

VII COMENTARIOS FINALES.

Es importante para toda Nación el contar con tecnología propia, pues no solo le da a esta autonomía política y económica sino que además puede generar una entrada de divisas por su explotación comercial así como un ahorro de las mismas. Por lo anterior, nuestro país está obligado a desarrollar tecnología propia, y dentro de este desarrollo debe incluir, entre muchos otros, a los procesos de análisis químicos; como sería el caso del radioinmunoanálisis.

Ya se ha mencionado que los reactivos empleados para el radioinmunoanálisis en nuestro país en su mayoría son importados, ocasionando esto un costo elevado para la realización de cualquier prueba, lo que provoca que en su mayoría, la población no tenga acceso a esta.

Con la elaboración de los reactivos en nuestro país, se avanza no solamente en el desarrollo de tecnología propia y existe un ahorro de divisas; ya que, quizá lo más importante, esta prueba se hace accesible a la población en general. Lo que permite hacer mejores diagnósticos en lo que a la tiroides se refiere lograndose así un mejor tratamiento, aumentando de esta manera la posibilidad de salud para el enfermo.

En el presente trabajo se realizaron pruebas de calidad a los reactivos elaborados en el Instituto de Investigaciones Nucleares para el radioinmunoanálisis de las hormonas T4 y TSH. Se han discutido ya los resultados para cada prueba y de acuerdo a estos, tomando en consideración las variaciones que pueden existir en los productos en cuya elaboración se emplea material de origen biológico, se encontró que los resultados de las pruebas de calidad llevadas a cabo en los reactivos para cada una de las hormonas están dentro de los rangos esperados. Además, se ha podido establecer que estos reactivos presentan rangos de detección y características que los ubican dentro de los rangos que presentan los estuches comerciales. Por lo anterior se puede concluir, que dichos estuches tienen características que los hacen confiables así como accesibles para su uso en cualquier laboratorio, siempre y cuando se cuente con el equipo básico para la elaboración de las pruebas. Por último, se hace necesario mencionar, que no obstante la calidad de los reactivos, es conveniente el llevar a cabo un programa continuo de control de calidad en los resultados, así como en los reactivos empleados, pues solamente de esta manera es posible estar seguros de la veracidad de los resultados obtenidos.

VIII BIBLIOGRAFIA.

- Albertini, A.; Ekins, R. and Galen R., 1984 COST/BENEFIT AND PREDICTIVE VALUE OF RADIOIMMUNOASSAY, Elsevier Science Publishers., Amsterdam, New York, Oxford.
- Anderson, O. THE SIGNIFICANCE OF CURVE PARAMETERS IN ASSESSING THE RELIABILITY OF RADIOASSAY PROCEDURES. Clin. Lab. Invest. 54: 34-46, 1974.
- Babor, J. y Ibarz J., 1980. QUIMICA GENERAL MODERNA, 9a.ed., Editora Nacional, S.A. México.
- Bedolla, N. et al., ANALISIS DE DATOS Y CONTROL DE CALIDAD EN EL RADIOINMUNOANALISIS. GUIA PARA LA EVALUACION DE RESULTADOS. rev. Invest. Clin. Mex. 36:179-192, 1984.
- Bernard, M. and Behrman, H., 1979 METHODS OF HORMONE RADIOIMMUNOASSAY, 2d.edition. Academic Press, New York, San Francisco.
- Crouch, J., 1978. ANATOMIA HUMANA FUNCIONAL, 1a.ed., Editorial C.E.C.S.A. México.
- Darnell J. and Baltimore D., 1991 MOLECULAR CELL BIOLOGY 2d. edition. Scientific American Books. New York.
- Early, P. y Brace, S., 1985 PRINCIPLES AND PRACTICE OF NUCLEAR MEDICINE. The C.V. Mosby Co., St. Louis, Toronto, Princeton.
- Freeman, L. and Blaufox, M., 1975 RADIOIMMUNOASSAY, Grune & Stratton Inc., New York.
- Garza, F. et al. APUNTES PARA EL CURSO NACIONAL SOBRE METODOLOGÍA DE RADIOISÓTOPOS Y RADIOINMUNOANÁLISIS. (Lezama, C. y F. Zambrano, Eds.) ININ. México. (1993).
- Gershengorn, M. and Neintraub, B. THYROTROPIN INDUCED HYPERTHYROIDISM CAUSED BY SELECTIVE PITUITARY RESISTENCE TO THYROID HORMONE. J. Clin. Invest., 56:633, 1975.
- Ham, A. y Cormack D., 1986 TRATADO DE HISTOLOGIA. 8va ed. Interamericana. México.
- Henry, J. 1984.; DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO CLINICOS POR EL LABORATORIO, 7a.ed. Salvat. México.
- Hunter, W. and Corrie, J., 1983. IMMUNOASSAYS FOR CLINICAL CHEMISTRY, 2d.edition. Churchill Livingstone, New York.
- Lenhinger, A. 1988 BIOQUÍMICA, Omega. Barcelona.

- Margani, R. 1989. INMUNOLOGIA E INMUNOQUIMICA, FUNDAMENTOS, 4a.ed.. Panamericana, México.**
- Odell, W. Franchimont, P., 1983. PRINCIPLES OF COMPETITIVE PROTEIN-BINDING ASSAYS, 2d.edition. John Wiley & Sons., New York, Toronto, Singapore.**
- Roitt, Ivan. 1980 ESSENTIAL IMMUNOLOGY. Fourth edition. Blackwell Scientific Publications. Oxford.**
- Ville, C. 1986 BIOLOGIA, 7a.ed., Interamericana, México.**

Bibliografía no citada.

Alvar, A., ESTADISTICA MINIMA EN EL CONTROL DE CALIDAD DE LABORATORIO. Rev. Lab-acta 1/1: 21-23, 1989

Alvar, A., ESTADISTICA MINIMA II. LOS DATOS DE RESUMEN A MEDIANO PLAZO. Rev. Lab-acta 1/2: 9-14, 1989

Alvar, A., ESTADISTICA MINIMA III. LA ESTADISTICA Y LA DEMANDA DE UN PROGRAMA INTERNO. Rev. Lab-acta 1/3: 9-11, 1989

Alvar, A., ESTADISTICA MINIMA IV. LA PRECISION Y EL ESTADO DEL ARTE. Rev. Lab-acta 1/4: 11-12, 1989

Alvar, A., ESTADISTICA MINIMA V. LA CARENCIA DE CONTROLES. Rev. Lab-acta 2/1: 11-12, 1989