

ANÁLISIS DEL IMPACTO DE LA IMPRECISIÓN EN LAS DETERMINACIONES DE LAS RESPUESTAS DE LOS PATRONES Y LAS MUESTRAS, EN LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR INMUNOANÁLISIS. MÉTODO PRÁCTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE INTRAENSAYO .

*Samy Cembal, Jorge Ambrosio, Claudio Aranda, Miriam Colombani, Cecilia Fenili, Erich Fradinger, Alicia Klecha, Déborah Sragowicz y Cecilia Zylbersztein.

INTRODUCCIÓN:

Cuando se informa el resultado de la medición de una magnitud, es necesario proporcionar alguna indicación cuantitativa de la calidad del resultado, de manera tal que se pueda evaluar su confiabilidad. Sin esa indicación, los resultados de las mediciones no podrían ser comparados, ni entre sí, ni con respecto a valores de referencia dados en G.U.M. (guía ISO para la expresión de Incertidumbres)

El parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza a la dispersión de los valores que razonablemente podrían ser atribuibles a la muestra es la **INCERTIDUMBRE TOTAL DEL MÉTODO**.

En este trabajo se analizarán, para un único ensayo, los factores de duda en el resultado de origen metodológico en el proceso de medición de muestras: **INCERTIDUMBRE INTRAENSAYO**.

Durante años se han realizado determinaciones cuantitativas con Inmunoensayos competitivos y no competitivos, manuales y automatizados, usando diferentes señales físicas (radioactividad, inmunofluorescencia, quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia, colorimetría). Todas tienen en común, que se requiere realizar una calibración del sistema, para determinar la concentración de un analito.

El grado de imprecisión de las respuestas físicas obtenidas depende de la concentración del analito en la muestra analizada. Esta imprecisión es conocida como **RELACION ERROR RESPUESTA (RER)**.

Los métodos de procesamientos de datos, habitualmente empleados analizan la imprecisión con que se determina la respuesta de cada muestra, y la imprecisión resultante en la concentración del analito, expresado como coeficiente de variación. Sin embargo, no tienen en cuenta la influencia de la imprecisión y el desvío de los puntos experimentales en la calibración del sistema, y su impacto en el resultado final de las muestras de los pacientes.

La imprecisión en la determinación de los patrones o calibradores, tiene como consecuencia la obtención de una banda de calibración. Esto determina en el resultado, lo que denominaremos **incertidumbre en el resultado por la calibración (Uc)**.

La imprecisión experimental de la respuesta física de la muestra, tiene como consecuencia la obtención de un rango de resultados posibles, correspondiente a la incertidumbre del resultado por la determinación (Ud). El conocimiento de ambos, Uc y Ud, permite calcular a partir de un único proceso de calibración, los posibles resultados que pueden corresponderle a la concentración de

una muestra problema (U_t), para el ensayo realizado.

Es decir que la incertidumbre intraensayo de la dosis de una muestra (U_t) estará dada por la suma estadística entre la incertidumbre de la dosis por la calibración del sistema (U_c) y la incertidumbre de la dosis por la medición de esa muestra problema (U_d).

El objetivo de nuestro trabajo es presentar un método de cálculo de la incertidumbre por la calibración, mostrar su impacto en el resultado de una muestra, y proponer un método para determinar la INCERTIDUMBRE TOTAL INTRAENSAYO DEL RESULTADO .

MATERIALES Y MÉTODOS:

Materiales:

El trabajo experimental se llevó a cabo con un radioinmunoensayo (RIA) manual para determinar Testosterona sérica, con tubo recubierto con anticuerpo anti-testosterona, y ^{125}I Testosterona como trazador (Diagnostic System Labs.Webster, Texas, USA). Para realizar la calibración del sistema el equipo provee seis patrones liofilizados, con concentraciones de 0; 0.1; 0.5; 2.5; 10.0 y 25.0 ng/ml de la hormona y para control interno dos sueros liofilizados: C1 (0.3-0.7 ng/ml) y C2 (3-7 ng/ml).

Se utilizaron controles comerciales de matriz humana valorados en tres diferentes niveles (Bio-Rad Laboratories,Irvine,CA,USA), Biorad 1: 0.38-0.68 ng/ml, Biorad 2: 4.4-6.4 ng/ml y Biorad 3: 8.4-16.4 ng/ml y dos muestras, una masculina y otra femenina, que fueron seleccionadas de individuos sanos, para evaluar los resultados en diferentes zonas del rango analítico.

Instrumental:

Contador gamma multipozo (10) automático : Wallac1470 WizardTM Automatic Gamma Counter .

Baño termostatzado : Vicking S.R.L. Modelo Masson N° 6090

Pipetas: Socorex Swiss 10-100 μl y Dispensadora por repetición Eppendorff , ambas calibradas para presentar un CV% no superior al 3.5%

Métodos de Cálculo:

a-Suma estadística de errores $\%U_{\text{total}} = (\%U_c^2 + \%U_d^2)^{1/2}$ $\%U_{\text{total}}$ = incertidumbre total
 $\%U_c$ = incertidumbre porcentual por la calibración
 $\%U_d$ = incertidumbre porcentual por la determinación

b- Programa de cálculo: Para el procesamiento de los datos experimentales se utilizó el software: Cembal 2.0

Ecuaciones de calibración (4 parámetros y punto a punto)

$$B/B_0\% = [B - \text{NSB}] / [B_0 - \text{NSB}] \cdot 100 = [1 / 1 + (C/C_{50})^m] \cdot 100$$

donde: B = Respuesta (cpm), unión del trazador en presencia de una dosis de analito= C
 B_0 = Respuesta (cpm), unión del trazador cuando la dosis es igual a 0

NSB=Unión no específica, lectura de cpm, en ausencia de reactivo específico (anticuerpo)

C50= Dosis que origina una respuesta (cpm) = 0.5 Bo

m= (pendiente de una representación logit=log) /- 2.3

-4 parámetros: Calcula los valores de Bo y NSB, para utilizar a lo largo de la curva de calibración un solo valor de m y C50

- Punto a Punto: Calcula los valores de m y C50 válidos para cada rango de concentración respetando los valores de Bo y NSB experimentales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

El ensayo se realizó de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los patrones, muestras y controles, fueron procesados por decuplicado (n=10).

Para poder conocer con que grado de exactitud se realizan las determinaciones, es necesario saber el valor verdadero de las muestras y controles ensayados. Esta información nunca está disponible para este tipo de técnicas, ya que no se cuenta con patrones internacionales que pudieran ser incluidos como muestras en el ensayo.

Sin embargo podemos, al disponer de 10 replicados para cada patrón, control y muestra, tomar el valor promedio de los 10 replicados como el valor más probable para cada uno de ellos, en ese ensayo.

Si se calibra el sistema con los valores promedio de respuesta de cada patrón, y se interpolan los valores promedio de los controles y las muestras en esa calibración; podemos aceptar que para la serie enunciada, los valores calculados son los más probables para las muestras y controles.

Sin embargo como el método de cálculo que se elige para la calibración, introduce diferencias de criterio en la calibración del sistema, se hace necesario considerar a esta elección como otro factor de duda en el resultado final.

En la Tabla 2 se muestran los resultados más probables (RMP) para muestras y controles en dos métodos de cálculo, 4 parámetros (4P) y punto a punto (PP).

Si bien no es posible en la práctica realizar las determinaciones aumentando el número de replicados, es necesario poder expresar el resultado acompañado de un rango que incluya al valor más probable.

El cálculo de este rango debe considerar los principales factores de error e imprecisión que determinan la "duda" de la medida. A dicho rango lo denominamos rango de incertidumbre. Teniendo en cuenta que en el procedimiento habitual del inmunoensayo se realiza la calibración del sistema procesando los patrones por duplicado, fueron seleccionados al azar dos replicados de cada patrón (cpm) Tabla 3, obteniendo los valores para la curva de calibración que denominamos

Curva A. A su vez se seleccionaron al azar duplicados de las respuestas correspondientes a las muestras y controles,

No se dispone hasta el presente de un criterio firme que nos permita elegir el método de cálculo más apropiado, por cuanto se basan en presunciones diferentes. Mientras que el método punto a punto acepta que los patrones y las respuestas son exactas, el método de los 4 parámetros acepta que los patrones pueden haber sido mal determinados o que el valor indicado sea incorrecto. Sin embargo, aunque elegimos el método logístico de cuatro parámetros para construir la Curva A, el cálculo de incertidumbre tiene en cuenta la duda que se produce por la elección del método de procesamiento de datos.

Estimación del grado de variación del resultado debido a factores de calibración:

En los inmunoensayos, se pueden observar diferencias por la interpolación de una respuesta de una muestra (cpm) en una curva de calibración distinta de la más probable. Estas diferencias son de origen aleatorio y no sistemático, ya que se producen como consecuencia de haber cometido un error casual en la determinación de las respuestas de los patrones.

Por lo tanto, se hace necesario estimar el grado de diferencia que se observa en el resultado como consecuencia de la incertidumbre de calibración (U_c), no siempre considerada en la expresión del resultado analítico de una muestra.

En este trabajo se propone un método de cálculo para estimar este error, que es aplicable a las determinaciones realizadas por duplicado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los duplicados de los patrones nos proporcionan una idea de la imprecisión con que fueron determinadas sus respuestas. Además, para establecer la curva de calibración, hemos utilizado dos métodos de cálculo, a fin de conocer el desvío que puede observarse como resultado tanto de un error en la concentración de los patrones, como por la dispersión casual de los valores de respuesta encontrados para cada uno de ellos. Todos estos factores introducen incertidumbre en el resultado.

Como primer paso para el cálculo de la incertidumbre por la calibración es necesario conocer los límites estadísticos para los promedios de las respuestas de cada patrón.

A partir de los valores individuales para cada patrón se determina el $cv\%$ ($n = 2$), imprecisión de la medición de la respuesta (cpm).

Para conocer el rango en que puede variar el promedio que se calcula con un par de valores, determinados con esa imprecisión se calcula el E:S (error standard) para $n = 2$.

Es importante destacar que para un método de medición, la imprecisión de cada valor individual no puede ser modificada y está definida por el $cv\%$ (coeficiente de variación), mientras que la precisión del valor promedio calculado con n replicados, varía con el valor de n , y queda expresado con el E.S % o su valor absoluto E.S. Al restar y sumar este valor absoluto de E.S. al promedio de las respuestas para cada patrón (Curva A) se obtienen los límites estadísticos para las respuestas promedio que se determinaron con los dos replicados. Observe que los valores individuales son los límites estadísticos para los promedios que se determinan con los dos replicados.

De esta forma, los promedios de los patrones podrían tomar valores de "Curva A + ES" como valor límite superior y "Curva A - ES" como valor límite inferior.

Las respuestas promedio de los duplicados de muestras y controles seleccionados se interpolan en la "Curva A", con el método de 4P y en las "Curva A + ES" y "Curva A - ES", por los dos métodos de cálculo, 4P y PP,

Se obtiene en consecuencia para una misma respuesta en cuentas por minuto (cpm), cuatro valores de dosis. A continuación se seleccionan los valores máximos y mínimos que resultan de comparar los cuatro resultados de dosis para una misma respuesta,

Por ejemplo, para 7200 cpm (Bio 2), el valor de dosis calculado en la curva A usando el método de 4P es de 6.23 ng/ml, en A + ES los resultados son 6.48 mg/ml (4P) y 6.33 ng/ml (PP) y en A - ES, los resultados son 6.00 ng/ml (4P) y 5.81 ng/ml (PP). Por lo tanto los valores máximos y mínimos serán 6.48 ng/ml y 5.81 ng/ml respectivamente. La incertidumbre por la calibración se calcula así:

$$UC = \frac{\text{Valor máximo} - \text{Valor mínimo}}{\text{Valor Promedio (Curva A)} \times 2} \times 100$$

$$UC = \frac{6.48 - 5.81}{6.23 \times 2} \times 100$$

Cálculo de la incertidumbre del resultado por factores de la determinación de la respuesta (cpm) de la muestra (Incertidumbre por la determinación).

El cálculo de Ud se describe a continuación:

- 1-Los valores de las respuestas de controles y muestras y sus promedios se interpolan en la Curva A.
- 2-Con estos valores se calcula la incertidumbre por la imprecisión en la determinación de la respuesta de la muestra.

Por ejemplo, para Bio 2, la respuesta promedio es de 7200 cpm; el valor interpolado en la Curva A es 6.23 ng/ml. Los valores de respuestas individuales 6949 cpm y 7450 cpm, cuyos los valores interpolados en la Curva A son 6.70 ng/ml y 5.81 ng/ml, respectivamente.

Ud % se calcula con la siguiente ecuación:

$$U_d = \frac{\text{Valor máximo (Curva A)} - \text{Valor mínimo (Curva A)}}{\text{Valor Promedio (Curva A)} \times 2} \times 100$$

$$U_d = \frac{6.70 - 5.81}{6.23 \times 2} \times 100$$

Cálculo de la incertidumbre total intraensayo del resultado.

La incertidumbre total intraensayo del resultado es la suma estadística de la incertidumbre por la calibración (U_c) y la incertidumbre por la determinación (U_d). La tabla 5 muestra los valores de U_c , U_d y U_t para los valores de dosis calculados. Por ejemplo, la U_t para Bio 2 es de 8.94%. Con el valor de U_t en porcentaje y el valor de la dosis calculado, se determina la incertidumbre total intraensayo, expresada en ng/ml. Este valor indica los límites de dosis (Rango de dosis) dentro de los cuales podría haber estado el resultado. El objetivo de establecer los límites de las dosis calculadas con este procedimiento, contemplando la incertidumbre por la calibración y por la determinación es asegurar que el valor más probable se encuentra comprendido dentro de estos límites. En la última columna de la Tabla 5 se muestra el resultado más probable (RMP) para cada muestra según los valores indicados en la Tabla 2 para el método de cuatro parámetros (4P).

Los límites expresados con 1U, nos dan el 68% de probabilidad que el valor más probable se encuentre dentro de ellos; si estuvieran expresados con 2U, nos darían el 95% de probabilidad.

La magnitud U_t , no sólo permite calcular los límites del resultado de la muestra sino que también es útil para expresar dicho resultado con el número adecuado de cifras significativas. Los resultados expresados de esta forma se indican en la Tabla 5. Por ejemplo, para Bio 2, el cálculo de dosis por el método de 4P es de 6.23 ng/ml (Tabla 5). Este resultado está afectado por una U_t de 8.94%; por lo tanto el valor absoluto de $U_t = (6.23 \text{ ng/ml} \times 8.94)/100 = 0.557 \text{ ng/ml}$, y se expresa como 0.6 ng/ml.

Si se aplica este intervalo a 6.23 ng/ml, este número debe expresarse como 6.2 ng/ml. Por lo tanto los límites inferior y superior deben indicarse de la siguiente forma:

$$\text{Límite inferior} = 6.2 \text{ ng/ml} - 0.6 \text{ ng/ml} = 5.6 \text{ ng/ml}$$

$$\text{Límite superior} = 6.2 \text{ ng/ml} + 0.6 \text{ ng/ml} = 6.8 \text{ ng/ml (Tabla 5).}$$

CONCLUSIONES

La imprecisión con que se determinan las respuestas (cpm), tanto de los patrones como de las muestras son similares y no presentan diferencias por tratarse de patrones o muestras. Esta imprecisión se traslada al resultado final (ng/ml) de las muestras a través de caminos diferentes. Por un lado, la imprecisión con que se determina una muestra origina un rango de respuestas (cpm) probables, que al ser interpolado en la curva de calibración se traduce en un rango de dosis (ng/ml) probables (U_d).

Por otro lado, como se ha visto en este trabajo, la imprecisión con que se determinan las respuestas (cpm) para los patrones, da lugar a una dispersión de curvas de calibración probables. Esta dispersión se origina por la diferente combinación de las respuestas de cada uno de los patrones y por la elección del método de cálculo. Según la curva utilizada, la misma respuesta (cpm) para una muestra daría lugar a diferentes resultados (ng/ml), lo cual genera la incertidumbre por la calibración (U_c).

El método para el cálculo de la incertidumbre total intraensayo (U_t) del resultado, sugerido en este trabajo, resulta de considerar ambos factores que introducen variación o duda en el resultado de una muestra por causas aleatorias, la incertidumbre por la determinación (U_d) y la incertidumbre por la calibración (U_c).

En los métodos de procesamiento de datos más difundidos, la imprecisión por la calibración no es considerada, aún cuando puede producir un importante impacto en la imprecisión total del resultado. Por ejemplo, la muestra bio1 (0.85 ng/ml), presenta una incertidumbre por la calibración de 6.59 %, y de sólo un 2.06 % de incertidumbre por la determinación de la respuesta, siendo la incertidumbre total de 6.90 % (Tabla 5). De este modo, si no se considera la incertidumbre por la calibración, el rango de incertidumbre estaría subestimado con respecto al calculado con la incertidumbre total. Esta diferencia puede ser muy importante para los valores que se encuentran en los límites de los rangos normales.

Por lo tanto, la incertidumbre total intraensayo es el parámetro adecuado para expresar el rango en el cual podría estar el resultado de una medición efectuada por esta metodología (RIA), en ese ensayo.

Los resultados obtenidos para usos no diagnósticos, habitualmente se expresan acompañados de parámetros estadísticos que reflejan la calidad con que fueron determinados. En los laboratorios clínicos ese concepto no se incorpora en el informe final del resultado, y tampoco se expresa el mismo con el número de cifras significativas correctas.

Es habitual ver que los programas de procesamiento de datos para inmunoanálisis, incluidos los de los métodos automatizados, expresan los resultados con más cifras significativas que las correspondientes a los cv% que calculan.

El conocimiento del % total de incertidumbre del resultado, permite calcular el intervalo de la incertidumbre de la dosis, el rango de la dosis, y el número de cifras significativas con el que se debe expresar.

El método de cálculo del rango de incertidumbre propuesto, cumple con la premisa de que el valor más probable, para el ensayo realizado, se encuentra comprendido en ese rango, con un 68% de probabilidad, lo cual se verifica en la mayoría de los casos (ver Tabla 5).

Esa condición puede no cumplirse cuando el valor de la respuesta cpm determinada por duplicado, no se encuentra incluido en el rango que agrupa al 68 % de las respuestas probables y/o cuando la curva de calibración obtenida no se halla incluida en el rango que agrupa al 68% de las curvas probables.

En la muestra femenina, cuyo rango calculado para la medida es de 0.46 ng/ml a 0.56 ng/ml, y no incluye al valor más probable de 0.43 ng/ml, (Tabla 5), el valor asignado al azar a las respuestas de los duplicados (Tabla 4) determinan un valor promedio para la respuesta de 17728 cpm. Este valor está fuera del rango que contiene al 68 % de las respuestas probables determinadas por duplicado para esa muestra (18022 - 18742 cpm).

Cuando se desea utilizar el concepto de Incertidumbre, según normas ISO, como parámetro, asociado al resultado de una medición, que caracteriza a la dispersión de los valores que razonablemente podrían ser atribuibles a la muestra, debe considerarse la Incertidumbre total del método.

Este parámetro, permite conocer, analizando el rango de incertidumbre, si el procedimiento de análisis elegido es satisfactorio para la precisión que el diagnóstico clínico requiere en cada caso.

Nuestro grupo está analizando la aplicación de un método similar, para evaluar la Incertidumbre Total de una medida tanto en RIA, como en otras metodologías de inmunoanálisis, competitivos y no competitivos, manuales y automatizados.

Para conocer la Incertidumbre Total de una medida, practicada con un determinado método, resulta necesario evaluar la reproducibilidad con que los diferentes lotes de reactivos son elaborados. Vale decir la reproducibilidad en la preparación del set de patrones y la reproducibilidad de elaboración de los componentes críticos como ser anticuerpos, trazadores etc.

Estos factores sumados a los operativos, determinan la Incertidumbre Total de una medida realizada con un método y procedencia determinados.

En nuestra opinión este mismo análisis debería extenderse a todas aquellas metodologías que requieran una calibración previa del sistema.

Tabla 1: Respuestas (cpm) de los calibradores o patrones de testosterona (n=10), controles y muestras (n=10). Análisis Estadístico.

Número	Curva de Calibración							Controles y Muestras						
	Bo*	Bo*	0.1 ng/mL	0.5 ng/mL	2.5 ng/mL	10 ng/mL	25 ng/mL	Control	Control 2	Bi01	Bi02	Bi03	Muestra Femenina	Muestra Masculina
1	26828	26828	24031	17390	10769	6853	3679	18462	3200	16666	7361	4653	18099	7845
2	26972	26972	23667	17307	10611	6660	3594	18484	7623	15694	7299	4573	18067	7294
3	27021	27021	24010	17097	10649	6534	3505	18780	8431	14958	6949	4528	19115	7605
4	27003	27003	20751	16841	10339	6307	3600	18414	8416	15429	6751	4599	18848	7747
5	26149	26149	23766	17224	10358	6715	3693	18571	8122	15112	7332	4704	18925	7827
6	26179	26179	23273	17181	10534	6635	3654	18413	8341	15520	7319	4758	17339	8093
7	26512	26512	23663	17554	10577	6597	3356	17809	8046	15308	7005	4469	18480	7917
8	26552	26552	23493	17805	10966	6497	3505	17798	8298	15448	7450	4624	18514	7866
9	26256	26256	23010	17666	10529	6511	3478	18274	7711	15336	6906	4603	18262	7567
10	26034	26034	24369	17437	10331	6600	3598	17765	8277	15530	7366	4437	18100	7790
Promedio	26551	26551	23687	17350	10555	6650	3546	18284	8147	15405	7173	4595	18382	7754
D.S.*	385	385	1007	284	179	119	98	350	281	235	244	99	509	220
CV% ^b	1.5	1.5	4.3	1.6	1.7	2.1	2.7	1.9	3.4	1.5	3.4	2.2	2.8	2.8
E.S. _{n=10} ^c	122	122	318	90	56	38	31	111	89	74	77	31	161	70
E.S. _{n=2} ^d	272	272	712	201	126	84	69	248	198	166	172	70	360	156
E.S.% _{n=2} ^e	1.0	1.0	3.0	1.2	1.2	1.5	1.9	1.4	2.4	1.1	2.4	1.5	2.0	2.0
Límite Superior n=2 ^f	26823	26823	24399	17551	10682	6734	3615	18532	8345	15571	7345	4665	18742	7910
Límite Inferior n=2 ^g	26278	26278	22975	17149	10429	5566	3477	18036	7940	15239	7000	4525	18022	7598

*Bo es la respuesta experimental en cuentas por minuto (cpm) en ausencia de antígeno frío. b Coeficiente de variación (%). c Error Standard (cpm) de la media determinada con 10 replicados. d Error Standard (cpm) de la media determinada por duplicado. e Error Standard de la media determinada por duplicado, en porcentaje. f Calculado como Promedio+E.S n=2 (cpm). Indica el límite superior de los valores promedios determinados por duplicado. g Calculado como Promedio - E.S n=2 (cpm). Indica el límite inferior de los valores promedios determinados por duplicado.

Figura 1

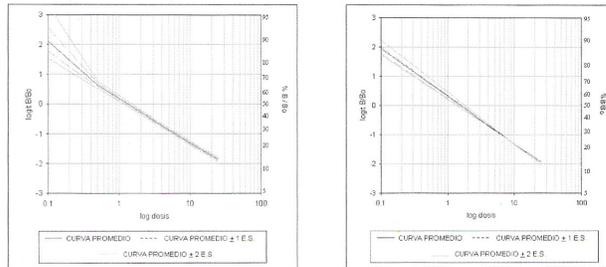


Figura 1:
Representación gráfica logit-log de los valores B/B₀ vs dosis, para todas las combinaciones posibles tomadas de los valores de la tabla 1.

a - Logit de B/B₀ en función del logaritmo de la dosis para todas las posibles combinaciones de los valores de la tabla 1 obtenidas por el método de cálculo, punto a punto.

b - Logit de B/B₀ en función del logaritmo de la dosis para todas las posibles combinaciones de los valores de la tabla 1 obtenidas por el método de cálculo, cuatro parámetros.

Tabla 2: Resultados más probables (RMP) para controles y muestras de testosterona por dos métodos de cálculo: Logístico de cuatro parámetros (4P) y Punto a punto (PP).

Muestra	Promedio ^a (cpm)	RMP 4P(ng/mL)	RMP PP(ng/mL)
Control 1	18284	0.437	0.420
Control 2	8147	4.90	4.64
Bio1	15405	0.899	0.804
Bio2	7173	6.40	6.13
Bio3	4595	15.1	15.1
Muestra femenina	18382	0.426	0.412
Muestra masculina	7754	5.44	5.18

^a Valor promedio de valores individuales de 10 respuestas experimentales de cada control y muestra.

Tabla 3: Selección al azar de duplicados de patrones para la calibración de la Curva A. Cálculo de los límites estadísticos para los promedios de las respuestas experimentales de cada patrón de acuerdo a la imprecisión con la cuál fueron determinadas (Curva A).

Patrones (ng/mL)	Curva A					
	B ^a (cpm)	B ^b (cpm)	Promedio ^c (cpm)	E.S. %	Promedio + E.S. ^{c,d} (cpm)	Promedio - E.S. ^{c,e} (cpm)
0	26512	26972	26742	0.86	26972	26512
0.1	23765	23663	23714	0.21	23765	23663
0.5	17307	17437	17372	0.37	17437	17307
2.5	10339	10529	10434	0.91	10529	10339
10	5534	5837	5685	2.67	5837	5534
25	3589	3356	3472	3.34	3589	3356

^a B y B^a son los valores individuales de las respuestas experimentales de cada patrón, tomadas al azar de la tabla 1, como si hubieran sido determinadas por duplicado. ^b Valor Promedio de ^a. ^c Error Standard. ^d Indica el límite superior de los valores determinados por duplicado. ^e Indica el límite inferior de los valores determinados por duplicado.

Tabla 4: Selección al azar de duplicados para muestras y controles. Cálculo de la incertidumbre de los resultados de las muestras, debido a la calibración (Uc) y a la determinación de la dosis de cada muestra problema (Ud).

Muestras	Selección de Respuestas de Controles y Muestras		Interpolación en Curva A Promedio	Interpolación en Curva A + E.S.		Interpolación en Curva A - E.S.		Uc %	Cálculo de la incertidumbre por la determinación II				
	B ^a (cpm)	B ^b (cpm)		Respuesta ^b Promedio (cpm)	4P (ng/mL)	PP (ng/mL)	4P (ng/mL)		PP (ng/mL)	Dosis ^c ng/mL	Dosis ^c ng/mL	Dosis de la muestra ^d ng/mL	Ud %
	Control 1	18462	18274	18368	0.429	0.435	0.413	0.424	0.41	2.91	0.420	0.44	0.429
Control 2	8431	8122	8277	4.65	4.81	4.69	4.50	4.27	5.81	4.47	4.85	4.65	4.09
Bio1	15694	15520	15607	0.851	0.863	0.775	0.840	0.751	6.59	0.834	0.869	0.851	2.06
Bio2	6949	7450	7200	6.23	6.48	6.33	6.00	5.81	5.38	6.7	5.81	6.23	7.14
Bio3	4573	4624	4599	14.8	15.5	15.3	14.0	14.1	6.08	14.9	14.6	14.8	1.01
Muestra Femenina	18067	17389	17728	0.508	0.515	0.473	0.502	0.463	4.61	0.465	0.554	0.508	3.73
Muestra Masculina	7605	8093	7849	5.21	5.40	5.20	5.03	4.81	3.74	5.67	4.88	5.21	6.62

^a B y B^a Valores individuales de las respuestas experimentales para cada muestra, tomados al azar de la Tabla 1, como si hubieran sido determinados por duplicado. ^b Promedio de ^a. ^c Dosis y Dosis^c corresponden a la concentración obtenida por la interpolación de B y B^a en la Curva A usando logístico de 4 parámetros (4P). ^d Dosis de la Muestra es la concentración obtenida por interpolación de la respuesta promedio (tabla 3) en la Curva A usando 4P.

Tabla 5: Cálculo de la incertidumbre total intraensayo (Ut). Expresión de los resultados con cifras significativas.

Muestra	Curva A 4P ^a Ng/mL	Uc ^b %	Ud ^c %	Ut ^d %	Ut ^d ng/mL	Rango de Dosis ^e ng/mL	RMP ^f ng/mL
Control 1	0.429	2.91	2.33	3.73	0.02	0.41 - 0.45	0.44
Control 2	4.65	5.81	4.09	7.10	0.3	4.3 - 5.0	4.9
Bio1	0.851	6.59	2.06	6.90	0.06	0.79 - 0.91	0.90
Bio2	6.23	5.38	7.14	8.94	0.6	5.6 - 6.8	6.4
Bio3	14.8	6.08	1.01	6.16	0.9	13.9 - 15.7	15.1
Muestra Femenina	0.508	4.61	8.73	9.87	0.05	0.46 - 0.56	0.43
Muestra Masculina	5.21	3.74	6.62	7.61	0.4	4.8 - 5.6	5.4

^a Dosis obtenidas por la interpolación de las respuestas promedio de duplicados en la Curva A usando el método de 4P (Tablas 3 y 4). ^b Incertidumbre debida a la calibración. ^c Incertidumbre debida a la determinación de la muestra. ^d Incertidumbre total intraensayo: Suma estadística de Uc y Ud. ^e Rango de dosis donde se espera hallar el resultado más probable. ^f Respuestas promedio de duplicados interpolados en la Curva A, usando logístico de cuatro parámetros (4P). (Tablas 3 y 4).

*Los autores de este trabajo son miembros del Taller de Inmunoanálisis, creado en junio de 2000.
Dr.Samy Cembal (coordinador)
cembal@uolsinectis.com.ar
www.inmunoanalisis.com / www.cembal.com