

Centro Nacional de Biopreparados.

Automatización del procesamiento de los datos de ferritina en suero humano por técnica inmunoenzimática (ELISA).

Autores: Maritza González Pérez ¹, Reyán Valdés Oramas², Orestes Mayo Abad ³, Raúl González Hernández⁴.

1-Licenciada en Microbiología y Tecnólogo de Nivel II.
Centro Nacional de Biopreparados
Dirección de Investigaciones. Sección de Reconstituyentes
Carretera Beltrán Km 1 y ½. Bejucal. Provincia La Habana
Correo electrónico: maritzaglez@biocen.cu
Teléfono: 047 68 22 01

2-Licenciado en Cibernética Matemática
Centro Nacional de Biopreparados
Dirección de Ingeniería Principal
Carretera Beltrán Km 1 y ½. Bejucal. Provincia La Habana

3-Doctor en Ciencias.
Centro Nacional de Biopreparados
Departamento de Desarrollo
Carretera Beltrán Km 1 y ½. Bejucal. Provincia La Habana

4-Doctor en Ciencias
Centro Nacional de Biopreparados
Dirección de Investigaciones. Sección de Reconstituyentes
Carretera Beltrán Km 1 y ½. Bejucal. Provincia La Habana
Correo electrónico: raulg@biocen.cu *

Resumen:

La determinación de Ferritina en el suero humano, juega un papel importante en el conocimiento del estado de las reservas de hierro que tiene el organismo, por lo tanto, la medida de sus niveles representa un método simple y no invasivo para evaluar las reservas de hierro.

Nuestro laboratorio emplea la ferritina como un indicador de recuperación clínica en los grupos poblacionales de mayor riesgo para la evaluación de la utilización del Trofin en diferentes formas de presentación. Para realizar estas determinaciones utilizamos Juegos Diagnósticos por ELISA, los cuales tienen grandes ventajas en cuanto a las cantidades de muestras a utilizar así como el número de determinaciones que se pueden obtener por placa; sin embargo el cálculo final y el graficado se plantea de forma manual por lo que nos dimos a la tarea de crear un Libro de Cálculo en Microsoft Excel 97 que haga estas actividades de forma automatizada, con ahorro de tiempo y mejora de la exactitud de los resultados.

Palabras clave- Ferritina, automatización, Kit Radim

Abstract:

Ferritine determination in human blood plays an important role in the knowledge of the iron reserves condition; therefore its level's measurement is a simple and non invasive method to evaluate iron reserves.

Our laboratory utilizes Ferritine as an indicator of clinical recovery during Trofin evaluation in different forms of presentation of population groups at higher risk. To meet this end we utilize ELISA diagnostic kits, which have great advantages regarding the amount of samples to use as well as the number of determinations to be done by plate. However, the final calculations and graphic representation of the results was done manually, and that is why we created a Calculations Sheet in Microsoft Excel 97, to perform this automatically, saving time and money and improving the accuracy of the results

Key Words: Ferritine, Automation, Kit Radim

Introducción:

Los Juegos Diagnósticos (por la técnica inmunoenzimática ELISA) constituyen en la actualidad, un medio de trabajo importante para que la obtención de resultados, pruebas y mediciones para las cuales han sido diseñados, lleguen a nuestras manos con la premura y la precisión que se requiere.

En nuestro caso, la determinación de la Ferritina, la cual es un parámetro importante del suero humano y que está directamente relacionada con las reservas de hierro que tiene el organismo (1), es utilizada en nuestro laboratorio. Se miden, además, otros parámetros de la sangre, para la obtención de los resultados de los ensayos clínicos que se realizan en diversos grupos poblacionales como son las embarazadas y los niños de Círculos Infantiles; en los cuales son evaluadas diversas formulaciones del Trofin (2), reconstituyente y antianémico de origen natural para determinar el efecto del mismo en personas con deficiencia de hierro y que están siendo tratadas con dicho producto.

Los Juegos Diagnósticos utilizados se basan en una técnica de ELISA ,en este caso el Kit – Radim de origen Italiano (3), que posee grandes ventajas en su utilización, ya que el volumen de muestra a utilizar es de 20µL y tiene pocos requerimientos de incubación y agitación, así como ofrece la posibilidad de poner hasta 42 muestras por duplicado de una sola vez. No obstante, para nuestra trabajo presenta una desventaja y es el cálculo y graficado manual y el vaciamiento de los datos de esta forma lo que deriva en una pérdida de tiempo en el cálculo de los resultados así como la inexactitud de los mismos sobre todo para valores cercanos al límite inferior de los valores normales reportados para la Ferritina.

En base a estos inconvenientes nos trazamos como objetivo la creación de un Libro de Cálculo en Microsoft Excel 97 (Anexo-1) que cumpliera con estas exigencias para hacer más rápido el trabajo

Características del Kit

Se basa en un ensayo inmunoenzimático (ELISA) .Se utilizan dos anticuerpos monoclonales (Mab) diferentes, uno adsorbido en la placa y el otro conjugado con peroxidasa. Durante la primera incubación la ferritina presente tanto en el patrón como en las muestras se une a ambos monoclonales de una vez formando un emparedado.

A continuación el material sobrante se elimina mediante un ciclo de lavados. La actividad de la enzima residual encontrada en los pozos será directamente proporcional a la concentración de ferritina en los patrones y en las muestras .Todo esto se evidencia mediante la incubación de la fase sólida con una solución cromógena (Tetrametilbenzidina) en buffer sustrato. La lectura colorimétrica será realizada en Espectrofotómetro a 450 nm para muestras de 0 a 250 ng/mL y a 405 nm para valores superiores (3).

Materiales y Métodos

Material biológico:

-Sueros de pacientes tratados con Trofin.

Materiales:

- Pipetas Eppendorf de 10-100 μ L
- Pipetas Eppendorf de 100-1000 μ L
- Puntas azules de 100 μ L.
- Puntas azules de 1000 μ L.
- Kit Elisa para la determinación de Ferritina .Kit -RADIM. Italia.
- Agua destilada.

Equipos:

- Zaranda para placas de Elisa.
- Lector de Elisa con filtros de 405 y 450nm.

Método:

Para comparar los resultados obtenidos por ambos métodos se realizaron 7 técnicas de ELISA con el Kit-Radim. Se hicieron los cálculos por el método manual y el automatizado a 216 sueros de mujeres embarazadas y a 18 sueros de niños en Círculos Infantiles.

Se realizó la determinación de Ferritina a un total de 234 sueros, según las indicaciones del Juego Diagnóstico.

Los sueros se dividieron, en la mayoría de los casos, en grupos de 42 de acuerdo a la capacidad de la placa utilizada.

En cada placa se montó la curva patrón correspondiente y se hizo la lectura en el lector de placas según las indicaciones del fabricante.

Cada grupo de sueros se montó en días diferentes y el vaciamiento de datos manual se hizo en papel milimetrado como lo indica el manual. En paralelo se hizo la misma tarea pero colocando los datos en el programa automatizado.

Se creó un Libro de Cálculo Microsoft Excel 97 con dos hojas de cálculo, una para 450 nm y otra para 405 nm. En ambas se realizó el mismo tipo de cálculo y de gráfico. Se introdujeron los datos de la curva patrón, los cuales se graficaron y sirvieron como base para la fórmula de interpolación por rectas, o sea, para determinar la concentración de ferritina dada la absorbancia en cada una de las muestras. Dicha fórmula fue creada según ecuaciones matemáticas de geometría en el plano donde se busca la ecuación de una recta dado dos puntos y la intercepción en el eje X correspondiente a la concentración dada su ordenada en el eje Y correspondiente a la absorbancia.

Resultados y Discusión

En la Tabla-I se exponen los resultados obtenidos del vaciamiento de datos de la curva de calibración sobre papel milimetrado y los obtenidos mediante el método automatizado. Con los valores de ferritina se crearon cinco grupos aproximadamente iguales, para poderlos agrupar de manera que se pudieran analizar adecuadamente los resultados y dos grupos uno menor o igual a 10ng/mL (correspondiente al límite inferior permitido para la Ferritina) y otro mayor o igual a 251ng/mL ya que por debajo de este valor es que se encuentran la mayoría de los valores analizados (Tabla-II).

Se puede observar que los valores de Ferritina menores o iguales a 10ng/mL que corresponden al límite inferior normal de ferritina para mujeres. De manera manual no se pueden determinar sus valores porque la curva tiene una pendiente muy grande, lo que hace que estén tan unidos en este intervalo que no se pueden establecer los mismos. Esto no ocurre en el método automatizado donde se obtienen éstos y todos los valores con una exactitud de hasta dos equivalencias después del punto decimal

Se puede observar también la fluctuación que existe entre los datos de un mismo intervalo con ambos métodos, en el caso de los intervalos mayores de 10 ng /mL, la mayoría de los valores para ambos sistemas quedan bastante próximos, pero sucede que algunos de ellos están cercanos a los límites de los intervalos, quedando unos valores en un intervalo y otros en el intervalo siguiente (Tabla-II), lo que no tiene mayor importancia en la práctica ya que todos se encuentran dentro de los valores normales reportados en la literatura para mujeres y que está entre (10-120 ng/mL) para mujeres premenopáusicas y entre(10 –180 ng/mL) para mujeres menopáusicas. No existen reportes para niños ni embarazadas por lo que utilizamos estos valores como referencia.

Para el caso de los valores próximos a 10 sucede algo similar con el intervalo pero esto cobra importancia, ya que los casos en que se encuentren menores o iguales a 10 ng/mL, están por debajo del límite normal de Ferritina permisible, por lo que este resultado define la toma de acciones sobre los pacientes para resolver esta deficiencia de hierro.

Por otra parte se observan un pequeño grupo de pacientes que tienen valores por encima de 180ng/mL, lo que es reportado, comúnmente para hombres, con valores de hasta 430ng/mL lo que no significa que alguna mujer pudiese alcanzar estos valores, además de que no tenemos reportes de estos valores para mujeres embarazadas en Cuba.

También se puede observar que según los resultados del Método manual se obtuvieron valores iguales o menores de 10 para 40 sueros, mientras que por el automatizado se reportan sólo 25; lo que significa que un 23 % sería dado por debajo del límite normal para ferritina lo que resultaría en resultados falsos positivos, hecho que es subsanado gracias a la exactitud que nos proporciona el método automatizado.

Dados los resultados obtenidos entonces sería factible la aplicación de tratamiento con Trofin a razón de tres dosis diarias para los casos que tengan menor o igual a 10 su valor de Ferritina, aplicándosele profilaxis a razón de 2 dosis diarias.

En los casos donde éste parámetro sea bajo y no llegue a 10, seguiremos siempre la prescripción facultativa donde se hará un análisis caso a caso.

Análisis estadístico de los resultados

Los valores de los 7 grupos de los Ensayos de (ELISA) se procesaron de acuerdo al procedimiento de muestras pareadas. Para ello se ha utilizado el programa de procesamiento estadístico Statgraphics versión 5.1 con el que se calcula el estadígrafo *t de Student* de la prueba para las diferencias entre los dos métodos de cálculo: manual y automatizado. Estas diferencias se compararon primero contra el valor cero. Es decir, que la hipótesis nula establece que no hay diferencia entre los dos métodos de cálculo y como hipótesis alternativa, que sí existe una diferencia entre los 7 grupos. En cuatro de ellos no hay diferencias estadísticamente significativas.

Como quiera que, dadas las características del método analítico, se puede esperar que dos resultados difieran hasta 15 unidades debido a la inexactitud del método manual, se decidió establecer como hipótesis nula valores de hasta 15 para ésta diferencia y para la hipótesis alternativa, que la diferencia entre los métodos de cálculo Automatizado y Manual es mayor de 15. Entonces no se obtuvo ningún grupo cuyos resultados tuvieran diferencias significativas.

Esta última consideración afecta los valores cercanos al límite inferior establecido lo cual se deja a criterio del terapeuta quien tomará la decisión en la aplicación de tratamiento o profilaxis de acuerdo a cada caso en los pacientes que estén cercanos a estos valores.

Conclusiones

- 1.-Se desarrolló un sistema automatizado de determinación de los valores de ferritina en suero a través del procesamiento de los datos obtenidos por el sistema inmunoenzimático (ELISA) del Kit-Radim.
- 2.-El sistema desarrollado permite un procesamiento más rápido y con mayor exactitud.
- 3.-La exactitud del método puede contribuir a que las medidas terapéuticas o profilácticas sean tomadas con más racionalidad.

Bibliografía:

1. Cook,J.D.; Skikne,BS. Serum ferritin:a possible mode for the assessment of nutrient stores. Ann J.Clin,1982.
2. Aznar E; González R. Informe final del Proyecto de obtención de medicamentos antianémicos y reconstituyentes de origen natural.Biocen La Habana .Cuba.2001:77-78.
3. RADIM SpA. "Manual para el uso del Kit RADIM para la determinación de Ferritina en suero humano", Italia 2003.

Tabla -I

Suero #	Automatizado (conc) ng/mL	Manual (conc) ng/mL
23	33.12	50
24	50.12	50
28	122.76	95
29	221.64	270
20	51.74	45
32	25.11	45
34	120.15	80
36	68.16	60
39	91.29	100
40	23.76	15
42	219.03	175
43	0.11	<10
48	61.57	55
49	54.48	50
50	110.45	90
51	58.71	50
52	166.29	140
53	27.97	25
54	59.45	55
58	43.00	40
59	45.70	40
60	86.19	75
63	59.58	50
65	122.01	120
16	52.49	50

Tabla-II-Comparación de los resultados obtenidos por el método manual y por el método automatizado.

Intervalos	Método Manual							Método automatizado							Tot M	Tot A	Dif.	%
	E-1	E-2	E-3	E-4	E-5	E-6	E-7	E-1	E-2	E-3	E-4	E-5	E-6	E-7	----	----	----	----
Ω10	1	10	6	11	7	2	3	1	4	2	8	4	3	3	40	25	15	23
11-65	15	20	26	10	20	24	3	14	26	30	17	24	22	3	118	136	18	7.08
66-110	5	9	4	8	10	6	2	4	8	5	7	7	6	2	44	39	5	6.02
111-155	2	1	2	2	1	4	1	3	2	4	3	2	5	1	13	20	7	21.2
156-200	1	1	1	3	0	0	1	1	1	0	3	0	0	1	7	6	1	7.69
201-250	0	0	0	1	2	2	0	2	0	0	1	2	2	0	5	7	2	16.6
Δ251	1	0	2	1	1	1	1	0	0	2	1	1	1	1	7	6	1	7.69

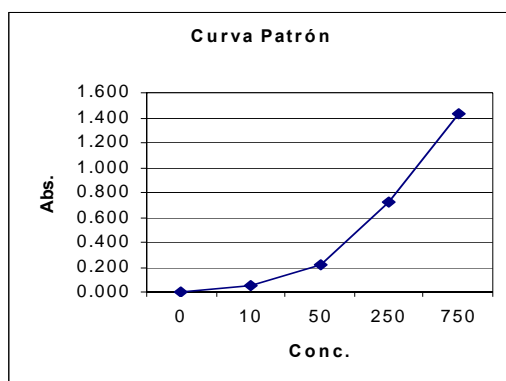
E: Elisa

M: Método manual

A: Método automatizado

Dif: diferencia

Anexo -1 -Hoja de cálculo



HOJA DE CÁLCULO ELISA: KIT-RADIM ($\lambda=405$)					
Producto:	Sueros				
Procedencia:	Policlínico E, Berovides				
Fecha:	Noviembre- 2004				
Curva Patrón					
Conc.	Abs. 1	Abs. 2	Prom. Abs.	Pendientes	
0	0.002	0.002	0.002	0.00525	
10	0.041	0.068	0.055	0.0042375	
50	0.221	0.227	0.224	0.00248	
250	0.736	0.704	0.720	0.001415	
750	1.508	1.347	1.428	0.001903333	
Datos de la Muestra					
No	Abs 1	Abs 2	Prom Abs	Conc.	
182	0.079	0.074	0.0765	15.19	
203	0.176	0.166	0.171	37.49	
205	0.098	0.098	0.098	20.27	