



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“DETERMINACIÓN DE NIVELES SÉRICOS DE I-CAM Y V-CAM
EN MUESTRAS DE PACIENTES Y VALIDACIÓN DEL
PROCESO MEDIANTE ELISA SÁNDWICH.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA:

Devi Reyes Valdez

Asesor Adjunto:

Dr. Jonnathan Guadalupe Santillán Benítez

Co-asesor:

Dr. Jesús Garduño García

Toluca, Estado de México, 2019



ÍNDICE

1. RESUMEN	4
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 EL ENDOTELIO VASCULAR, EXTRAVASACIÓN DE LEUCOCITOS Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR	5
2.1.1 Tejido epitelial y endotelio vascular	5
2.1.2 Moléculas de adhesión celular	7
2.1.3 Papel de las moléculas de adhesión ICAM Y VCAM	11
2.2 IMPORTANCIA CLÍNICA.....	14
2.3 ICAM-1.....	14
2.4 VCAM-1	16
2.5 PRUEBA ELISA.....	17
2.5.1 ELISA DIRECTO	19
2.5.2 ELISA INDIRECTO.....	21
2.5.3 ELISA SANDWICH.....	21
2.5.4 ELISA COMPETITIVO	21
2.5.5 LIMITACIONES	22
2.6 FUNDAMENTO DE LA PRUEBA ELISA PARA DETECCIÓN DE ICAM-1 Y VCAM-1	24
2.7 VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO	26
2.8 CALIBRACIÓN DE MÉTODOS.....	28
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
4. JUSTIFICACIÓN.....	30
5. HIPÓTESIS.....	31
6. OBJETIVOS	31
6.1 Objetivo general	31
6.2 Objetivos específicos.....	31
7. MATERIALES Y MÉTODOS	32

7.1	VCAM-1	32
7.2	ICAM-1.....	38
8.	RESULTADOS.....	43
8.1	VCAM-1	43
8.1.1	CURVA ESTÁNDAR.....	43
8.1.2	MEDICIÓN DE MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE LA MUESTRA MÁS ALTA.....	44
8.1.3	VALIDACIÓN DEL MÉTODO	45
8.2	ICAM-1.....	50
8.2.1	1.- CURVA ESTÁNDAR	50
8.2.2	MEDICIÓN DE MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE LA MUESTRA MÁS ALTA.....	51
8.2.3	VALIDACIÓN DEL MÉTODO	52
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	57
9.1	VCAM-1	59
9.2	ICAM-1.....	60
10.	CONCLUSIONES	61
11.	BIBLIOGRAFÍA.....	63

1. RESUMEN

Antecedentes: ICAM-1 y VCAM-1 pertenecen a un grupo de proteínas de tipo inmunoglobulina y se expresan sobre las células del endotelio vascular. La expresión de ICAMs es inducible e incrementa durante la activación celular, así el endotelio inflamado se caracteriza por un incremento en la expresión de ICAM-1 y de VCAM.1. El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utiliza una enzima como marcador para medir la formación de complejos antígeno-anticuerpo. El marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario. La validación es la confirmación, mediante evidencia objetiva, de que se cumplen los requisitos de un método para la utilización o aplicación específica prevista.

Objetivo: Determinar los niveles de moléculas de adhesión molecular I-CAM-1 y V-CAM-1 en pacientes; y realizar la validación del proceso mediante la técnica de ELISA Sándwich. **Materiales y Métodos:** Elaborar una curva de calibración para ICAM-1 y VCAM-1, medir muestras de pacientes aleatorios y determinar la muestra más alta, la cual será utilizada para realizar la validación, se llevan a cabo las pruebas de linealidad, repetibilidad y reproducibilidad. **Resultados:** Para la prueba de linealidad se obtuvieron los siguientes resultados: 1) VCAM-1 se obtuvo una $r^2= 0.99$ dentro del intervalo 193 ng /mL a 1550.808 ng /mL, con un % de recobro entre 93-100 % 2) ICAM-1 se obtuvo una $r^2= 0.99$, dentro del intervalo 160.173 ng /mL a 1256.808 ng /mL con un % de recobro entre 93-102 %. Para la prueba de repetibilidad 1) VCAM-1 se obtuvo un coeficiente de variación de 0.66 % - 2.73 %. 2) ICAM-1 se obtuvo un coeficiente de variación de 2.29 % - 4.86 %. En la prueba de reproducibilidad para 1) VCAM-1 se obtuvo un coeficiente de variación de 2.27 %, 2) ICAM-1 se obtuvo un coeficiente de variación de 3.90 %. Todas las pruebas son satisfactorias en ambos casos. **Conclusiones:** Dentro de los intervalos obtenidos en las pruebas de linealidad el método se comporta de manera lineal. De acuerdo con los resultados de repetibilidad y reproducibilidad podemos afirmar que el método es preciso. Dado el porcentaje de recuperación o recobro obtenido, podemos afirmar que el método es exacto. Los resultados obtenidos respecto a

linealidad, precisión y exactitud, la técnica de Elisa Sándwich es adecuada para determinación de niveles séricos de ICAM-1 y VCAM-1.

2. ANTECEDENTES

2.1 EL ENDOTELIO VASCULAR, EXTRAVASACIÓN DE LEUCOCITOS Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR

2.1.1 Tejido epitelial y endotelio vascular

El epitelio es un tejido avascular que recubre la superficie externa del cuerpo, y las cavidades internas cerradas como el sistema vascular (Ross y Wojciecj, 2015).

El tejido epitelial consiste en asociaciones de células muy juntas que forman laminas y el espacio intercelular se limita a hendiduras muy estrechas de unos 20 nm, de ancho (Welsch y Sobotta, 2008). Las células individuales que componen el epitelio pueden ser: planas, cubicas o cilíndricas en base a la estructura que presentan (Ross y Wojciecj, 2015).

Las células que integran los epitelios poseen las siguientes características principales:

Están acomodadas muy cerca unas de otras y se adhieren entre sí por medio de moléculas de adhesión. Poseen polaridad morfológica y funcional, por lo que cada morfología superficial, (apical, lateral o basal) se asocia con funciones distintas (Ross y Wojciecj, 2015).

Los epitelios son los primeros tejidos que se forman, en ellos se produce un recambio celular constante, por lo que mueren y se producen células nuevas constantemente

En algunos sitios, los epitelios tienen un nombre específico, este es el caso del revestimiento epitelial de los vasos sanguíneos y linfáticos, llamado endotelio (Ross y Wojciecj, 2015).

Los epitelios crean una barrera selectiva, en el caso del endotelio vascular, este recubre el sistema vascular formando una barrera que separa el torrente sanguíneo de los tejidos (Rojas, 2015).

El endotelio vascular es un epitelio simple plano, ya que contiene una sola capa (estrato) celular de espesor y las células que componen esta capa son planas (el ancho y largo son mayores que la altura), (Ross y Wojciecj, 2015).

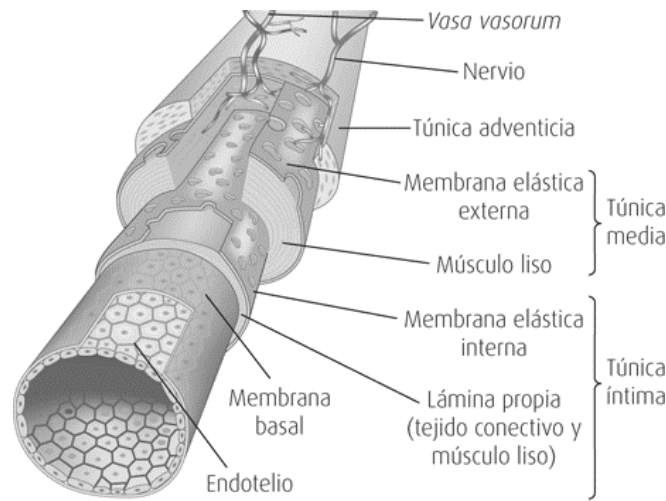


Figura 1. Estructura de un vaso sanguíneo (Saavedra, 2016)

La monocapa de células endoteliales que tapiza las paredes vasculares controla la comunicación entre la sangre y los vasos, ejerciendo un papel dual como sensor y transmisor de señales (Badimón y Martínez, 2001).

Entre las funciones del endotelio vascular están: ser una barrera física, el intercambio gaseoso, mantener la interfaz sangre-tejido en estado fluido no trombótico, regular la fibrinólisis, la producción de moléculas vasoconstrictoras y vasodilatadoras, generar citoquinas y quimioquinas, y dar paso a las células del sistema inmune hacia los tejidos (Rojas, 2015).

Estas dos últimas funciones son de suma importancia debido a que, cuando se genera la respuesta inmune, se requiere que los leucocitos acudan al tejido afectado para cumplir su función e iniciar el proceso de inflamación.

Las células endoteliales están unidas gracias a moléculas de adhesión JAM y Caderinas; expresan selectinas E y P e ICAM 2; sin embargo, no son adherentes para leucocitos en condiciones normales.

Cuando el endotelio vascular se activa por la intervención de citoquinas, mediadores de inflamación y otras moléculas expresan las moléculas ICAM-1 y V-CAM, las cuales facilitarían el paso de los leucocitos (Rojas, 2015).

El endotelio activado expresa / secreta citoquinas como la IL-1, factores de crecimiento, factores quimioattractores, y proteínas de superficie que actúan como moléculas de adhesión (CAM) de leucocitos circulantes (Badimón y Martínez, 2001).

2.1.2 Moléculas de adhesión celular

Las moléculas de adhesión son glicoproteínas de membrana con una porción extracelular que interacciona con el ligando, una porción transmembranal y una pequeña cola citoplasmática que puede intervenir en la transmisión de señales al interior celular. Se expresan en leucocitos y células endoteliales, permiten la interacción de células entre sí y con la matriz extracelular (González Et-al, 2010).

Estas moléculas de adherencia, llamadas *CAM*, son proteínas que inducen la adherencia de los leucocitos circulantes a las células epiteliales para su posterior paso a los tejidos por el proceso de extravasación.

Son moléculas que permiten la comunicación entre las células, son constituyentes o bien, actúan como receptores transmembranales. Participan en procesos relacionados con el desarrollo embrionario, control de la proliferación, diferenciación, migración celular, curación de las heridas, proceso inflamatorio y respuesta inmune (ROA et-al, 2001).

Se agrupan en diversas familias, según González en su libro *Inmunología biología y patología del sistema inmunitario*, podemos agruparlas en cuatro familias de acuerdo a su estructura: selectinas, ligados de selectinas (mucinas y diriginas), integrinas y por último las ICAMs (familia de las inmunoglobulinas).

Rojas las agrupa en 5 familias: Selectinas, Mucinas, Integrinas, ICAM e incluye en la última familia a las JAM y Caderinas.

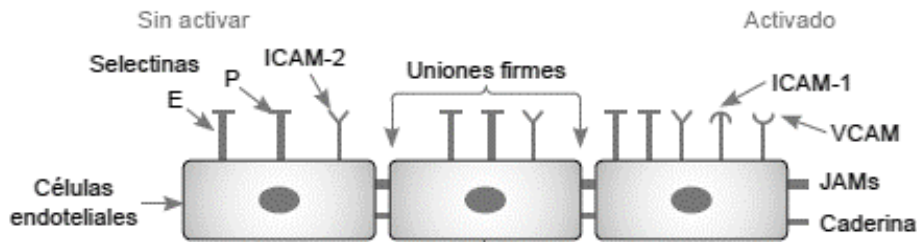


Figura 2. Moléculas que se expresan en el endotelio activado y sin activar (Rojas, 2015)

Selectinas:

Glicoproteínas que se encuentran en la membrana de la célula, cuya función es interactuar con los monosacáridos presentes en la membrana de otras células, por medio de un dominio del tipo de la lecitina (González Et-al, 2010).

Hay tres tipos de moléculas que conforman esta familia denominadas con las letras: P, E y L, de las cuales P y E se expresan en las células del endotelio durante una reacción inflamatoria (Rojas, 2015).

La P se encuentra en los cuerpos de Weibel Palade (un tipo de gránulo) en las células endoteliales. Además, se encuentra en las plaquetas.

La E se encuentra en las membranas de las células endoteliales.

La L se expresa en los leucocitos y al interactuar con las mucinas inducen el acercamiento y rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio.

Estas selectinas se encargan de la adhesión inicial de los leucocitos al endotelio vascular (Rojas, 2015), (Owen A, 2007). Interactúan a través de su dominio lectina con la porción azucarada de glicoproteínas de membrana sialis Lewis (SLeX), las interacciones entre selectinas y ligandos son débiles y transitorias, se establecen y rompen rápidamente, de este modo los leucocitos arrastrados por el torrente sanguíneo “ruedan” sobre la superficie del endotelio vascular (González Et-al, 2010).

Median las interacciones entre las células sanguíneas y células endoteliales durante la adhesión leucocitaria en el proceso inflamatorio (ROA-et-al, 2001).

Mucinas y Diriginas

Son glicoproteínas que funcionan como ligandos de las selectinas.

La PSGL-1 es el ligando de la Selectina-P, es una glicoproteína de tipo mucina que se expresa en los leucocitos y actúa como principal ligando de la Selectina-P y Selectina-E.

Las diriginas en su mayoría son ligandos endoteliales de las selectinas, se denominan también “adresinas” porque dirigen y atrapan a los leucocitos durante su recirculación en los tejidos linfoides secundarios (González Et-al, 2010).

Integrinas

Son moléculas presentes en las membranas de los leucocitos que se unen a las ICAM presentes en la membrana de las células del endotelio vascular. Esta interacción asegura la adherencia de los leucocitos al endotelio. La integrina LFA-1 es la más representativa (Rojas, 2015).

Son una familia de 24 receptores formados por cadenas α y β . Las integrinas $\beta 2$ se expresan exclusivamente en leucocitos, y podemos destacar a la LFA-1 que juega un papel importante en la adhesión firme, y la migración de los leucocitos sobre el endotelio vascular, la LFA-1 tiene por ligando a las moléculas ICAM presentes en el endotelio vascular activado. Las integrinas $\alpha 4\beta 7$ también son de importancia ya que interaccionan con las adresinas e ICAM y la integrina $\alpha 4\beta 1$, mejor conocida como VLA-4 interacciona además con VCAM en el endotelio vascular (González Et-al, 2010).

Pertencen a la familia de las glicoproteínas, participan en la agregación plaquetaria, inflamación, reacción y respuesta inmune, curación de las heridas y en la patogénesis de las metástasis tumorales.

ICAM

Son un grupo de proteínas que poseen al menos, un dominio de tipo inmunoglobulina, y por ello se clasifican como miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se

expresan sobre las células del endotelio vascular y se unen a las integrinas. Las principales son: 1) ICAM -1, la cual se encuentra en la membrana de las células endoteliales y se une a la LFA-1. 2) ICAM-2, la cual se expresa espontáneamente en la membrana de las células epiteliales y que interactúa con LFA-1, 3) VCAM-1, expresada en el endotelio por acción de la IL-1 y que se une a la integrina VLA -4. La expresión de ICAMs es inducible e incrementa durante la activación celular, así el endotelio inflamado se caracteriza por un incremento en la expresión de ICAM-1 y de VCAM-1.

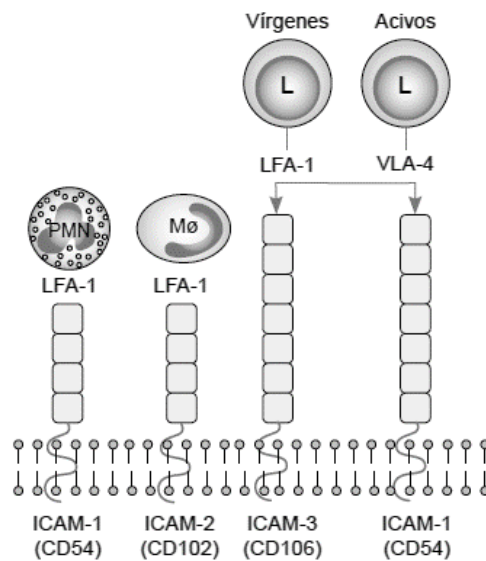


Figura 3. ICAMs y su interacción con integrinas (Rojas, 2015)

JAM

Mantiene las células del epitelio vascular juntas en condiciones normales, y dejan de expresarse cuando es necesaria la diapédesis de los leucocitos (González Et-al, 2010).

Caderinas

Aseguran la unión entre las células epiteliales, actuando como cremallera en las caras laterales de las células para dar paso a los leucocitos (González Et-al, 2010).

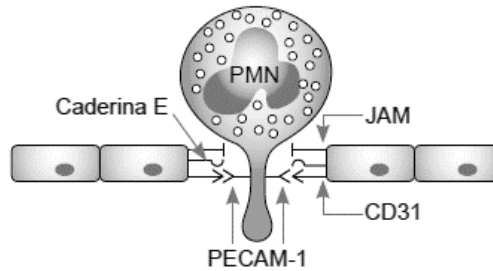


Figura 4. Caderinas y JAM controlan en paso de leucocitos por diapédesis (Rojas, 2015)

2.1.3 Papel de las moléculas de adhesión ICAM Y VCAM

Las moléculas de adhesión participan en distintos procesos fisiológicos pero el más representativo es la cascada de adhesión leucocitaria, la cual permite la extravasación de los leucocitos del endotelio vascular al parénquima tisular.

Cuando los patógenos superan las barreras externas la infección resultante puede inducir el proceso de inflamación, en la cual hay una vasodilatación que produce un aumento del volumen sanguíneo en la zona, aumenta la permeabilidad vascular por la cual se produce un edema que expande el tejido; en esta región inflamada se adhieren los leucocitos a las células endoteliales y pasan a través de las células para ingresar en el tejido.

Para que los leucocitos ingresen al tejido inflamado, estos deben adherirse a las células endoteliales de los vasos sanguíneos y pasar a través de ellas por el proceso denominado extravasación (Owen A, 2007).

Podemos resumir la cascada leucocitaria en las siguientes fases:

1. Captura del leucocito y rodamiento:

Los leucocitos circulantes establecen contactos transitorios con la pared vascular que les permiten adherirse a ella, esta fase esta mediada por interacciones entre selectinas y sus carbohidratos. Estas interacciones son débiles y transitorias, se establecen y rompen con rapidez, permitiendo que se produzcan contactos lábiles entre leucocitos y endotelio (Owen A, 2007).

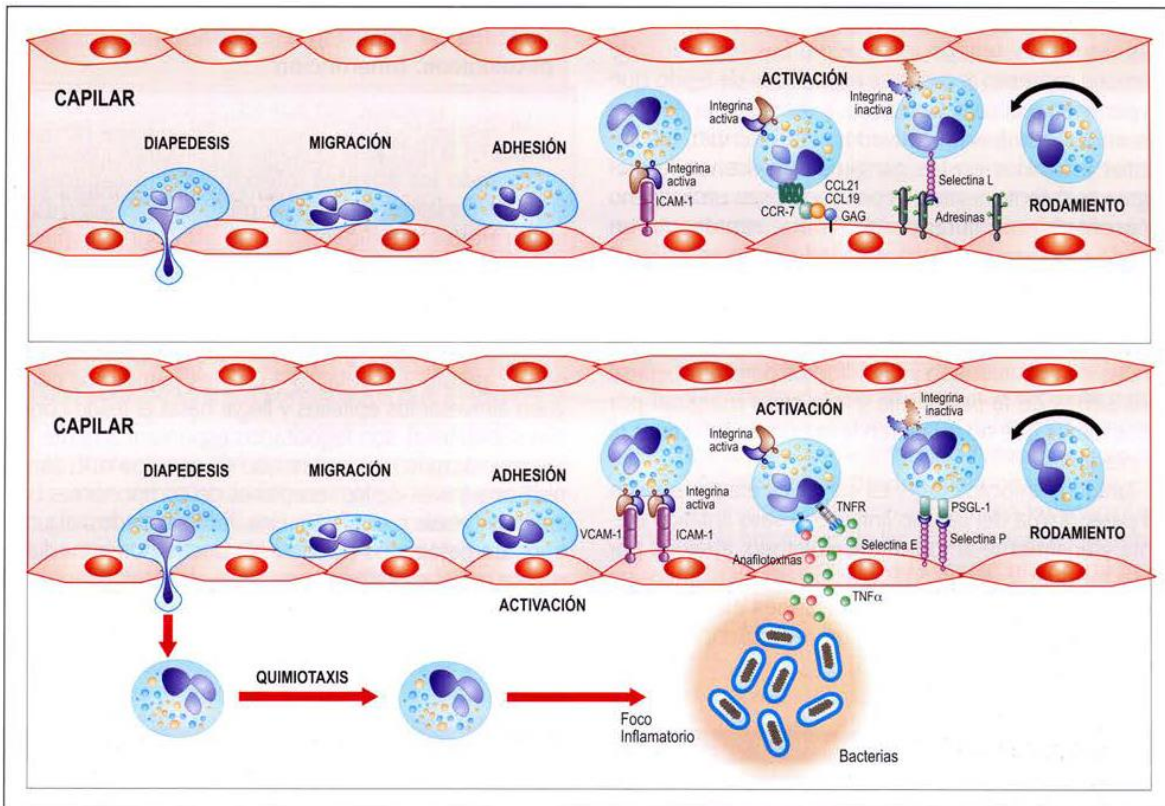


Figura 5. Función de las moléculas de adhesión durante la cascada de adhesión celular. (González Et-al, 2010)

2. Adhesión firme:

En condiciones normales los leucocitos mantienen sus integrinas inactivas, pero al ser activados se producen cascadas de señalización intracelulares que activan las integrinas leucocitarias a un estado de afinidad a los ligandos expresados en la superficie del endotelio vascular, esto permite la adhesión firme del leucocito que es mantenida principalmente por la interacción entre la integrina LFA-1 ($\alpha 1\beta 2$) y su ligando ICAM-1, y la integrina VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) con su ligando VCAM-1 (Owen A, 2007).

3. Migración

Una vez que el leucocito está fuertemente adherido comienza a migrar sobre la superficie del endotelio, esta fase esta mediada por interacciones entre las integrinas y sus ligandos que se rompen y reestablecen permitiendo el avance de la célula (Owen A, 2007).

4. Diapédesis.

El leucocito migra entre los contactos laterales de las células endoteliales pasando del torrente a la lámina (Owen A, 2007).

Este es el proceso normal que ocurre en la recirculación leucocitaria, cuando los linfocitos a su paso por los órganos linfoides secundarios pasan del torrente circulatorio al parénquima del órgano linfoide.

Cuando se tiene algún estado patológico, (en la inflamación) la cascada de adhesión leucocitaria sucede del siguiente modo:

Si un agente infeccioso supera las barreras físicas y químicas del cuerpo, alcanzando el medio interno, se activa una respuesta innata que involucra el sistema del complemento y las cininas. Si el patógeno llega hasta el tejido conectivo subepitelial es fagocitado por macrófagos, si el patógeno no puede ser destruido por macrófagos o está presente en un número demasiado elevado se produce un foco infeccioso, el cual desencadena la inflamación (Owen A, 2007).

Durante la inflamación se producen eventos entre los cuales se encuentra la inducción de la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales lo que tiene como resultado la unión y posterior extravasación de los fagocitos y linfocitos desde la sangre hasta los tejidos. Los cambios que tienen lugar en el endotelio vascular son inducidos por citoquinas pro inflamatorias principalmente TNF- α e IL-1 que tienen como resultado una amplificación en la cascada de adhesión leucocitaria. Se incrementa la expresión de moléculas de adhesión tanto de selectinas como de los ligandos de integrinas, primero se induce la expresión de Selectina P y Selectina E, que favorece el atrapamiento de leucocitos en la superficie del endotelio vascular en la zona inflamada, y se inicia la adhesión firme en la cascada de adhesión leucocitaria y se induce la activación de integrinas como VLA-4 y LFA-1, y a su vez en el endotelio inflamado se induce la expresión de ICAM-1 y VCAM, con lo que se obtiene un incremento en la adhesión firme del leucocito al endotelio que finaliza con las fases de migración y diapédesis, (Owen A, 2007).

2.2 IMPORTANCIA CLÍNICA

Los niveles en sangre de estas dos moléculas en particular, son marcadores de importancia en ciertas patologías.

Se ha demostrado una expresión anómala de estas moléculas en tumores malignos como en el estómago, próstata, mama, linfomas no Hodking, riñón, páncreas (ROA et al, 2001).

El dominio extracelular de las CAM puede liberarse al torrente circulatorio y los valores circulantes de se relacionan con la expresión de estas moléculas a nivel celular, por lo que estos valores de evalúan como indicadores de lesiones ateroscleróticas y procesos patológicos como diabetes, dislipemias e hipertensión; en estas patologías se produce un aumento de las concentraciones de las moléculas (Badimón y Martínez, 2001).

En pacientes con cardiopatía isquémica se encuentran valores elevados de ICAM-1 y P-Selectina, y de ICAM-1 y VCAM-1 en pacientes con hipertrigliceridemia y enfermedad aterosclerótica periférica o cerebral (Badimón y Martínez, 2001).

2.3 ICAM-1

Las moléculas de adhesión Intercelular-1 son miembros de la familia de las inmunoglobulinas, y funcionan como un ligando para los LFA-1.

ICAM1

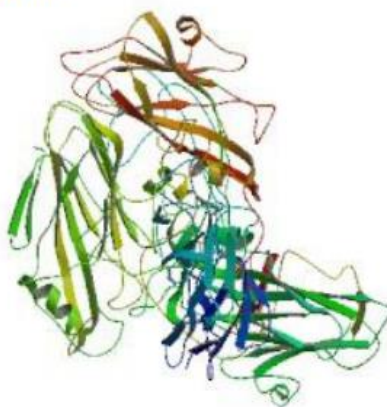


Figura 6. ICAM-1 (Phosphosite)

ICAM-1 es una cadena glicoproteica que puede ser expresada en células no hematopoyéticas como las células endoteliales, células epiteliales del timo, fibroblastos, y en células hematopoyéticas como macrófagos tisulares, linfoblastos, y en otras células como las pertenecientes a los nódulos linfáticos.

Las ICAM-1 son inducidas en fibroblastos y las células endoteliales por mediadores de la inflamación como la IL-1, TNF y IF, esto dentro de pocas horas y se correlaciona con la infiltración de linfocitos en las lesiones inflamatorias. Además, parecen ser el marcador inicial de las reacciones inflamatorias y son expresadas primero.

El rol de las ICAM-1 como marcador de enfermedades ha sido demostrado por un número de diferentes indicadores y situaciones patológicas. Por ejemplo, tiene una regulación positiva (aumento) en la inflamación de las vías respiratorias y es responsable del reclutamiento de leucocitos activados y de la patogenia de la rinitis alérgica.

En la dermatitis alérgica por contacto las ICAM-1 de los queratinocitos son inducidas alrededor de cuatro horas después de realizar la prueba del parche.

En el cáncer de vesícula existe una correlación directa entre la expresión de ICAM-1 y el grado histopatológico del tumor. En cáncer de hígado, los sueros de los pacientes muestran niveles más altos de ICAM-1 que los de aquellos pacientes que no padecen este cáncer. En pacientes con cáncer gastrointestinal con metástasis de hígado, los niveles de ICAM-1 son significativamente más altos, que aquellos que no presentan metástasis.

ICAM-1 es expresada en células malignas de neoplasias linfoides y mieloides, donde está relacionada con el grado de malignidad, como en el melanoma maligno donde los niveles de ICAM-1 en suero se ven incrementados, lo cual es un pronóstico importante.

Las moléculas de ICAM-1 tienen un papel importante en la patogénesis de la malaria trópica, donde estas moléculas sirven en la adhesión de los eritrocitos infectados al endotelio capilar.

Además, es un indicador de rechazo de tejidos, ya que aumenta durante el rechazo del corazón trasplantado, en el rechazo agudo de injerto renal y de riñón trasplantado

En pacientes insulino dependientes que sufren diabetes mellitus y personas con riesgo se encontraron niveles elevados de ICAM-1 y L-Selectina.

En las horas posteriores a un infarto agudo al miocardio se puede encontrar una disminución en los niveles de sICAM-1.

Podemos encontrar niveles elevados de esta molécula en los siguientes casos, glomerulonefritis, asma, fibrosis pulmonar idiopática, sarcoidosis y procesos inflamatorios dentro del sistema nervioso central. (BioVendor) (IBL) (Phosphosite.org)

2.4 VCAM-1

La Molécula 1 de adhesión de células vasculares (VCAM-1), es miembro de la súper familia de las inmunoglobulinas. Presenta seis dominios extracelulares semejantes a Ig. Según estudios de inmunoprecipitación, es una proteína de aproximadamente 110 kDa.

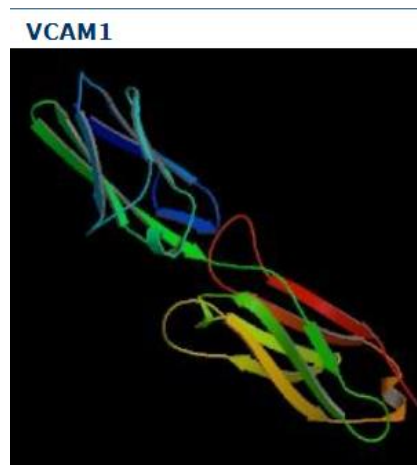


Figura 7. VCAM-1 (Phosphosite)

VCAM-1 es compatible con la adhesión de linfocitos, monocitos, células Natural Killer, eosinófilos, y basófilos a través de la interacción con el VLA-4, esta interacción lleva a una adhesión firme de los leucocitos circulantes no neutrófilos al endotelio.

Esta molécula además participa en la adhesión de leucocitos fuera de la vasculatura y no se expresa solo en el endotelio, también está presente en los macrófagos de tejido, las células dendríticas y los fibroblastos de la médula ósea.

Niveles aumentados de VCAM-1, pueden ser detectados en varias enfermedades:

Cáncer: ovario, gástrico-intestinales, renales, de vejiga, en linfoma de No-Hodking, y cáncer de mama.

Enfermedades Autoinmunes: esclerosis múltiple, esclerosis sistémica, lupus eritematoso sistémico, y artritis reumatoide.

Infecciones: sepsis, meningitis, malaria, vasculitis, cirrosis alcohólica, cirrosis biliar, Granulomatosis de Wegener.

Otros como insuficiencia renal, hemodiálisis, hipertiroidismo, y trasplante renal. (BioVendor) (IBL) (Phosphosite.org)

Cybulski y Gimbrone demostraron por medio de un experimento, que en el endotelio de las áreas donde se infiltran monocitos y se desarrollan lesiones arterioscleróticas se detectaban elevados valores VCAM-1, cuya expresión es indetectable en el endotelio normal (Badimón-Martínez, 2001).

2.5 PRUEBA ELISA

En la unión antígeno-anticuerpo, las interacciones son de tipo no covalentes como: puentes de hidrogeno, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, e interacciones de Van der Waals. Debido a que este tipo de uniones no son tan fuertes como una unión covalente se requiere de un número grande de uniones, de una corta distancia, y de un alto grado de complementariedad (especificidad) entre el antígeno y el anticuerpo para tener una unión Ag-Ac fuerte. Otro factor para una unión fuerte es la afinidad que tiene el sitio de unión en un anticuerpo y un epítipo único (Owen A, 2007).

Los ensayos inmunológicos son procedimientos en los cuales se utilizan anticuerpos como reactivos enlazantes específicos y tienen aplicación para la determinación o cuantificación de fármacos terapéuticos y no terapéuticos, diversas sustancias biológicas, sustancias infecciosas o anticuerpos de respuesta del huésped en el suero, en orina, en LCR, saliva, y en cualquier líquido biológico donde se encuentre la sustancia a investigar (Guzmán, 2004)

La identificación de Ag por medio de Ac permite su detección y cuantificación en muestras en las cuales se encuentran en muy pequeñas cantidades. Se cuenta con distintas pruebas con este propósito, como la prueba de las citotoxinas, el Radioinmunoensayo, el ensayo inmunoenzimático, técnicas que utilizan anticuerpos fluorescentes y las técnicas que usan como indicador la activación del complemento. Una de las más útiles es el ensayo Inmunoenzimático o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), el cual se utiliza para detectar Ac o Ag. Es una prueba análoga al radioinmunoensayo, pero en la cual se sustituye el isótopo radiactivo por una enzima como peroxidasa y fosfatasa (Owen A, 2007).

La prueba ELISA utiliza una enzima como marcador para medir la formación de complejos antígeno-anticuerpo. El marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpo específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario. Por lo general son ensayos en fase sólida en los cuales se adsorbe un antígeno o un anticuerpo sobre un soporte sólido. Algunos protocolos se basan en reacciones de enlace competitivo y otras en enlaces no competitivos, pero en todas se requiere un paso de separación para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enlazado; para esto se añade un sustrato enzimático y se mide la reacción catalítica entre la enzima y el sustrato. Las enzimas son marcadores sensibles y versátiles, una sola enzima puede transformar en minutos un gran número de moléculas de sustrato en una cantidad abundante de producto final, produciendo un cambio de color que se detecta con facilidad (Guzmán, 2004).

La prueba ELISA se basa en varias teorías (Guzmán, 2004):

1. El antígeno y anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica.
2. Las enzimas tienen actividad específica alta y convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite detectar concentraciones muy bajas de ligando.
3. La actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento.

4. Las enzimas no están presentes en el líquido biológico a analizar.

Los anticuerpos utilizados en ELISA son de origen monoclonal o policlonal que se suministran como antisuero no fraccionado o fracciones de inmunoglobulina purificada, pueden ser solubles o estar inmóviles en el soporte sólido, son empleados como conjugados no marcados o enzimáticos y por último reaccionan con un determinante antigénico específico de un antígeno o de un anticuerpo ligando-específico (anticuerpo primario), (Guzmán, 2004).

Los antígenos se purifican o se producen con tecnología recombinante y al igual que los anticuerpos se utilizan como conjugados marcados o enzimático y son inmóviles o solubles. Los conjugados enzimáticos son antígenos o anticuerpos unidos en forma covalente a la enzima de elección. El reactivo que se forma de la unión covalente entre enzima y antígeno o anticuerpo es el conjugado (Guzmán, 2004).

Las combinaciones de enzima y sustrato que se emplean en las pruebas ELISA incluyen:

- Peroxidasa de rábano y su sustrato, peróxido de hidrogeno que en presencia de cromógeno o-fenilendiamina produce un color amarillo-naranja.
- Galactosidasa beta y su sustrato o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido que se transforma en un producto nitrofenolado amarillento medible.
- Fosfatasas alcalinas y su sustrato p-nitrofenilfosfato que también se transforma en nitrofenolato. (Guzmán, 2004)

Se utiliza ácido para inhibir la actividad enzimática y estabilizar el producto final de reacción que tiene color. (Guzmán, 2004)

2.5.1 ELISA DIRECTO

El Ag es adsorbido en una fase sólida y se añade el Ac que se va a probar, el cual se detecta usando un Ac tipo Ig marcado con la enzima. La enzima conjugada con un anticuerpo reacciona con un sustrato incoloro para generar un producto con reacción de color, este sustrato es un cromógeno. La densidad óptica de la solución se mide después de un periodo definido, esta densidad óptica es proporcional a la cantidad de enzima, la cual a su vez se relaciona con la cantidad de anticuerpo probado. Estas pruebas tienen

sensibilidad comparable a los RIA, y tienen la ventaja de ser más seguras y menos costosas (Rojas, 2015).

Las soluciones para dilución de los reactantes y lavado de los pozos son variadas, la más utilizada es el regulador de fosfatos 0.01 M en solución salina 0.15 M a pH 7.4. Algunos recomiendan adicionar Tween 20 al 0.01 – 0.05 % a la solución de trabajo, otros lo evitan, especialmente si se tratan de antígenos de naturaleza lipídica. Un paso en las ELISA es el bloqueo de los pozos con soluciones de proteína ajenas al sistema Ag-Ac en estudio, siendo los bloqueadores más utilizados: albumina, gelatina, caseína, y leche descremada; la función de bloqueador es saturar los sitios no ocupados por el reactante inmunológico, usado para forrar la superficie de los pozos y evita la adsorción inespecífica de reactantes en los pasos subsecuentes. Los anticuerpos de detección son anticuerpos dirigidos contra alguno de los reactantes, el antígeno o el anticuerpo problema, acoplados a enzimas. Las enzimas de mayor uso son las peroxidasas de rábano, la fosfatasa alcalina, y beta-galactosidasa. Para el revelado del sistema se utiliza el sustrato de la enzima, a veces se requiere del uso simultáneo de un cromógeno, en otros casos, el cromógeno forma parte del sustrato como en el caso de la fosfatasa alcalina y de la beta-galactosidasa; el cromógeno, es necesario para que el producto resultante tenga algún color. El color se registra en un colorímetro a la longitud de onda de máxima absorción del producto coloreado (Rojas. -Espinosa, 2017).

Se cuenta con algunas variaciones de ELISA, que permiten la detección cualitativa o cuantitativa de antígeno o anticuerpo. Cada tipo se puede usar de manera cualitativa para detectar la presencia de un Ag o Ac, o bien realizar una curva estándar de concentraciones conocidas del Ag o Ac que se busca cuantificar, a partir de la cual se es posible determinar la concentración de una muestra (Owen A, 2007).

En los ELISA directo e indirecto, el antígeno se absorbe sobre la fase sólida, por lo general placas de un plástico especial de 96 pozos. En ELISA sándwich las placas se sensibilizan con anticuerpos dirigidos contra un antígeno problema. El ELISA directo se utiliza para cuantificar antígenos conocidos, ELISA indirecto para buscar y cuantificar anticuerpos contra antígenos conocidos, ELISA en Sándwich se utiliza para la búsqueda y cuantificación de antígenos (Rojas. -Espinosa, 2017).

2.5.2 ELISA INDIRECTO

Por medio de ELISA indirecto puede detectarse cualitativa o cuantitativamente un anticuerpo en suero o en alguna muestra que contenga el anticuerpo. La muestra con el anticuerpo a detectar (Ac1) se añade a un foso de microtítulo recubierto con antígeno y se permite que reaccione con el antígeno unido al foso. Después de eliminar por lavado cualquier resto de Ac1 libre, la presencia del Ac1 unido al antígeno se detecta mediante la adición de un segundo anticuerpo Ac2 conjugado con una enzima que se une al anticuerpo primario. Se elimina por lavado cualquier Ac2 libre y se añade el sustrato para la enzima. El producto formado por la reacción de color se mide con un lector espectrofotométrico de placa. (Owen A, 2007)

ELISA indirecto es la técnica de elección para detectar la presencia de anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). (Owen A, 2007)

2.5.3 ELISA SANDWICH

En esta técnica, el anticuerpo, en lugar del antígeno, se inmoviliza en el foso, se añade una muestra que contenga el antígeno, y se deja reaccionar con el anticuerpo inmovilizado. Después de lavar el foso, se agrega un segundo anticuerpo ligado a enzima específico para un epítotope distinto del antígeno y se permite que reaccione con el antígeno unido. Después de eliminar cualquier segundo anticuerpo libre mediante lavado, se añade sustrato y se mide el producto de la reacción de color. (Owen A, 2007)

2.5.4 ELISA COMPETITIVO

Es una variante para medir cantidades de antígeno, en esta técnica se incuban primero el anticuerpo en solución con una muestra que contiene antígeno, después la mezcla se añade a un pozo de microtítulo recubierto con antígeno; de este modo, cuanto más antígeno se encuentre en la muestra, tanto menos anticuerpo libre está disponible para unirse al foso recubierto con antígeno. La adición de un anticuerpo secundario (Ac2), conjugado con el enzima específico para el isotopo de un anticuerpo primario puede utilizarse para determinar la cantidad de anticuerpo primario unido al pozo. Cuanto es

más alta es la concentración de antígeno en la muestra original, tanto ms baja es la absorción (Owen A, 2007).

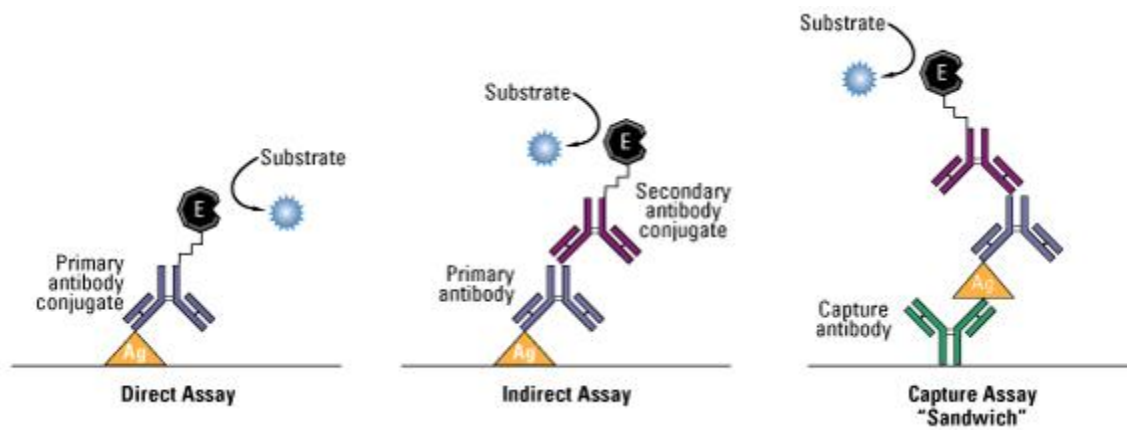


Figura 8. Tipos de ELISA (ThermoFisher Scientific)

2.5.5 LIMITACIONES

Como todo ensayo, esta prueba tiene limitaciones, entre las que se encuentran:

- El cambio de color, al ser mediado por enzimas, reaccionara indefinidamente. Por lo que si la reacción continua durante un período de tiempo suficientemente largo, la intensidad del color reflejará de forma inexacta la cantidad de anticuerpo primario presente, produciendo falsos positivos.
- Para detectar un anticuerpo o antígeno dado, un anticuerpo o antígeno recíproco debe ser generado.
- La unión no específica de el anticuerpo o antígeno a la placa puede llevar a un alto falso positivo. (Stephanie D. Gan, 2013).

Resumen del proceso general de la prueba ELISA

PASO	ELISA DIRECTO	ELISA INDIRECTO	ELISA SANDWICH
Pozo recubierto con	Antígeno	Antígeno	Anticuerpo
Lavado con regulador fisiológico ¹	3x	3x	3x
Bloqueo ²	✓	✓	✓
Incubación con	Ac-Enzima ³	Suero problema	Antígeno problema
Lavado con regulador fisiológico	4x	3x	3x
Incubación con:	-	Ac-enzima ⁴	Ac-enzima ⁵
Lavado con regulador fisiológico	-	4x	4x
Adición de sustrato + cromógeno ⁶	✓	✓	✓
Defenición de la reacción ⁷	✓	✓	✓
Lectura a la λ apropiada ⁸	✓	✓	✓

¹ Solución salina pH 6.0; solución salina- fosfatos pH7.4; solución salina-boratos pH 8.4; Tween 20 0.01-0.05 % opcional.

² Solución del Albúmina, caseína, gelatina o leche descremada 2-3 % en el regulador fisiológico.

³ Anticuerpo contra el antígeno, acoplado a una enzima: Peroxidasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, entre otras.

⁴ Anticuerpo contra las inmunoglobulinas de la especie problema (suero problema), acoplado a una enzima.

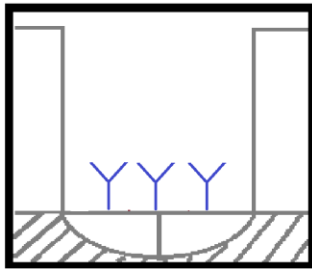
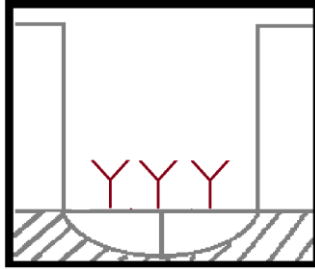
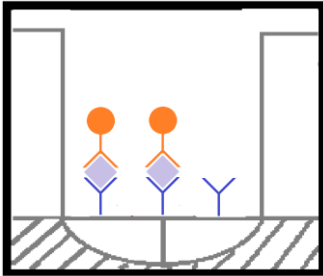
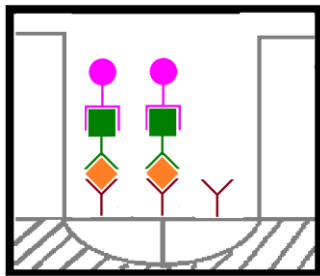
⁵ Anticuerpos contra el antígeno problema, el primer anticuerpo (de captura) usualmente es monoclonal, el segundo anticuerpo (de detección), acoplado a una enzima, casi siempre es policlonal.

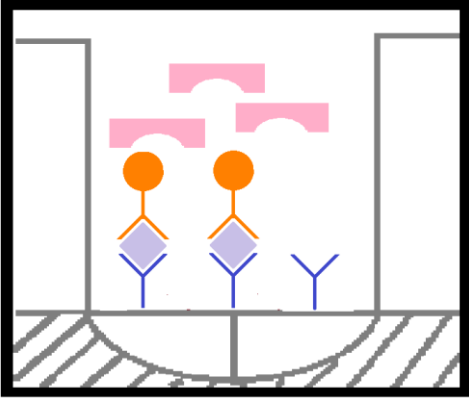
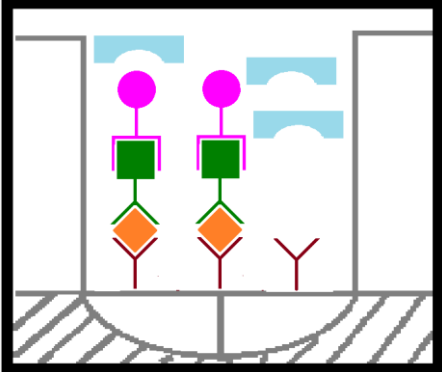
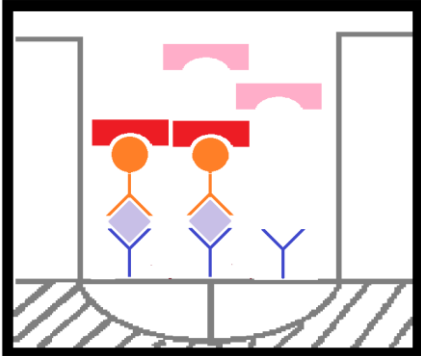
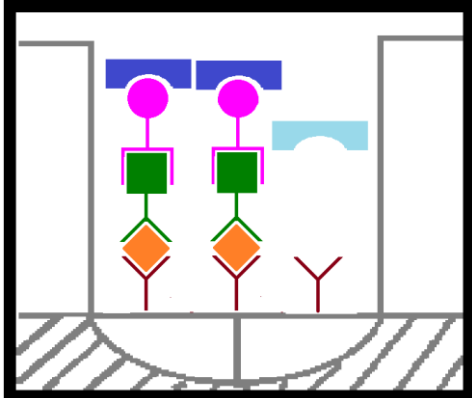
⁶ El sustrato y el cromógeno (cuando es necesario), dependen de la enzima.

⁷ La reacción se detiene con diferentes reactivos, dependiendo del cromógeno.

⁸ La longitud de onda de lectura depende del color del producto de la reacción enzima-sustrato-cromógeno.

2.6 FUNDAMENTO DE LA PRUEBA ELISA PARA DETECCIÓN DE ICAM-1 Y VCAM-1

ETAPA	ICAM-1	VCAM-1
1	 <p>Anticuerpo Anticuerpos Anti-sICAM-1 humana se encuentran sobre las micro celdas</p>	 <p>Anticuerpo Anticuerpos Anti-VCAM-1 humana se encuentran sobre las micro celdas</p>
2	Adición de la muestra	Adición de la muestra
3	Adición del conjugado HRP	Adición de mezcla de conjugado de biotina y Estreptavidina HRP
Primera incubación		
4	 <p>Conjugado HRP Muestra o Estándar</p> <p>Durante la incubación la sICAM-1 humana presente en la muestra o en el estándar se une a los anticuerpos de la micro celda, el conjugado HRP anti-ICAM-1 humana adicionado se une a la ICAM-1 atrapada por el anticuerpo.</p>	 <p>Muestra o Estándar</p> <p>Streptavidin HRP Conjugado Biotin</p> <p>Durante la incubación la VCAM-1 humana presente en la muestra o en el estándar se une a los anticuerpos adheridos a las micro celdas. Del conjugado (que contiene anticuerpo anti VCAM-1 conjugado a Biotina y Streptavidin-HRP), el anticuerpo conjugado con Biotina se une a la muestra capturada, y la</p>

		streptavidin-HRP se une al segundo anticuerpo anti VCAM con Biotina.
5	Lavado para eliminar el conjugado HRP no unido	Lavado para eliminar la Estreptavidina HRP no unida.
6	Adición del sustrato	Adición del sustrato
Segunda incubación		
	 <p style="text-align: center;">Substrato</p> <p>Durante la segunda incubación, la solución sustrato adicionada reacciona con el conjugado HRP (unido) que se quedó en la microcelda.</p>	 <p style="text-align: center;">Substrato</p> <p>Segunda Incubación: Después de la incubación la Streptavidin-HRP que no se unió es removida durante el lavado. LA solución sustrato solo reacciona con el HRP que contiene la microcelda.</p>
7	 <p style="text-align: center;">Substrato Reaccionando</p> <p>El producto coloreado es formado en proporción a la cantidad de ICAM-1 presente en la muestra o el estándar. La reacción se termina adicionando la solución de paro (ácido fosforico).</p>	 <p style="text-align: center;">Substrato reaccionando</p> <p>El producto coloreado es formado en proporción a la cantidad de VCAM presente en la muestra o estándar. La reacción se finaliza adicionando la solución de paro (ácido fosfórico)</p>
	Lectura	Lectura

2.7 VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades recursos, materiales, y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra. Un analito se define como un componente específico en una muestra a medir en un análisis, por lo que un método analítico, mide un componente específico en una muestra (CNQFB, 2002).

El proceso de validación permite el conocimiento e las características de funcionamiento del método y proporciona un alto grado de confianza en el mismo y en los resultados obtenidos al aplicarlo (INSHT, 1998).

Para la medición de un analito, en un tipo específico de muestra existen varios métodos analíticos disponibles, los cuales deben de cumplir con las necesidades metrológicas requeridas por el médico para un adecuado tratamiento del paciente, para esto se realizan las actividades de validación y verificación (CENAM, 2008).

La Validación es la confirmación, mediante evidencia objetiva, de que se cumplen los requisitos de un método para la utilización o aplicación específica prevista. Comprueba la aptitud de los procedimientos de examen y refleja las condiciones reales de la aplicación de los mismos. Por otro lado, La Verificación consiste en confirmar mediante evidencia objetiva que se han cumplido los requisitos especificados para un método, evaluando el desempeño del método para demostrar que se cumple con los requisitos que fueron especificados en su validación, sin embargo, el laboratorio debe verificar que puede aplicar correctamente los métodos, previo a su uso en los exámenes, bajo sus condiciones, generando evidencia objetiva para confirmar su correcta aplicación.

Antes de realizar la validación de los equipos, debe llevarse a cabo la calibración analítica de los equipos. La validación y/o verificación debe realizarse cuando existan cambios mayores.

La validación de un método debe incluir los siguientes parámetros: Linealidad, Precisión, Veracidad, Límite de detección, Selectividad, Sensibilidad analítica, Intervalo de trabajo, Especificidad analítica e Incertidumbre.

La verificación debe incluir los parámetros siguientes: Linealidad, Precisión, Veracidad e Incertidumbre

Los parámetros antes mencionados se describen a continuación:

- **Linealidad:** La capacidad, dentro de un intervalo dado, para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras de examen. En un método analítico, se refiere al tramo de concentraciones de analito en el que la respuesta del sistema de medición es una función lineal de la concentración.
- **Precisión:** Grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas.
- **Veracidad:** Grado de concordancia existente entre la media aritmética de un gran número de resultados y el valor verdadero o aceptado como referencia. Se relaciona con la presencia de errores de tipo sistemático.
- **Límite de detección:** Concentración mínima de un analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.
- **Selectividad:** La habilidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes en la matriz bajo condiciones establecidas de prueba.
- **Sensibilidad analítica:** Es la relación entre la señal obtenida de un sistema de medición y la correspondiente concentración del analito.
- **Intervalo de trabajo:** Intervalo de las concentraciones analíticas o los valores de las propiedades sobre las cuales el método va a ser aplicado. Dentro de este intervalo puede existir un intervalo de respuesta lineal.
- **Incertidumbre:** Parámetro que caracteriza la dispersión de los valores (resultados) que podrían ser atribuidos al mesurando.
- **Especificidad:** capacidad de determinar el analito inequívocamente en la presencia de componentes, los cuales se espera estén presentes (CENAM, 2008).

Otras definiciones de importancia son:

- Exactitud: grado de concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero de lo medido.
- Repetibilidad: Grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas de un mismo mesurando, llevadas a cabo totalmente bajo las mismas condiciones de medición.
- Reproducibilidad: Grado de concordancia entre los resultados de mediciones del mismo mesurando, realizadas en diferentes condiciones de medición.
- Recuperación: La recuperación es el cociente entre la cantidad de analito medida y el contenido en la muestra. En el caso ideal se obtiene un 100 % (CENAM, 2008).

2.8 CALIBRACIÓN DE MÉTODOS.

Una parte importante de todos los procedimientos analíticos es la calibración y estandarización del proceso. La calibración determina la relación entre la respuesta analítica y la concentración del analito. Algunos procedimientos analíticos requieren la comparación de una propiedad del analito con estándares o patrones tales que la propiedad que se está probando concuerde de manera muy cercana con la del estándar. Esta comparación puede ser con un estándar externo o interno (Skoog, 2009).

Un estándar o patrón externo se prepara por separado de la muestra, y un estándar interno se añade a la muestra. Se prepara una serie de tales estándares externos que contienen el analito en concentraciones conocidas, lo ideal es usar tres o más diluciones en el proceso de calibración (Skoog, 2009).

La calibración se logra al obtener la señal de respuesta en función de la concentración conocida de analito. De este modo, una curva de calibración o curva estándar se prepara con una gráfica de los datos ajustándoles una ecuación matemática aceptable, como la ecuación de la recta dada por la pendiente y la ordenada al origen (Skoog, 2009).

Después de realizar la curva de calibración, viene la etapa de predicción, en la que se obtiene la señal de respuesta para la muestra y se usa para predecir la concentración desconocida del analito a partir de la curva de calibración de mejor ajuste. Así, la concentración del analito se calcula aplicando los factores de dilución convenientes tomados de los pasos que se siguieron para preparar la muestra. En una curva de calibración, lo característico y casi siempre deseable, la gráfica se aproxima a una recta. El analista debe tratar de trazar la mejor línea recta que pase por los datos, el análisis de regresión proporciona los medios para obtener de forma objetiva la recta y también para especificar la incertidumbre asociada (Skoog, 2009).

La relación matemática que representa el modelo de regresión es:

$$y = mx + b$$

Donde b es la ordenada al origen, es decir el valor de y cuando x es cero, y m es la pendiente de la recta.

Cuando se usan patrones o estándares externos, se supone que se obtendrán las mismas respuestas cuando la misma concentración del analito esté presente en la muestra y el patrón, por lo tanto, la relación funcional de calibración entre la respuesta y la concentración del analito, debe aplicar también a la muestra.

En una determinación no suele usarse la medición original, sino que esta se corrige en función de un blanco, este blanco es idéntico a la muestra, pero sin analito (Skoog, 2009) (Dosal- Villanueva, 2008).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y se expresan sobre las células del endotelio vascular, con participación fundamental en la cascada de adhesión leucocitaria al permitir la firme adhesión de los leucocitos al endotelio vascular para su posterior extravasación a los tejidos.

Los niveles en sangre de estas dos moléculas funcionan como marcadores de importancia en ciertas patologías, tal es el caso de algunos tumores malignos, donde se ha demostrado su expresión anómala.

Por lo tanto, los valores circulantes en sangre de la fracción extracelular de estas moléculas se relacionan con la expresión de las mismas a nivel celular, por lo que estos valores funcionan como indicadores procesos patológicos.

4. JUSTIFICACIÓN

En la práctica clínica se requieren resultados confiables para un adecuado diagnóstico y tratamiento de los pacientes, por lo que se debe demostrar que los ensayos clínicos son adecuados para su propósito, mediante evidencia objetiva. La validación comprueba la aptitud de los procedimientos suministrando evidencia objetiva de que el método cumple con los requisitos para su aplicación prevista.

Un método validado para la determinación sérica de los niveles de moléculas de adhesión ICAM-1 y VCA1 nos va a proporcionar datos confiables, y al funcionar estos valores como indicadores de ciertas patologías, proporciona la posibilidad de un diagnóstico certero y un tratamiento adecuado.

5. HIPÓTESIS

Las pruebas de linealidad, repetibilidad y reproducibilidad cumplirán los criterios de aceptación establecidos en la validación del método analítico para la determinación de niveles séricos de ICAM-1 y VCAM-1.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

El objetivo del presente trabajo es determinar los niveles de moléculas de adhesión molecular I-CAM-1 y V-CAM-1 en pacientes; y realizar la validación del proceso mediante la técnica de ELISA Sándwich.

6.2 Objetivos específicos

- a) Elaborar una curva estándar para la determinación de cada molécula.
- b) Determinar los niveles de I-CAM y V-CAM en los pacientes seleccionados
- c) Establecer la validación del método cuantitativo por medio de ELISA Sándwich
- d) Analizar los resultados y determinar si el método cumple satisfactoriamente con los requerimientos establecidos para la validación el proceso.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 VCAM-1

Para realizar la validación del método de cuantificación de sVCAM-1 por Elisa Sándwich se siguió el siguiente procedimiento.

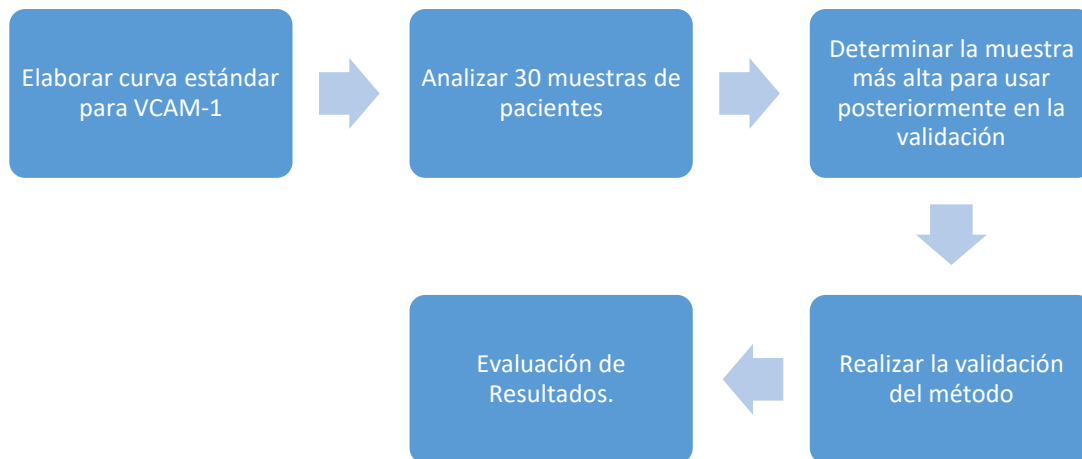


Figura. 9 Diagrama de Flujo General para realizar la validación del método.

Para determinar VCAM-1 se utilizó la técnica de Elisa Sándwich, de acuerdo al procedimiento proporcionado por el fabricante BioVendor®.

A.- Preparación de los reactivos

El kit proporciona los siguientes viales a partir de los cuales se preparan los reactivos a utilizar durante el procedimiento

- Conjugado (anticuerpos monoclonales anti-human sVCAM-1 con Streptavidin-HRP)
- Estándar liofilizado sVCAM-1 con concentración de 200 ng/mL
- Buffer de Ensayo concentrado
- Buffer de Lavado concentrado
- Solución Sustrato (Tetrametilbenzidina)
- Solución de Paro

- Controles alto y bajo

Para el procedimiento se deben preparar los siguientes reactivos de acuerdo a la cantidad a utilizar:

- *Buffer de lavado (1L):*

Numero de Filas	Concentrado de buffer de lavado (mL)	Agua destilada (mL)
1-6	25	475
1-12	50	950

Mantener a 2-25°C. Es estable por 30 días

- *Buffer de ensayo (100mL)*

Numero de filas	Concentrado de buffer de ensayo (mL)	Agua destilada (mL)
1-6	2.5	47.5
1-12	5.0	95.0

Mantener a 2-8°C. Es estable por 30 días

- *Conjugado (1:100)*

Debe ser utilizado en los próximos 30 minutos posteriores a su dilución

Numero de filas	Conjugado HRP (mL)	Buffer de ensayo (mL)
1-6	0.03	2.97
1-12	0.06	5.94

- *Estándar humano sVCAM-1*

Debe ser reconstruido con agua destilada. La concentración del estándar reconstituido es de 200 ng/mL. Permitir que el estándar reconstituido repose durante 10-30 minutos

antes de usarse, y mezclar bien antes de hacer diluciones. Después usarse, el estándar restante no puede ser almacenado y tiene que ser desechado.

- *Controles*

Reconstituir por adición de 150 µl de agua destilada a los controles liofilizados (10-30 minutos). Tratar los controles como muestras.

Mantener a -20°C. Evitar los ciclos de congelamiento y descongelamiento.

B. Preparación de las Muestras

Se utilizaron muestras de Suero.

Las muestras con precipitados deben ser clarificadas antes del ensayo. Se deben mantener congeladas a -20°C para evitar la pérdida de bioactividad sVICAM-1. Las muestras a ser corridas en las siguientes 24 horas deben ser guardadas entre 2 y 8°C. Las muestras deben ser llevadas a temperatura ambiente y mezcladas antes del ensayo.

Pre-diluir las muestras antes de iniciar el proceso 1:50 con buffer de ensayo (10ul de muestra + 490ul de buffer de ensayo).

C. Elaboración de la curva estándar

De acuerdo a las instrucciones del fabricante, las diluciones del estándar se pueden realizar en tubos o directo en las micro celdas, por lo que se eligió realizarlas directamente en las mismas. Se realizaron por triplicado.

1. Adicionar 100ul de buffer de ensayo a todas las celdas para estándares (A-F=).
2. Pipetear 100ul de estándar preparado en las celdas A1, A2 y A3. Mezclar.
3. Transferir 100ul a las celdas B1, B2 y B3 Mezclar
4. Repetir el procedimiento 4 veces más.
5. Descartar 100ul del contenido de las ultimas micro celdas (F1, F2 y F3)

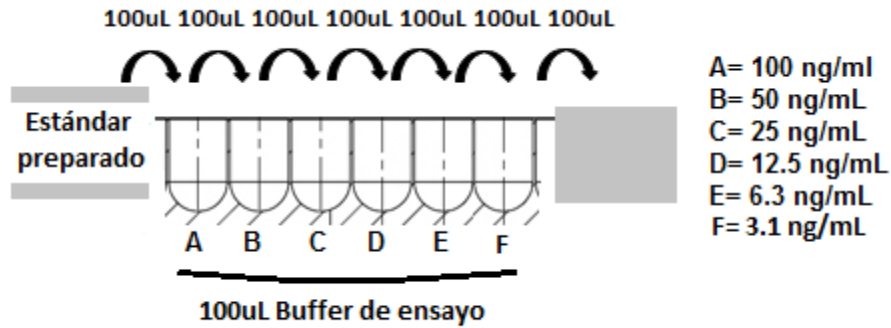


Figura 10. Diluciones para la curva estándar

D. Medición de las muestras

En este paso se incluyen los controles alto y bajo, ya que estos se tratan como muestras, además de incluir el blanco.

1. Adicionar 100ul de buffer de ensayo a la celda blanco
2. Adicionar 100ul de cada muestra pre diluida a cada celda muestra (como se describe anteriormente)

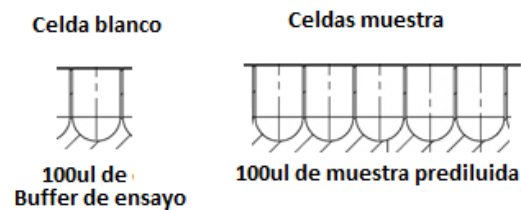


Figura 11. Celda blanco / Celda muestra

3. Preparar el conjugado, ya que este debe utilizarse en los 30 minutos posteriores a su dilución
4. Adicionar 50ul del conjugado a **todas las celdas (incluyendo las de la curva)**

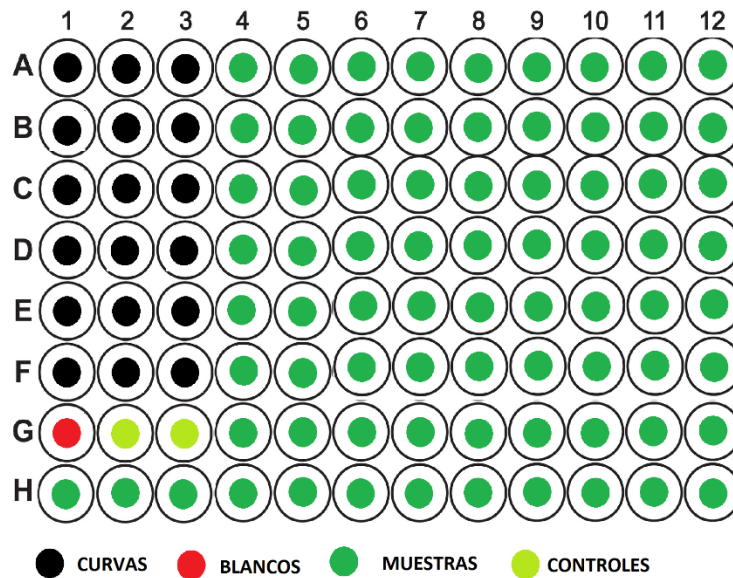


Figura 12 Ilustración de la placa utilizada

5. Cubrir con el film adhesivo e incubar a temperatura ambiente (18-25°C) por 2 horas.
6. Remover el film adhesivo y vaciar las celdas
7. Lavar 3 veces y proceder inmediatamente con el siguiente paso
 - a. Lavar con aproximadamente 400ul de buffer de lavado por celda, dejar la solución de 10-15 segundos antes de vaciar.
 - b. Aspirar el buffer de las celdas (vaciar).
 - c. Golpear sobre papel absorbente para absorber el buffer de lavado
 - d. No dejar que se sequen.
8. Pipetear 100ul de la solución sustrato TMB a todas las celdas
9. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos, evitando la exposición directa a la luz.
10. Parar la reacción pipeteando rápidamente 100ul de solución de paro a cada celda
11. Leer los resultados inmediatamente después de adicionar la solución o guardar por no más de 1 hora en la oscuridad a 2-8°C
12. Leer usando un espectrofotómetro a 450nm (o a 610-650nm).

Según el método anterior, las muestras se diluyeron 1:10, por lo que la concentración obtenida con la curva estándar debe ser multiplicada por el factor de dilución (x10)

D. Validación del Método

De acuerdo a la *Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empelados por el laboratorio clínico*, la validación comprueba la aptitud de los procedimientos y refleja las condiciones reales de la Validación de los mismos, estos datos los informa el fabricante, sin embargo, el laboratorio debe verificar que puede aplicar correctamente los métodos ya validados por el fabricante bajos sus propias condiciones. (CENAM, 2008).

En la validación se deben incluir los siguientes parámetros de desempeño: linealidad, precisión, veracidad, límite de detección, Selectividad, sensibilidad analítica, intervalo de trabajo, especificidad analítica, e incertidumbre (CENAM, 2008).

En esta ocasión, de acuerdo al material disponible se realizaron los siguientes ensayos:

- Linealidad
- Repetibilidad
- Reproducibilidad

7.2 ICAM-1

Para realizar la validación del método de cuantificación de sICAM-1 por Elisa Sándwich se siguió el siguiente procedimiento.

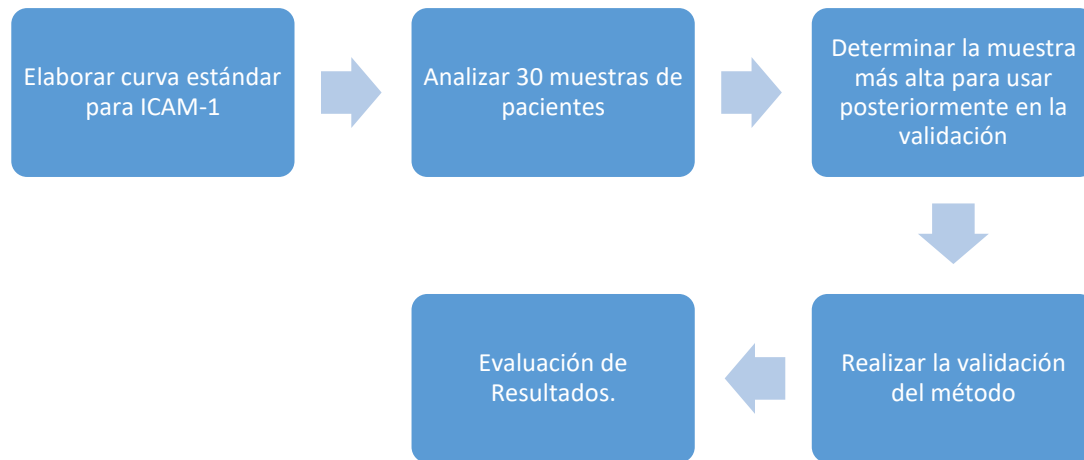


Figura. 13 Diagrama de Flujo General para realizar la validación del método.

Para determinar ICAM-1 se utilizó la técnica de Elisa Sándwich, de acuerdo al procedimiento proporcionado por el fabricante BioVendor®.

A.- Preparación de los reactivos

El kit proporciona los siguientes viales a partir de los cuales se preparan los reactivos a utilizar durante el procedimiento

- HRP-Conjugado de anticuerpos monoclonales anti-human sICAM.1
- Estándar humano de sICAM-1 (100 ng/mL)
- Diluyente de muestra
- Buffer de ensayo concentrado
- Buffer de lavado concentrado
- Solución sustrato (Tetrametilbenzidina)
- Solución de Paro (Ácido fosfórico)
- Controles alto y bajo

Para el procedimiento se deben preparar los siguientes reactivos de acuerdo a la cantidad a utilizar:

- *Buffer de lavado (1L):*

Numero de filas	Concentrado de buffer de lavado (mL)	Agua destilada (mL)
1-6	25	475
1-12	50	950

Mantener a 2-25°C. Es estable por 30 días

- *Buffer de ensayo (100mL)*

Numero de filas	Concentrado de buffer de ensayo (mL)	Agua destilada (mL)
1-6	2.5	47.5
1-12	5.0	95.0

Mantener a 2-8°C. Es estable por 30 días.

- *Conjugado HRP*

Numero de filas	Conjugado HRP (mL)	Buffer de ensayo (mL)
1-6	0.03	2.97
1-12	0.06	5.94

Debe ser utilizado en los próximos 30 minutos posteriores a su dilución

- *Controles*

Reconstituir adicionando 100ul de agua destilada a los controles liofilizados y reposar de 10-30 minutos. Tratar los controles como muestras. Mantener a -20°C. Evitar los ciclos de congelamiento-descongelamiento.

B. Preparación de las Muestras

Se utilizaron muestras de Suero.

Las muestras deben estar congeladas a -20°C para evitar la pérdida de bioactividad sICAM-1. Las muestras a ser corridas en las siguientes 24 horas deben ser guardadas entre 2 y 8°C . Antes del procedimiento las muestras deben ser llevadas a temperatura ambiente y mezcladas antes del ensayo.

C. Elaboración de la curva estándar

Al igual que para ICAM-1, se da la opción de realizar la curva en tubos o directamente en la placa, por lo que se realizó directamente en las micro celdas. Se realizaron por triplicado.

1. Adicionar 100ul de diluyente a las celdas B1, B2 y B3 – E1, E2 y E3, dejar vacías A1, A2 y A3
2. Pipetear 200ul de estándar en las celdas A1, A2 y A3
3. Transferir 100ul a las celdas B1, B2 y B3. Mezclar
4. Transferir 100ul a las celdas C1, C2 y C3.
5. Repetir el procedimiento 2 veces mas
6. Descartar 100ul del contenido de las ultimas micro celdas (E1, E2 y E3)

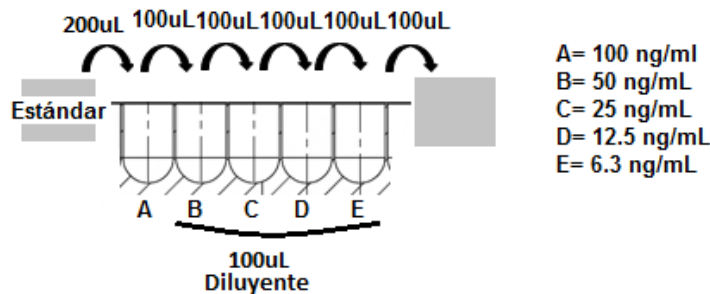


Figura 14. Diluciones para la curva estándar

D. Medición de las muestras

En este paso se incluyen los controles alto y bajo, ya que estos se tratan como muestras, además de incluir el blanco.

1. Adicionar 100ul de diluyente a la celda blanco F1
2. Adicionar 90ul del diluyente a las celdas de muestras
3. Adicionar 10ul de cada muestra a cada celda muestra

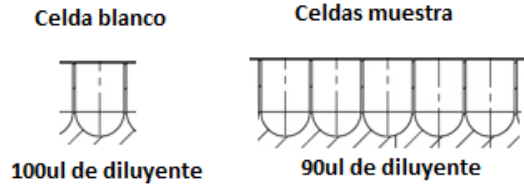


Figura 15. Celda blanco / Celda muestra

4. Preparar el conjugado HRP

- a. **El conjugado debe utilizarse en los 30 minutos posteriores a su dilución**

5. Adicionar 50ul del conjugado a **todas las celdas (incluyendo las de la curva)**

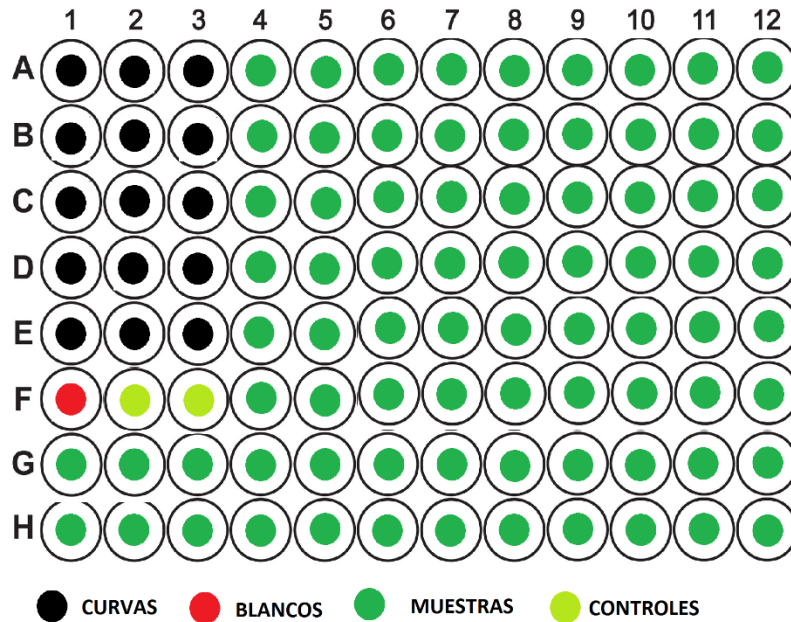


Figura 16. Ilustrativa de la placa utilizada

6. Cubrir con el film adhesivo e incubar a temperatura ambiente (18-25°C) por una 1 hora.
7. Remover el film adhesivo y vaciar las celdas
8. Lavar 3 veces y proceder inmediatamente con el siguiente paso
 - a. Lavar con aproximadamente 400ul de buffer de lavado por celda, dejar la solución de 10-15 segundos antes de vaciar
 - b. Aspirar.
 - c. Golpear sobre papel absorbente para absorber el buffer de lavado
 - d. No dejar que se sequen.

9. Pipetear 100ul de la solución sustrato TMB a todas las celdas
10. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos
11. Parar la reacción pipeteando rápidamente 100ul de solución de paro a cada celda
12. Leer los resultados inmediatamente después de adicionar la solución o guardar por no más de 1 hora en la oscuridad a 2-8°C
13. Leer usando un espectrofotómetro a 450nm (o a 610-650nm).

Según el método anterior, las muestras se diluyeron 1:50, por lo que la concentración obtenida con la curva estándar debe ser multiplicada por el factor de dilución (x50)

D. Validación del Método

Como se mencionó anteriormente, el laboratorio debe verificar que puede aplicar correctamente los métodos, para lo cual se realizaron los siguientes ensayos de acuerdo al material disponible:

- Linealidad
- Repetibilidad
- Reproducibilidad

8. RESULTADOS

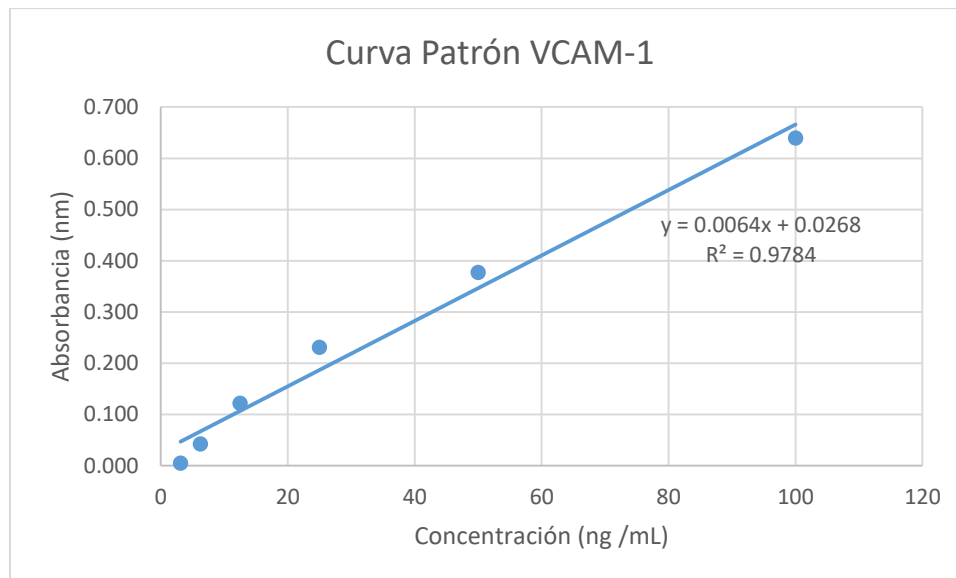
8.1 VCAM-1

8.1.1 CURVA ESTÁNDAR

De acuerdo a lo establecido en el inserto proporcionado por el fabricante, (metodología escrita anteriormente) se realizó por triplicado la curva patrón, obteniendo el siguiente resultado.

Co ng/mL	Abs 450 nm
100	0.640
50	0.377
25	0.231
12.5	0.122
6.25	0.043
3.12	0.005

Tabla 1. Absorbancias de la curva estándar VCAM-1



Grafica 1 Curva Patrón VCAM-1

La grafica anterior, corresponde a la curva estándar obtenida para VCAM-1 humana por diluciones del estándar humano de concentración igual a 100 ng/mL, presenta un rango de absorbancia de 640 nm para el punto con mayor concentración a casi 0 nm para la última dilución. Se obtuvo un coeficiente de determinación de $r^2 = 0.9784$. A partir de este grafico de obtienen las concentraciones de la serie de muestras a medir.

8.1.2 MEDICIÓN DE MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE LA MUESTRA MÁS ALTA

Utilizando la curva estándar antes obtenida, se determinó la concentración de VCAM-1 humana en 30 muestras de suero de pacientes aleatorios.

Paciente	Concentración (ng/mL)	Paciente	Concentración (ng/mL)
1	1561.020	16	590.937
2	1226.596	17	562.856
3	989.181	18	560.303
4	813.035	19	547.539
5	744.108	20	542.433
6	705.815	21	537.327
7	705.815	22	519.457
8	690.498	23	509.246
9	690.498	24	499.034
10	685.392	25	493.929
11	675.181	26	470.953
12	659.864	27	460.742
13	639.441	28	442.872
14	631.783	29	440.319
15	616.465	30	437.766

Tabla 2 Concentración de VCAM-1 medida en los Pacientes

El Promedio de las muestras medidas oscila alrededor de 600 ng /mL, como podemos observar en el gráfico de distribución normal (grafica 2), encontrándose la mayoría de los valores dentro los niveles normales de VCAM-1, los cuales van de 400.6 a 1340 ng/mL en muestras de suero.

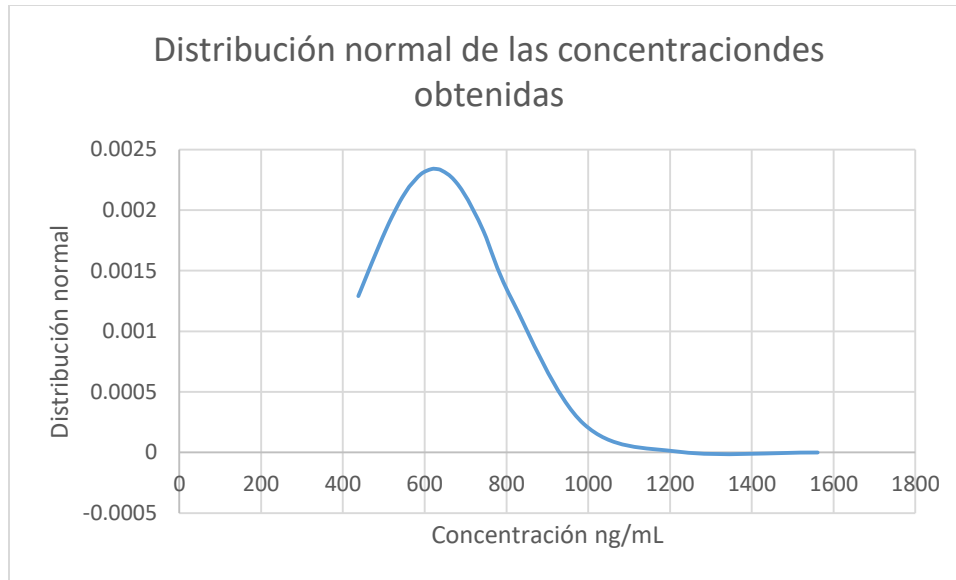


Gráfico 2 Distribución normal de las corridas de muestras

La muestra más alta medida en esta corrida de muestras se encuentra por arriba de los niveles normales, sin embargo, la absorbancia correspondiente a la concentración obtenida para esta muestra, se encuentra dentro del rango establecido por la curva de estándar.

ABSORBANCIA	CONCENTRACION
0.224	1561.020 ng/mL

Tabla 3 Concentración más alta obtenida de la corrida de pacientes

8.1.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

8.1.3.1 LINEALIDAD

La linealidad determina la capacidad dentro de un intervalo para proporcionar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras y para evaluarla se deben usar muestras de concentración conocida o una serie de diluciones conocidas de muestras altamente concentradas, y las mediciones o valores son comparadas con los valores asignados (teóricos) o valores de dilución (CENAM, 2008).

De acuerdo a lo anterior, de la serie de muestras medidas, se utilizó la muestra con la concentración más alta obtenida, a partir de la cual se realizaron las diluciones

correspondientes. Se realizaron diluciones en cuatro niveles de concentración, con tres replicas, ya que son los mínimos que marca la *Guía para la validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico*.

Para cumplir con la linealidad, se debe acatar el criterio que marca fabricante en el inserto proporcionado:

- Coeficiente de determinación = 0.99
- % de recuperación: 87-120 %

De acuerdo a las diluciones y mediciones realizadas, se obtuvieron los siguientes resultados:

DILUCIÓN	REPLICA 1		REPLICA 2		REPLICA 3		MEDIA
	Absorbancia	Concentración (ng/mL)	Absorbancia	Concentración (ng/mL)	Absorbancia	Concentración (ng/mL)	Co (ng/mL)
100	0.226	1561.020	0.224	1545.702	0.224	1545.702	1550.808
50	0.129	818.141	0.125	787.506	0.127	802.823	802.823
25	0.072	381.603	0.069	358.628	0.070	366.286	368.839
12.5	0.045	174.823	0.046	182.481	0.046	182.481	179.928

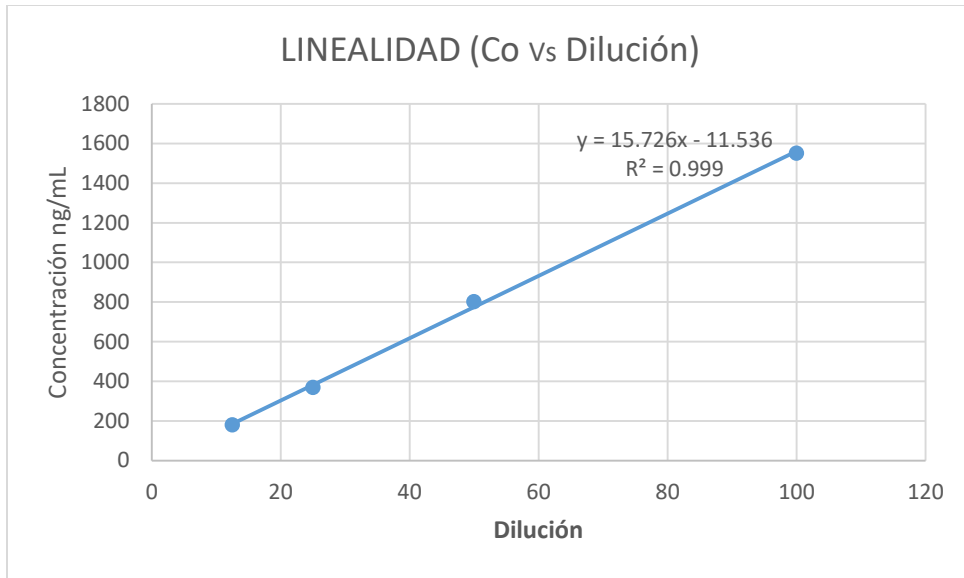
Tabla 4 Absorbancias y Concentraciones obtenidas de las diluciones realizadas

Se determinan los valores teóricos para cada dilución

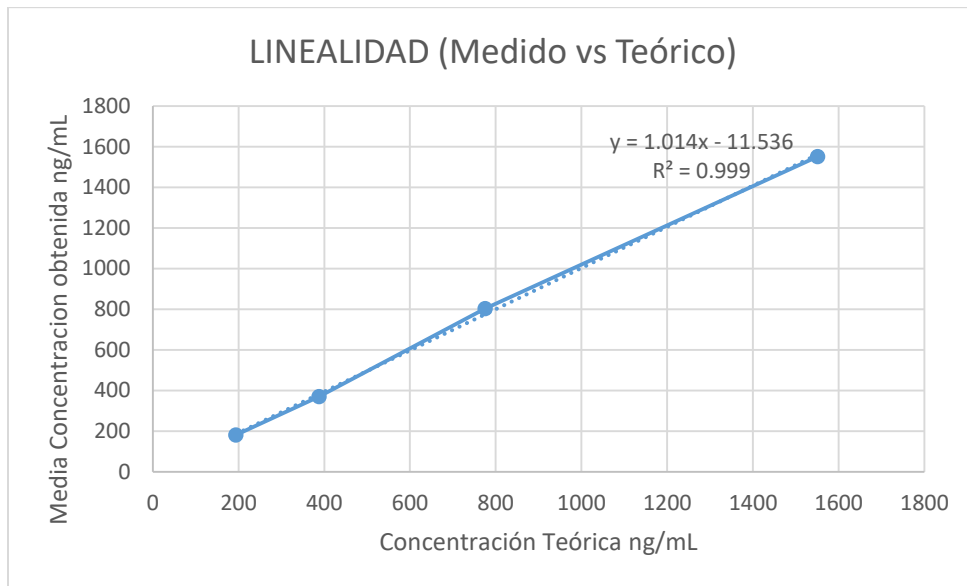
DILUCIÓN	Media Co Obtenida (ng/mL)	Co Teórica (ng/mL)
100	1550.808	1550.808
50	802.823	775.404
25	368.839	387.702
12.5	179.928	193.851

Tabla 5 Valores teóricos y valores obtenidos de las diluciones realizadas

Se realizaron las siguientes graficas: a) concentraciones obtenidas contra las diluciones correspondientes y b) concentraciones obtenidas contra las concentraciones teóricas; a partir de estas graficas se calcula la ecuación de la línea recta y el coeficiente de determinación el cual debe ser de por lo menos 0.99 (CENAM, 2008).



Grafica 3.a) Concentración obtenida vs dilución correspondiente



Grafica 4. b) Concentración obtenida vs Concentración teórica

Para el coeficiente de determinación, de acuerdo a la bibliografía y al criterio del fabricante, para ambos casos los resultados son satisfactorios, ya que para la gráfica a) el valor del coeficiente de determinación es de $r^2 = 0.999$ y para la gráfica b) el valor del coeficiente de determinación es de $r^2 = 0.999$.

Adicional a lo anterior, se calcula el sesgo, este se calcula por la diferencia del valor promedio obtenido de cada dilución y el valor teórico, y con este dato se obtiene el porcentaje de error y el porcentaje de recobro, este último dato el fabricante lo marca como criterio de aceptabilidad para la linealidad.

DILUCIÓN	Co Teórica (ng/mL)	Media Co Obtenida (ng/mL)	sesgo	% de error	% recobro
100	1550.808	1550.808	0.00	0.00	100
50	775.404	802.823	27.42	3.54	104
25	387.702	368.839	18.86	4.87	95
12.5	193.851	179.928	13.92	7.18	93

Tabla 6 Valores de % de error y % de recobro para cada dilución

8.1.3.2 REPETIBILIDAD

Para la prueba de repetibilidad, se realizaron tres experimentos independientes de seis muestras bajo las mismas condiciones de medición, estas fueron realizadas el mismo día, con el mismo procedimiento, analista, ubicación e instrumentos.

Para este parámetro, el criterio dictado por el fabricante es el siguiente:

- Coeficiente de variación no mayor de 5.2 %

Los resultados obtenidos del ensayo se presentan en la siguiente tabla:

N° MUESTRA	REPLICA 1 (Co ng/mL)	REPLICA 2 (Co ng/mL)	REPLICA 3 (Co ng/mL)	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)
1	112.72	113.61	114.22	113.52	0.75	0.66
2	71.95	72.98	72.63	72.52	0.52	0.72
3	48.88	49.86	50.41	49.72	0.78	1.56
4	31.95	32.83	33.11	32.63	0.60	1.85
5	20.57	20.02	20.10	20.23	0.30	1.48
6	13.95	14.55	14.70	14.40	0.39	2.73

Tabla 7 Resultados de Repetibilidad

Para cada muestrea, se determinó la concentración media obtenida de los tres ensayos y la desviación estándar. Con estos datos se calculó el coeficiente de variación, elemento con el que se evalúa la repetibilidad.

El coeficiente de variación obtenido entre los tres ensayos para cada muestra, se encuentra en un rango de 0.66 % - 2.73 %.

8.1.3.3 REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad fue evaluada con 3 ensayos independientes de ocho muestras de suero con distintos niveles de concentración, en condiciones diferentes.

De la corrida de 30 muestras de pacientes antes medidas, se tomaron diez muestras, para realizar este ensayo. La condición variable en cada caso es el tiempo y el instrumental, ya que se realizaron en días diferentes utilizando material distinto.

Para este parámetro, el criterio a evaluar según el fabricante es el siguiente:

- Coeficiente de Variación: no mayor a 3.1 %

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla;

N°Muestra	Condición 1 (Co ng/mL)	Condición 2 (Co ng/mL)	Condición 3 (Co ng/mL)	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)
1	1281.48	1226.60	1268.20	1258.76	28.64	2.27
2	833.46	813.03	832.45	826.31	11.51	1.39
3	680.29	690.50	683.67	684.82	5.20	0.76
4	615.19	616.47	616.70	616.12	0.81	0.13
5	730.07	705.82	725.04	720.31	12.80	1.78
6	741.56	744.11	740.79	742.15	1.74	0.23
7	607.53	631.78	612.89	617.40	12.74	2.06
8	691.77	685.39	682.41	686.53	4.78	0.70
9	630.51	662.86	642.86	645.41	16.32	2.53
10	500.31	480.95	495.95	492.41	10.15	2.06

Tabla 8. Resultados de Reproducibilidad

El coeficiente de variación más alto que se obtuvo fue para la muestra 1, con valor de 2.27 %, valor que se encuentra debajo del marcado por el fabricante.

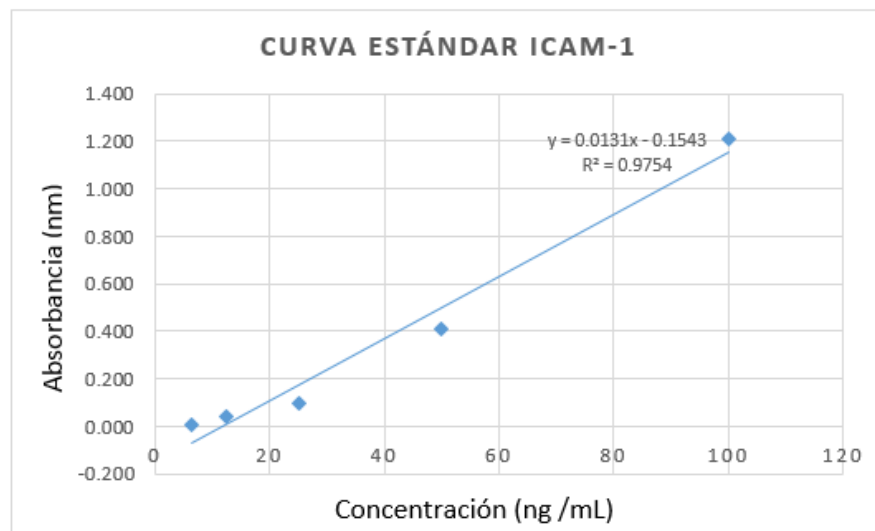
8.2 ICAM-1

8.2.1 1.- CURVA ESTÁNDAR

De acuerdo a lo establecido en el inserto proporcionado por el fabricante, (metodología escrita anteriormente) se realizó por triplicado la curva patrón, obteniendo el siguiente resultado.

Co ng/ml	Abs 450 nm
100	1.212
50	0.408
25	0.097
12.5	0.040
6.25	0.009

Tabla 9. Absorbancias de la curva estándar ICAM-1



Grafica 5 Curva Patrón iCAM-1

La grafica anterior, corresponde a la curva estándar obtenida para ICAM-1 humana por diluciones del estándar humano de concentración igual a 100 ng/mL, presenta un rango

de absorbancia de 1.212 nm para el punto con mayor concentración a casi 0 nm para la última dilución. Se obtuvo un coeficiente de determinación de $r^2 = 0.9754$. A partir de este gráfico se obtienen las concentraciones de las series de muestras a medir.

8.2.2 MEDICIÓN DE MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE LA MUESTRA MÁS ALTA

Utilizando la curva estándar antes obtenida, se determinó la concentración de ICAM-1 humana en 30 muestras de suero de pacientes aleatorios.

Paciente	Concentración (ng/mL)	Paciente	Concentración (ng/mL)
1	1256.541	16	522.089
2	1187.537	17	520.103
3	1003.890	18	494.536
4	997.563	19	492.302
5	974.674	20	459.536
6	870.670	21	455.564
7	862.591	22	450.351
8	782.320	23	448.117
9	638.507	24	415.848
10	615.174	25	408.897
11	575.954	26	389.287
12	574.217	27	374.394
13	551.876	28	373.897
14	537.479	29	365.706
15	531.521	30	315.316

Tabla 10 Concentración de ICAM-1 medida en los Pacientes

El Promedio de las muestras medidas oscila alrededor de 600 ng /mL, la a media reportada por el fabricante es de 504 ng /mL; en el grafico 2 podemos observar la

distribución normal de los valores obtenidos, los cuales se encuentran dentro los niveles normales de ICAM-1, que van de 302-1115 ng/mL en muestras de suero.

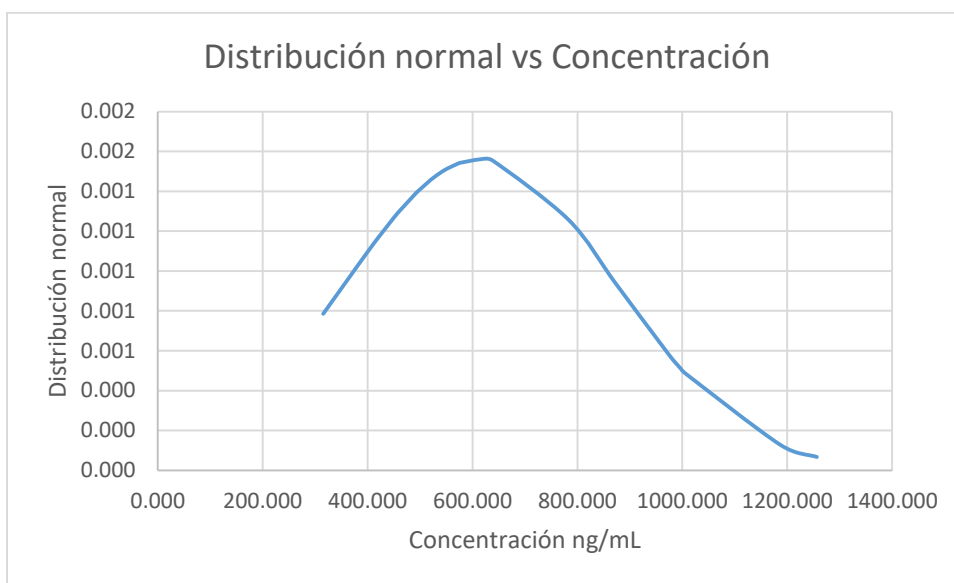


Gráfico 6. Distribución normal de la corrida de muestras

La muestra más alta medida en esta corrida de muestras se encuentra dentro de los niveles normales, por encima de la media y la absorbancia correspondiente a la concentración obtenida para esta muestra, se encuentra dentro del rango establecido por la curva de estándar.

ABSORBANCIA	CONCENTRACION
1.520	1256.20 ng/mL

Tabla 11 Concentración más alta obtenida de la corrida de pacientes

8.2.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO

8.2.3.1 LINEALIDAD

Al igual que para VCAM-1, de la serie de muestras medidas, se utilizó la muestra con la concentración más alta obtenida, a partir de la cual se realizaron las diluciones correspondientes en cuatro niveles de concentración, con tres replicas.

Para cumplir con la linealidad, se debe acatar el criterio que marca fabricante en el inserto proporcionado:

- Coeficiente de determinación = 0.99
- % de recuperación: 80-102 %

De acuerdo a las diluciones y mediciones realizadas, se obtuvieron los siguientes resultados:

Dilución	REPLICA 1		REPLICA 2		REPLICA 3		MEDIA
	Absorbancia	Concentración (ng/mL)	Absorbancia	Concentración (ng/mL)	Absorbancia	Concentración (ng/mL)	Co (ng/mL)
100	1.524	1259.324	1.518	1254.856	1.519	1255.600	1256.593
50	0.611	579.429	0.619	585.387	0.619	585.387	583.401
25	0.241	303.897	0.232	297.195	0.235	299.429	300.174
12.5	0.047	159.429	0.05	0.500	0.047	159.429	160.173

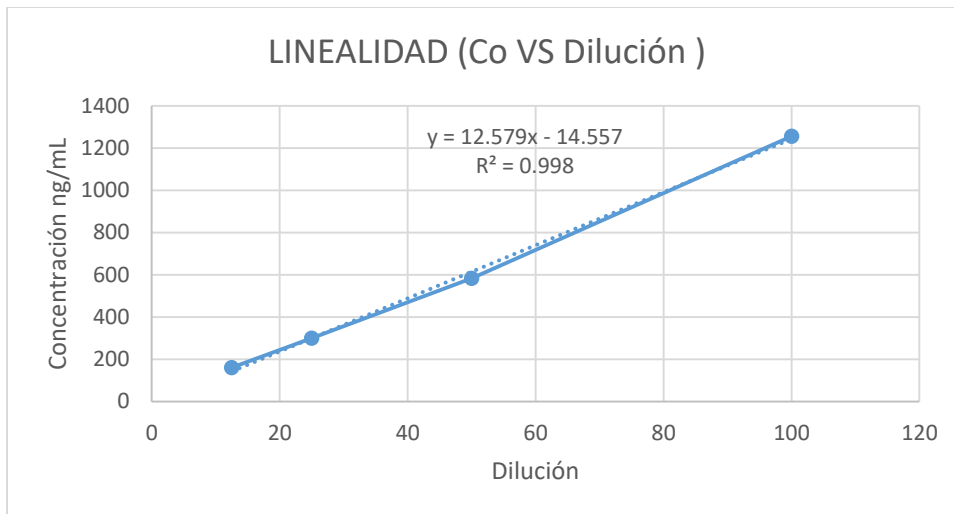
Tabla 12 Absorbancias y Concentraciones obtenidas de las diluciones realizadas

Se determinan los valores teóricos para cada dilución

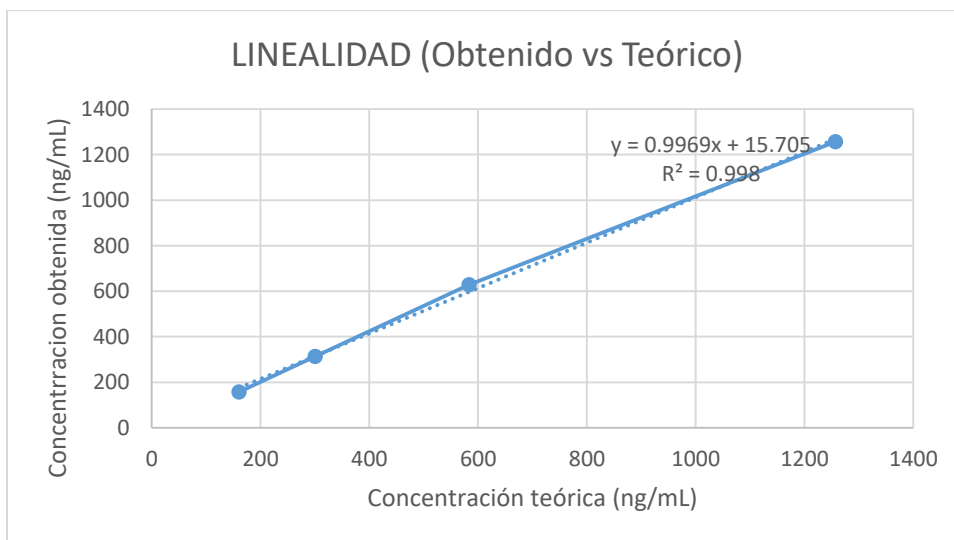
DILUCIÓN	Media Co Obtenida (ng/mL)	Co Teórica (ng/mL)
100	1256.593	1256.593
50	583.401	628.297
25	300.174	314.148
12.5	160.173	157.074

Tabla 13 Valores teóricos y valores obtenidos de las diluciones realizadas

Se realizaron las siguientes graficas: a) concentraciones obtenidas contra las diluciones correspondientes y b) concentraciones obtenidas contra las concentraciones teóricas; a partir de estas graficas se calcula la ecuación de la línea recta y el coeficiente de determinación.



Grafica 7. a) Concentración obtenida vs dilución correspondiente



Grafica 8. b) Concentración obtenida vs Concentración teórica

Respecto a el coeficiente de determinación, de acuerdo a la bibliografía y al criterio del fabricante, en ambos casos los resultados son satisfactorios, ya que en ambas graficas el valor del coeficiente de determinación es de $r^2 = 0.998$.

Adicional a lo anterior, se calcula el sesgo, el porcentaje de error y el porcentaje de recobro, este último dato el fabricante lo marca como criterio de aceptabilidad para la linealidad.

DILUCIÓN	Co Teórica (ng/mL)	Media Co Obtenida (ng/mL)	sesgo	% de error	% recobro
100	1256.593	1256.593	0.00	0.00	100
50	628.297	583.401	44.90	7.15	93
25	314.148	300.174	13.97	4.45	96
12.5	157.074	160.173	3.10	1.97	102

Tabla 14 Valores de % de error y % de recobro para cada dilución

8.2.3.2 REPETIBILIDAD

Para la prueba de repetibilidad, se realizaron tres experimentos independientes de cinco muestras bajo las mismas condiciones de medición, estas fueron realizadas el mismo día, con el mismo procedimiento, analista, ubicación e instrumentos.

Para este parámetro, el criterio dictado por el fabricante es el siguiente:

- Coeficiente de variación no mayor de 7.7 %

Los resultados obtenidos del ensayo se presentan en la siguiente tabla:

N°Muestra	REPLICA 1 (Co ng/mL)	REPLICA 2 (Co ng/mL)2	REPLICA 3 (Co ng/mL)3	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
1	104.2977099	106.49	109.16	106.65	2.44	2.29
2	42.89821883	44.07	41.38	42.78	1.35	3.15
3	19.2086514	18.82	20.02	19.35	0.61	3.16
4	14.83206107	12.98	13.45	13.75	0.96	7.00
5	12.49109415	12.00	13.21	12.57	0.61	4.86

Tabla 15 Resultados de Repetibilidad

Para cada muestra, se determinó la concentración media obtenida de los tres ensayos y la desviación estándar. Con estos datos se calculó el coeficiente de variación, elemento con el que se evalúa la repetibilidad.

El coeficiente de variación obtenido entre los tres ensayos para cada muestra, se encuentra en un rango de 2.29 % - 4.86 %.

8.2.3.3 REPRODUCIBILIDAD

La reproducibilidad fue evaluada con 3 ensayos independientes de diez muestras de suero con distintos niveles de concentración, en condiciones diferentes. La condición variable en cada caso es el tiempo y el instrumental, ya que se realizaron en días diferentes utilizando material distinto.

Para este parámetro, el criterio a evaluar según el fabricante es el siguiente:

- Coeficiente de Variación: no mayor a 4.1 %

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

N°Muestra	Condición 1 (Co ng/mL)	Condición 2 (Co ng/mL)	Condición 3 (Co ng/mL)	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
1	634.43	625.17	616.57	625.39	5.03	0.80
2	363.97	393.47	375.11	377.52	9.98	2.64
3	345.60	326.10	335.98	335.89	5.68	1.69
4	449.11	470.35	459.00	459.49	6.42	1.40
5	494.04	514.54	485.00	497.86	14.81	2.97
6	563.22	584.22	543.13	563.52	20.54	3.65
7	379.11	364.57	348.46	364.05	9.15	2.51
8	519.61	568.10	549.91	545.87	11.84	2.17
9	355.90	327.39	353.72	345.67	13.49	3.90
10	341.82	315.32	336.21	331.11	10.89	3.29

Tabla 16 Resultados de Reproducibilidad

El coeficiente de variación más alto que se obtuvo fue para la muestra 9, con valor de 3.90 %, valor que se encuentra debajo del marcado por el fabricante.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El sVCAM-1 humana ELISA y sICAM-1 humana ELISA son inmunoensayos enzimáticos para la detección cuantitativa de sVCAM-1 y sICAM-1 humano respectivamente, y son métodos de diagnóstico in vitro. Con base en lo anterior, el uso propuesto de estos procedimientos es la cuantificación de estas moléculas para diagnóstico clínico.

En los laboratorios clínicos la mayor parte de los ensayos se realizan con procedimientos comerciales previamente validados por el fabricante, sin embargo, estos deben ser verificados por el usuario. La ISO 15189 Sistemas de gestión de calidad en laboratorios clínicos menciona que “los procedimientos de examen usados sin modificaciones deben estar sujetos a una verificación independiente antes de ser usados como métodos de rutina”. Por esta razón, para sVCAM-1 humana ELISA y sICAM-1 humana ELISA, debe realizarse una validación para demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso propuesto.

El laboratorio tiene que decidir cuáles son las características o parámetros de desempeño deben ser evaluadas para validar el método, y hacer lo mejor posible teniendo en cuenta las limitaciones impuestas, las experiencias y herramientas disponibles (Guía Eurachem, 2016).

Debido a que no se encontraron trabajos donde se valide la técnica ELISA para la cuantificación de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, se tomaron en cuenta trabajos donde se validaba la técnica ELISA para realizar diversas determinaciones, por ejemplo; en el artículo “Validación de un ensayo tipo ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de Haemophilus influenzae tipo b” realizado por la Lic. Gilda Toraño Peraza, y el Lic. Ibis Hernández Vadell, se considera un suero de referencia para preparar la curva estándar, sueros control, y sueros problema obtenidos de pacientes, el texto menciona “como el ELISA a validar pertenece a la categoría en la que se incluyen los métodos que evalúan las características de las formas farmacéuticas, se diseñó un protocolo de validación en el que se propuso el estudio de los parámetros analíticos siguientes: límite de detección, precisión, exactitud y

linealidad”. En el artículo publicado por Rodriguez-Pelier “Validación de inmunoensayo tipo ELISA para la cuantificación de los niveles séricos de antígeno de superficie en pacientes con infección crónica por virus de la hepatitis B” los parámetros que se analizaron fueron: precisión, exactitud, linealidad, especificidad, límite de cuantificación y límite de detección.

La guía Eurachem *La adecuación al uso de los métodos analíticos* proporciona información general sobre las características de desempeño evaluadas durante una validación, entre las que se encuentran selectividad, Límite de detección y límite de cuantificación, intervalo de trabajo, sensibilidad analítica, sesgo, repetibilidad, precisión, reproducibilidad, y robustez.

Para ambas moléculas, los parámetros considerados dentro de la validación del método analítico son: linealidad, repetibilidad y reproducibilidad, dentro de la prueba de linealidad, también se determina el porcentaje de recuperación o recobro con el cual se evalúa la exactitud; y con los análisis de repetibilidad y reproducibilidad se evalúa la precisión. Estos parámetros son una constante en diversos estudios donde se utiliza la técnica Elisa y en guías para validación de método nacionales e internacionales.

El CENAM en su *Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empelados por el laboratorio clínico*, y el Colegio nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos en: *Métodos analíticos: guía de validación*, marcan una referencia sobre la interpretación de los datos obtenidos en el análisis de cada parámetro, por lo que se toman como referencia principal, además de los datos marcados por el fabricante, que se mencionan anteriormente.

Durante la validación se utilizaron las siguientes herramientas:

- Blancos: Muestras sometidas al mismo proceso que las muestras que contienen suero, utilizando buffer de ensayo en lugar de suero, con el fin de evaluar cuanta señal obtenida se atribuye al analito, en este caso sVCAM-1 y sICAM-1 respectivamente.
- Muestras se rutina: durante el proceso se utilizaron muestra de pacientes, las cuales nos son de utilidad al proporcionar información sobre precisión, e

interferencias, que pueden aparecer durante el trabajo diario cuando el método es de rutina.

- Patrones de medida: Se utilizó un estándar sVCAM-1 humana liofilizada y sICAM-1 humana liofilizada, con concentraciones conocidas.

Los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros para cada ensayo, indican lo siguiente:

9.1 VCAM-1

Linealidad: Tomando los valores del coeficiente de determinación $r^2 = 0.999$, obtenidos, se puede decir, que el método sigue una función lineal concentración-absorbancia, además, el porcentaje de recuperación obtenido por cada dilución se encuentra entre 93% y 104%, este porcentaje se encuentra dentro del rango descrito por el fabricante, por lo que se cumple con el criterio establecido.

Dado los resultados mostrados, para la prueba de linealidad dentro del intervalo medido, el cual es nuestro intervalo validado: 193. ng /mL a 1550.808 ng /mL, los resultados son directamente proporcionales a la concentración de VCAM-1 en las muestras de suero, por lo que la evaluación de la linealidad para el método es satisfactoria.

Repetibilidad: El coeficiente de variación obtenido entre los tres ensayos para cada muestra, se encuentra en un rango de 0.66 % - 2.73 %, estos valores que se encuentran por debajo de 5.2 %, criterio de aceptación indicado por el fabricante, por lo que la prueba de repetibilidad es satisfactoria para el método.

Reproducibilidad: El coeficiente de variación más alto que se obtuvo fue para la muestra 1, con valor de 2.27 %, valor que se encuentra debajo del marcado por el fabricante, que es 3.1 %. Dado lo anterior, la prueba de reproducibilidad es satisfactoria para el método.

9.2 ICAM-1

Linealidad: el coeficiente de determinación obtenido es de $r^2 = 0.998$, de acuerdo a la bibliografía, y al criterio del fabricante, el resultado es satisfactorio, por lo que el método sigue una función lineal concentración-absorbancia. También se calculó el porcentaje de recobro obtenido para cada dilución, y se obtuvieron valores entre 93% y 102 %, estos porcentajes se encuentran en dentro del rango descrito por el fabricante, por lo que se cumple con el criterio establecido.

Dado los resultados anteriores, para la prueba de linealidad dentro del intervalo medido, el cual es nuestro intervalo validado: 160.173 ng /mL a 1256.808 ng /mL. Por lo tanto, podemos decir que los resultados obtenidos son directamente proporcionales a la concentración de ICAM-1 en las muestras de suero, por lo que la evaluación de la linealidad para el método es satisfactoria.

Repetibilidad: El coeficiente de variación obtenido entre los tres ensayos para cada muestra, se encuentra en un rango de 2.29 % - 4.86 %, estos valores se encuentran por debajo de 7.7 %, valor que determina el criterio de aceptación, por lo que la prueba de repetibilidad es satisfactoria para el método.

Reproducibilidad: El coeficiente de variación se encuentra entre 0.80% y 3.90 %, valores que se encuentran debajo del marcado por el fabricante, que es 4.1 %. Dado lo anterior, la prueba de Reproducibilidad es satisfactoria para el método

Para ambos casos, podemos afirmar lo siguiente:

Dentro del intervalo de trabajo validado, queda demostrado que el método es exacto, preciso y lineal. La precisión fue definida por las pruebas de Repetibilidad y Reproducibilidad, la exactitud con el porcentaje de recuperación y la linealidad demuestra que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración de analito presente en las muestras.

10. CONCLUSIONES

- Se realizaron curvas de calibración para cada una de las moléculas, cuyo coeficiente de determinación fue de $r^2= 0.978$ para VCAM-1 y de $r^2= 0.975$ para ICAM-1. Si bien el criterio de aceptación para el coeficiente de determinación es $r^2 >0.98$, ya que cuanto más cerca de 1 se encuentre este valor, mayor será el ajuste del modelo a la variable que estamos intentando explicar, se utilizaron estos datos ya que son valores cercanos a 0.98 y aun proporcionan una relación entre la absorbancia y la concentración del analito. Es decir que para la determinación de ICAM-1 y VCAM-1 en el 97 % de los casos la concentración medida en la muestra es directamente proporcional a la absorbancia medida en la misma.
- Respecto a los datos obtenidos en la medición aleatoria de muestras de pacientes, tanto para ICAM-1 como para VCAM-1 el valor promedio de las muestras medidas oscila alrededor de 600 ng / mL encontrándose dentro de los valores normales de ambas moléculas.
- Los parámetros considerados para la validación del método en cada caso son: Linealidad, Repetibilidad y Reproducibilidad. Tanto para VCAM-1 y ICAM-1 los tres parámetros cumplen satisfactoriamente con el criterio establecido por el fabricante.
 - El rango de concentraciones en que los resultados de una medición son directamente proporcionales a la concentración del analito son: 1) para VCAM-1 es 193. ng /mL a 1550.808 ng /mL, 2) para ICAM-1 es 160.173 ng /mL a 1256.808 ng /mL. Dentro de estos intervalos el método es lineal
 - Con las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad medimos el grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas de un mismo mesurando realizadas en las mismas (repetibilidad) o diferentes (reproducibilidad) condiciones de medición, por lo que al resultar estas pruebas satisfactorias podemos afirmar que el método es preciso ya que

existe un grado de concordancia adecuado entre los valores obtenidos en las series de ensayos medidos.

- Otro dato obtenido es el porcentaje de recuperación o recobro, al cumplir con el criterio establecido, podemos afirmar que el método es exacto, ya que la exactitud nos indica el grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor esperado.

- Con base a los resultados obtenidos respecto a linealidad, precisión y exactitud, la técnica de Elisa Sándwich es adecuada para determinación cuantitativa de niveles séricos de ICAM-1 y VCAM-1.

- La validación del método nos demuestra que el método es adecuado para el uso previsto y que es lo suficientemente fiable para que cualquier decisión basada en el pueda ser tomada con confianza.

11. BIBLIOGRAFÍA

Pawlina, Wojciech, (2015). Ross: Histología Texto y Atlas. Correlación con biología molecular y celular. España: Lippincott Williams páginas 105 -120.

Welsch Ulrich, (2008). Sobotta Histología, 3ª Edición, Editorial Médica Panamericana páginas 86-106.

Saavedra, Julio. (2016). Texto Atlas Histología Biología Celular y Tisular, Mc Graw Hill.

Rojas M. Williams, (2015). Inmunología, España: CIB páginas 28-35, 256-265.

Badimon Lina, Martínez-González José, (2001). Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. Rev. esp cardiología 2002; 55 (supl 1):17-26 - vol. 55 núm.supl.1

González, López Larrea, et-al, (2010). Inmunología, biología y patología del sistema inmunitario. España: Médica Panamericana, páginas 145-154.

Roa, Villaseca, Araya et-al, (2001). Moléculas de adhesión celular y cáncer, Rev. Chilena de cirugía, Vol. 53, Pág. 504-510.

Owen A, Judith, (2007). Kuby Inmunología. Mc Graw Hill, páginas 145-165.

Biovendor, Human sICAM-1 ELISA, Biovendora Research and Diagnostic Products

Biovendor, Human sVCAM-1 ELISA, Biovendora Research and Diagnostic Products

IBL, sVCAM-1 ELISA, Ensayo Inmunoenzimático para la determinación cuantitativa de VCAM-1 soluble en suero, plasma humano y sobrenadante de cultivo celular. IBL internacional.

IBL, sICAM-1 ELISA, Ensayo Inmunoenzimático para la determinación cuantitativa de ICAM-1 soluble en suero, plasma humano y sobrenadante de cultivo celular. IBL internacional.

Intercellular Adhesion Molecule 1, Phosphosite plus. Recuperado de: <https://www.phosphosite.org/proteinaction?id=4048&showallsites=true>

Vascular Cell Adhesion Protein 1, Phosphosite plus. Recuperado de: <https://www.phosphosite.org/proteinaction.action?id=12640&showallsites=true>

Guzmán-Vázquez (2004), las pruebas de Elisa, gaceta médica Méx Vol. 140, suplemento no. 3

Rojas-Espinosa, Oscar, (2017). Inmunología de memoria, 4ª edición, Ciudad de México: Editorial Médica Panamericana, páginas 157-171.

ThermoFisher Scientific, What's is Elisa? Recuperado de: <https://www.thermoFisher.com/uk/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>

García, Soberón et-al, (2002). Métodos Analíticos: Guía de validación. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. A.C.

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 1998. Protocolo de validación para determinaciones en muestras biológicas (sangre y orina) de interés en higiene industrial. Recuperado de:

http://www.insht.es/inshtweb/contenidos/documentacion/fichastecnicas/metodos analisis/ficheros/pv/pv_iii298.pdf

CENAM, 2008. Guía para la Validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico.

Skoog, Douglas, 2009. Principios de Análisis instrumental, México: Cengage Learning, páginas 11-17.

Dosal-Villanueva, 2008. Introducción a la metrología química: Curvas de Calibración en los métodos analíticos. Recuperado de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/curvasdecalibracion_23498.pdf

EuroLab España. P.P. Morillas y colaboradores, 2016. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos-una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados.

Stephanie D. Gan, 2013. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked immunosorbent Assay. *Journal of investigative Dermatology*, volumen 133, pág 1.