

Fernández, Alberto;González, Freddy;Castillo, Jimmy;Vitta, Yosmery;Briceño, Andreina
Aplicaciones De Un Analizador Colorimétrico De Placas De ELISA Basado En
Detección Con Webcam A La Determinación De Glucosa En Plasma Sanguíneo
Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, Vol. 7, Núm. 1, 2009, pp. 1-7
Universidad de Pamplona
Colombia

Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=90312171007>



*Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias
Básicas*

ISSN (Versión impresa): 0120-4211

revistabistua@unipamplona.edu.co

Universidad de Pamplona

Colombia

Aplicaciones De Un Analizador Colorimétrico De Placas De ELISA Basado En Detección Con Webcam A La Determinación De Glucosa En Plasma Sanguíneo

Alberto Fernández^a, Freddy González^b, Jimmy Castillo^a, Yosmery Vitta^a, Andreina Briceño^a.

^a Laboratorio de Espectroscopia Láser, Escuela de Química Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Paseo Los Ilustres, Urb. Valle Abajo. Apartado Postal 20513. Caracas 1020-A, Venezuela. ^b Sección de Bioquímica médica, Instituto de Medicina Experimental, Universidad Central de Venezuela, Apartado Postal 50587, Caracas, Venezuela.

RESUMEN

La mayoría de los análisis clínicos que se realizan en la actualidad se basan en ensayos colorimétricos, donde las propiedades ópticas de la sustancia de interés es modificada para que exhiba una coloración determinada y la misma es detectada empleando desde sistemas tan sencillos como fotolorímetros hasta espectrómetros altamente sofisticados. En muchos casos la cantidad de muestras es tan extenso que se han desarrollado sistemas como los lectores de placas de ELISA que permiten medir simultáneamente hasta 96 muestras. Esos lectores tienen una alta sensibilidad, formalmente el análisis no se realiza simultáneamente ya que se emplean sistemas mecánicos para desplazar la muestra y leer los 96 pozos uno a uno o en el mejor de los casos en grupos de 8. En el presente trabajo se muestra la aplicación de un lector de placas de ELISA que emplea leds superluminosos como fuente de iluminación y una webcam como detector que permite determinar la concentración de soluciones coloreadas en los 96 pozos de la placa de ELISA simultáneamente. Se diseñó un software que permite tomar imágenes de la placa de ELISA, digitalizarla, separarla en sus componentes RGB e intensidad. De esta manera se transforman las imágenes en superficies de respuesta de intensidades para cada color al que responde los filtros de la cámara, permitiendo de esta forma al compararlo con una referencia, calcular la absorbancia de un punto en particular de la imagen y así mediante una curva de calibración obtener la concentración de una determinada sustancia en ese punto. El sistema diseñado se empleó para medir concentraciones de Glucosa, cuyos valores oscilaron entre 700 y 1050 mg L⁻¹ en sangre de ratas.

ABSTRACT

Most of the clinical test in the actuality is based in fotocolorimetric assays where optical properties of target molecules are modified to show a determinate coloration. These modified molecules can be detected with simple systems as a photolorimeter or more complex like spectrometers. Due to the high quantity of samples different kind of readout systems have been developed. The ELISA plate reader permit to read 96 samples, this equipments have a great sensitivity and the rate of lecture depends basically of the quality of the mechanical system. In this work we present the application of a build ELISA plate reader based in a superluminous led and webcam used as detector. The system permits to determinate simultaneously 96 samples. Using a software designed to acquire the image of the 96 well plate, digitizer and split in the RGB and intensity matrix in order that using a reference transform the image in absorbance data and with the adequate calibration curve in concentration. The system was employed in the determination of glucose, phosphate and proteins in blood. Our results present a excellent precision, CV=3%, and are in the range of the 700 y 1050 mg L⁻¹.

1. INTRODUCCIÓN

La química clínica está enfocada en la realización de exámenes de rutina para la cuantificación de especies de interés en fluidos biológicos, determinación de reserva electrolítica y bióxido de carbono en la sangreⁱ. Existen muchos exámenes diferentes para analizar casi todos los tipos de componentes químicos presentes en la sangre o en la orina. Los componentes pueden incluir la glucosa, los electrolitos, las enzimas, las hormonas, los lípidos (grasas), las proteínas y otras sustancias metabólicas. Para la determinación de estos componentes se utilizan ciertos procesos químicos, tales como reacciones colorimétricas, en la cual la sustancia de interés presente en la muestra biológica reacciona con sustancias específicas produciendo especies coloreadasⁱⁱ. La dependencia entre la concentración y la magnitud del color de dichas especies se relacionan mediante la ley de Lambert-Beerⁱⁱⁱ, esta permite cuantificar la sustancia en estudio

mediante métodos espectroscópicos. Para esto suelen utilizarse de forma convencional, ciertos equipos de análisis clínico denominados lectores de absorbancia^{iv}, los cuales permiten procesar un elevado número de muestras en celdas que consisten de 96 micro -pozos y donde se llevan a cabo análisis de ensayos inmuno-enzimáticos (ELISA)ⁱ. La detección de radiación suele realizarse mediante fotómetros o espectrofotómetros. Estos lectores, permiten la mayor disponibilidad de equipos para análisis clínicos, no obstante estos son costosos, requieren de personal especializado y de ciertas condiciones ambientales específicas y en algunos casos largos tiempo de análisis. Esto ha inducido a que los mismos se encuentren disponibles en grandes laboratorios ubicados en zonas urbanas, centralizando los análisis clínicos a algunas regiones específicas. Esto limita la eficiencia de los análisis clínicos en países en vías de desarrollo o regiones de de baja actualización tecnológica, donde usualmente no se dispone de una infraestructura adecuada a nivel nacional, que suministre las condiciones idóneas para la realización de dichos análisis en toda la región.

El desarrollo actual de instrumentos médicos sencillos, que puedan ser utilizados por cualquier operador, en un momento y lugar determinado, ha permitido solventar parcialmente la deficiencia que pueda presentarse en la aplicación de ciertos análisis clínicos en ciertas regiones. Estos instrumentos permiten la medición en situ de componentes tales como glucosa, colesterol en sangre, etc, con una elevada rapidez y exactitud, haciendo posible establecer en tiempo record, diagnósticos efectivos de patologías asociadas a dichos componentes.

Por otro lado, recientemente diversos investigadores^{v-9} han explorado el uso de sistemas de cámaras digitales como sistemas de detección espectroscópicos en conjunto con fuentes de radiación no-convencionales tales como pantallas de computadoras, diodos de emisión de luz, con la finalidad de evaluar la aplicación de la fotografía digital y el procesamiento computarizado de imágenes en la construcción de nuevos diseños de espectrofotómetros. El uso de estas nuevas tecnologías ha sido aplicada en los lectores de absorbancia, obteniendo resultados satisfactorios en la cuantificación de ciertos compuestos químicos en muestras de suero sanguíneo¹⁰.

No obstante su aplicación en análisis clínicos no ha sido suficientemente explotada. Ya que estos dispositivos son de coste relativamente bajo, permiten analizar gran número de muestra simultáneamente y en corto tiempo, resulta de gran interés la validación de estos dispositivos en el área médica. Esto permitiría descentralizar la realización de los exámenes clínicos.

El presente trabajo tiene como objetivo principal evaluar un prototipo de lector de absorbancia, de placas ELISA, con sistema de detección de procesamiento de imágenes, utilizable en la determinación cuantitativa de glucosa en muestras de plasma sanguíneo de ratas. Específicamente se determinó la curva de tolerancia a la glucosa¹¹, la cual es un examen clínico que mide la capacidad del cuerpo para metabolizar la glucosa. Esta prueba sirve para diagnosticar diabetes tipo 2 y otros trastornos como Intolerancia a la Glucosa e hipoglucemia.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Equipos

2.1.1 Sistema Colorimétrico

Se utilizó un sistema colorimétrico fabricado en el laboratorio de espectroscopía láser de la escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela., cuyo montaje experimental se presenta en la figura 1. Este dispositivo utiliza como fuente de excitación una placa de diodos de emisión de luz s fluorescentes (LEDs) y una pantalla difusora, para iluminar homogéneamente una celda para análisis de ELISA, constituida por 96 micro -pozos, cada uno de los cuales es de 150µL de capacidad. El sistema de detección consiste en una cámara web (Mini Camp Pro GE 98067), con un detector CCD de 640x480 píxeles de resolución, que graba la imagen de la celda a 24 cuadros/seg. Se diseño un software¹² que permitirá tomar imágenes de la placa de ELISA, digitalizarla, separarla en sus componentes RGB e intensidad. De esta manera se transforma las imágenes en superficies de respuesta de intensidades para cada color al que responde los filtros de la cámara, permitiendo de esta forma al compararlo con una referencia, calcular la absorbancia de un punto en particular de la imagen y así mediante una curva de calibración obtener la concentración de una determinada sustancia en ese punto.

2.1.1 Sistema Convencional

Se utilizó un espectrómetro de Fibra Óptica Modelo USB2000, Ocean Optics. Este espectrómetro consta de un monocromador Czerny-Turner de 42 mm de distancia focal de entrada y 68 mm de salida; red de 300 líneas mm⁻¹, reforzado a 500 nm y rango espectral entre 300 y 1100nm. El detector consiste de un dispositivo de carga acoplado (CCD) de silicio, modelo Sony ILX511, de 2048 píxeles, rango espectral entre 200 y 1100nm, sensibilidad de 75 fotones/cuentas a 400nm y 41 fotones/cuentas a 600nm.

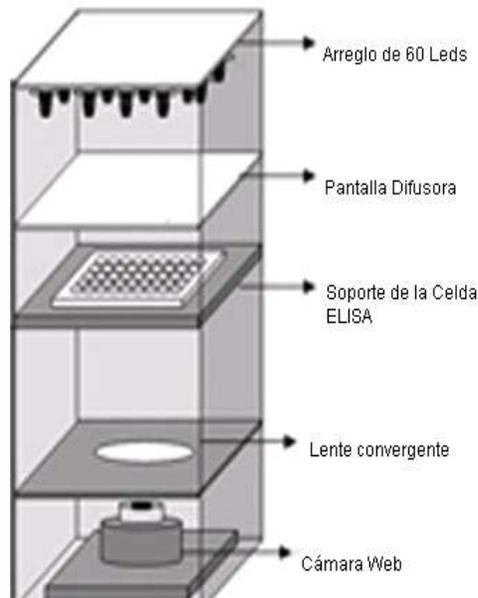


Figura 1. Esquema del diseño de un sistema colorimétrico para celdas ELISA

2.2 Reactivos:

Los reactivos: estándar de glucosa al 99% y un Kit para glucosa oxidasa fueron suministrados por la casa Merck. Todos los reactivos fueron de grado analítico.

2.3 Preparación de Muestra:

Las muestras de plasma sanguíneo, fueron obtenidas desde ratas de cepa Sprague–Dawley, suministradas por el laboratorio de Bioquímica Médica del Instituto de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela. Para ello, el animal de aproximadamente 200 ± 20 g, se dejó en ayuna por 24 horas y luego se sometió al siguiente tratamiento: inicialmente, se le inyectó anestesia de pentobarbital (30 mg/ Kg peso del cuerpo) y se tomó la primera muestra de sangre, que sirve como muestra de referencia. Luego mediante una sonda, se introduce una cantidad de glucosa en el estomago del animal, en una proporción de 1Kg de solución de glucosa al 50 % P/v por cada gramo del animal. Para estudiar la absorción de glucosa en el intestino del animal y obtener la curva de tolerancia a la glucosa, se tomaron las muestras cada media hora (30 min.) durante un período de tiempo de 120 min. Cada muestra de sangre, se centrifuga y el plasma sanguíneo es separado.

2.4 Método Estándar de Determinación de Glucosa en Plasma sanguíneo:

Para la determinación cuantitativa de glucosa en sangre, se utilizara el método Glucosa oxidasa enzimática – colorimétrica¹³. Este método emplea glucosa oxidasa que cataliza la oxidación de glucosa a peróxido de hidrógeno y ácido glucónico y una modificación de la reacción de color Trinder¹⁴ catalizada por la enzima peroxidasa. En presencia de peroxidasa, la 4-aminoantipirina e hidroxibenzoato es oxidada por el peróxido de hidrógeno para dar una coloración roja debido a la formación de quinoneimina, cuya longitud de onda de absorción esta entre 500-520 nm. La intensidad de color de la reacción es proporcional a la concentración de glucosa en la sangre. Finalmente la determinación de la glucosa, se lleva a cabo mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{A_m}{A_p} \times C_p$$

C_p : Valor del patrón de glucosa en mg L^{-1} .

A_m : Absorbancia de la muestra

A_p : Absorbancia del patrón

2.5 Aplicación del sistema colorimétrico en muestras reales

Las muestras de suero extraídas de la rata y los patrones de glucosa, se analizaran según el método de glucosa oxidasa. Se construyó la curva de tolerancia a la glucosa, por medición de la absorbancia de las muestras, a una longitud

de onda de 510 nm empleando el espectrómetro convencional, ver sección 2.3 . Simultáneamente se analizaron dichas muestras, utilizando el canal verde del sistema RGB de la cámara web del sistema colorimétrico propuesto. La cuantificación de la glucosa se realizó por interpolación de las señales sobre una curva de calibración construida con disoluciones estándares de glucosa en un intervalo de concentración entre 750 y 3000 mg L⁻¹. Para la validación del sistema propuesto, fueron comparados los resultados obtenidos entre ambos equipos mediante la cuantificación por curva de calibración y el método estándar.

3. RESULTADOS

3.1 Curvas de calibración

En la figura 1, se presentan las curvas de calibración obtenidas mediante el sistema colorimétrico propuesto y el espectrómetro convencional, para un mismo conjunto de disoluciones estándares de glucosa disueltas en agua . La longitud de onda de máxima absorción fue de 510 nm en el equipo convencional, por lo que la medición en el sistema colorimétrico se realizó en el canal verde (G) de los componentes RGB de la cámara Web con detector CCD.

Se observa que el sistema de medición propuesto presenta una sensibilidad ligeramente inferior al espectrómetro convencional. Esto ya ha sido reportado previamente en un trabajo realizado en la calibración de este sistema¹⁰, donde se atribuye la baja sensibilidad al hecho de que la cámara Web no es selectiva en la longitud de onda de medición de la absorbancia, sino que utiliza radiación policromática del canal verde. No obstante si se comparan los parámetros de la curva de calibración de ambos sistemas, ver tabla 1, se observa que estos poseen el mismo intervalo dinámico lineal y valores similares del error típico de la curva y el coeficiente de correlación. Estos resultados indican que el sistema colorimétrico es comparable al espectrómetro convencional.

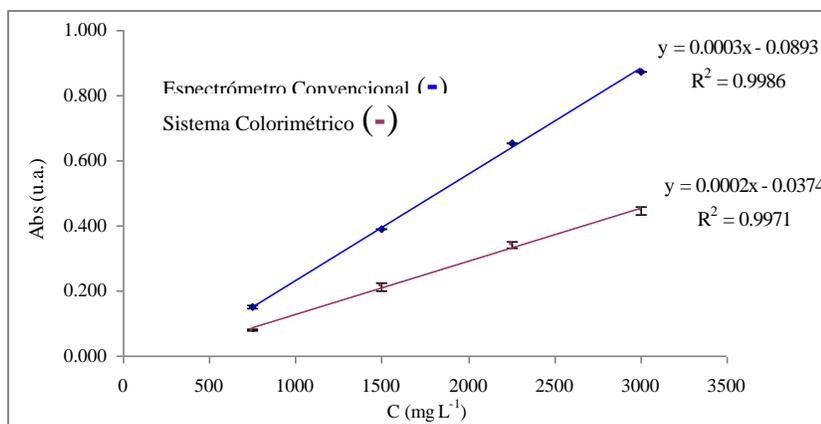


Figura 1. Curva de Calibración de Glucosa obtenida con los dos sistemas de medición de absorbancia.

Tabla 1 Parámetros analíticos de la curva de calibración, obtenidos por ambos sistemas de medición

Equipo	a (mg ⁻¹ L)	b	S _{y/x}	R ²	Intervalo de Trabajo (mg L ⁻¹)
Sistema Colorimétrico	(2,00 ± 0,06) x 10 ⁻⁴	-0,04 ± 0,01	0,011	0,9971	750-3000
Espectrómetro Convencional	(3,00 ± 0,09) x 10 ⁻⁴	-0,09 ± 0,02	0,014	0,9986	

En el método estándar de determinación de la glucosa¹³, el ensayo es lineal hasta una concentración de 5000 mg L⁻¹ y el intervalo de concentración es entre 700 y 1050 mg L⁻¹. El intervalo dinámico lineal de nuestro estudio, 750-3000 mg L⁻¹, está dentro del intervalo del método estándar, con lo cual el instrumento de medición propuesto debería ser capaz de cuantificar adecuadamente valores típicos de concentración de glucosa determinados habitualmente en muestras de plasma sanguíneo.

3.2 Aplicación del sistema colorimétrico en muestras reales

En la figura 2, se presenta la curva de tolerancia a la glucosa obtenida en las muestras de plasma sanguíneo de las ratas. Las mediciones fueron realizadas tanto con el dispositivo propuesto como con el espectrómetro convencional. En todos los casos, se observa la tendencia típica del proceso de absorción intestinal de la glucosa¹⁵, el cual se inicia con una baja concentración de este compuesto, que corresponde a la muestra sanguínea tomada en ayuno. Posteriormente, se observa un máximo en la concentración, esto debido a que se inyectó una cantidad conocida de glucosa en el animal y por lo tanto hay un incremento en la concentración de este componente. Finalmente se observa una disminución en la concentración debido a la absorción de la glucosa en el intestino del animal. Con respecto a la precisión del análisis, podemos observar que el sistema colorimétrico presenta una mayor dispersión en los datos con respecto al espectrómetro convencional, ver figura 2.1 y 2.2, cuando la determinación de la glucosa se realiza mediante el método de curva de calibración. En estas figuras se presenta dos réplicas de una misma muestra. El sistema colorimétrico es menos preciso que el convencional, debido a que la medición de la señal analítica se realiza por comparación entre imágenes digitalizadas de la muestra coloreada y la muestra de referencia; mientras que en el otro sistema la medición se realiza con un sistema de monocromación y detección calibrado.

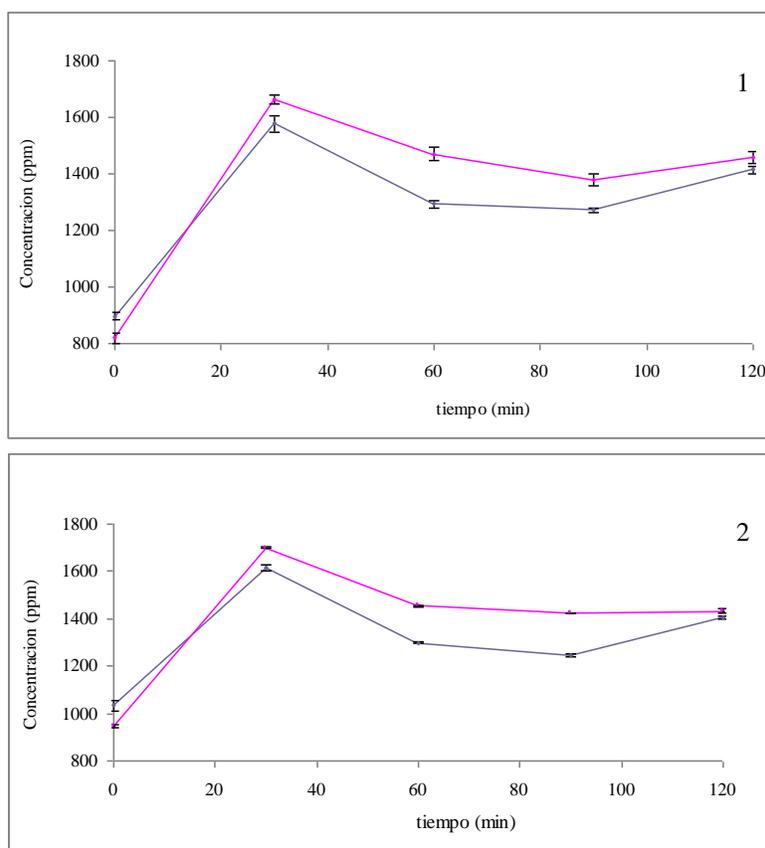


Figura 2. Curva de tolerancia de la glucosa en muestras de plasma sanguíneo de ratas. 2.1 Sistema Colorimétrico y 2.2 Espectrómetro Convencional.

En la figura 3, se comparan los niveles de glucosa obtenidos por ambos sistemas de medición, usando dos métodos de cuantificación. En todos los casos, se observa que los resultados obtenidos en la concentración de glucosa a lo largo del tiempo, estuvieron en intervalo de concentración entre 700 y 1700 mg L⁻¹. Dicho intervalo está dentro de los valores normales de glucosa en plasma sanguíneo. Estos valores son los siguientes: en ayunas de 600 a 1000 mg L⁻¹, a 60 minutos: por debajo de 2000 mg L⁻¹ y a 120 minutos: inferior a 1400 mg L⁻¹. Entre 1400 y 1999 mg L⁻¹, se considera que existe intolerancia a la glucosa y es un grupo que tiene mayor riesgo de desarrollar diabetes. Mientras que los niveles por encima de 2000 mg L⁻¹ indican un diagnóstico de diabetes¹¹. De acuerdo a nuestros resultados, no hay

evidencias patológicas de diabetes ni algún otro tipo de alteración en la glicemia de los animales estudiados. Por otro lado, la concordancia entre los valores de concentración suministrados por el sistema colorimétrico y los obtenidos con el sistema convencional, demuestran la exactitud del prototipo de medición y por tanto éste fue validado en la determinación de glucosa en plasma sanguíneo. La precisión expresada como el coeficiente de variación (CV) estuvo entre el 2 y el 9% para ambos sistemas, esto cuando la cuantificación se realiza por curva de calibración. Resultados similares fueron obtenidos mediante el método estándar con un CV, entre el 3 y el 13%.

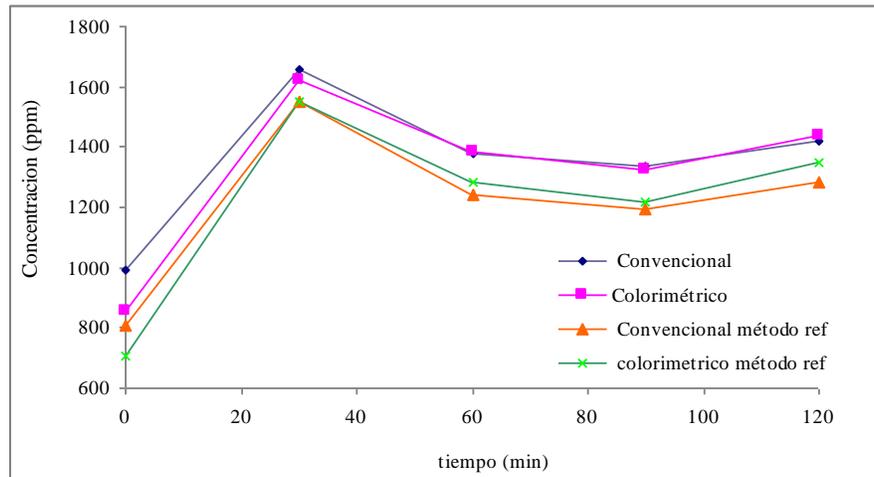


Figura 3. Comparación de los sistemas de medición para la determinación de glucosa en plasma sanguíneo de ratones.

4. CONCLUSIÓN

Un sistema colorimétrico para la medición de absorbancia, con sistema de detección de imágenes por cámara web fue desarrollado. El sistema propuesto se validó en la determinación de glucosa en plasma sanguíneo de ratas. Los resultados obtenidos estuvieron entre 700 y 1700 mg L⁻¹ con una precisión entre el 2 y el 9%. Se demostró la exactitud del sistema colorimétrico, ya que los valores suministrados por este dispositivo en la determinación de glucosa, estuvieron acordes con los obtenidos por el sistema convencional.

5. REFERENCIAS

1. Lozano J.A, Bioquímica para Ciencias de la salud, Editorial Mc Graw-Hill. Segunda Edición España. 1996.
2. Iovine E., Selva A. El laboratorio en la Clínica. Editorial Médica Panamericana. Segunda Edición. Argentina. 1979.
3. Skoog, W y col, *Análisis instrumental*, Mc Graw Hill, 1994, pp 258-259.
4. P. Held, L. Buehrer. "The Synergy™ HT A Unique Multi- Detection Microplate Reader for HTS and Drug Discovery. Bio – Tek Instruments.
5. D. Filippini, S. Svenson, I.Lundstrom, "Microplate based biosensign with a computer screen aided technique". *Biosensors and Bioelectronics* 19, 35 - 41 (2003).
6. N.Maleki, A. Safavi, F. Sedaghatpour. "Single – step calibration, prediction and real samples data acquisition for artificial neural network using a CCD camera". *Talanta* 64, 830-835, (2004).
7. D. Filippini, G. Comina, I. Lundstron. "Computer screen photo – assisted reflectance fingerprinting". *Elsevier* 107, 580 – 586, (2005).
8. D. Filippini, P. Asberg, P. Nilsson, O. Inganas, I. Lundstron. *Sensors and Actuators B*. "Computes screen photo-assisted detection of complementary DNA strands using luminescent zwitterionic polythiophene derivate" 113, 410-418 (2006).
9. A. Alimelli, D. Filippini, R. Paolesse, S. Moretti, G. Ciolfi, A. D'Amico, I. Lundstrom, C. Di Natale. "Direct quantitative evaluation of complex substances using computer screen photo-assisted technology: the case of red wine". *Analytica Chimica Acta* 597,103-112 (2007).
10. J. Castillo, H. Gutiérrez, Y. Vitta, M. Martínez, A. Fernández. "Development and testing of multi – well plates

absorbance reader for clinical analysis using inexpensive web cam". Laboratorio de Espectroscopía Laser, Escuela de Química Facultad de Ciencias. Caracas – Venezuela, 2007.

11. American Diabetes Association: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 28:S37-S42, 2005

12. M. Pérez, S. Rivas. Software para el cálculo de la concentración en soluciones acuosas coloridas. Universidad Central de Venezuela. Escuela de computación. 2008.

13. A.S. Keston. Abstr, 129th Meeting Amer. Chemistry. Soc. p.31, 1956.

14. P. Trinder. *Ann Clin. Biochemistry* 6:24, 1969.

15. F. González-Mujica, N. Motta. A:H: Márquez, J: Capote-zulueta. Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles. *Fitoterapia* 74 (2003) 84-90.
