

ORIGINAL

Influencia de la temperatura en las curvas de calibración en IRMA de enolasa neuronal específica y su interpretación fisicoquímica

T. Peris Conejero^a, R. Olivares Pallerols^a y J.L. Moreno Frigols^{a,b,*}^aServicio de Medicina Nuclear. Unidad de Radiofarmacia. Hospital Clínico Universitario de Valencia. Valencia. España.^bDepartamento de Química Física. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Valencia. España.

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 10 de octubre de 2008

Aceptado el 11 de diciembre de 2008

Palabras clave:

Ecuación cuatro parámetros

Isoterma Langmuir

Reacción antígeno-anticuerpo

Análisis inmunoradiométrico

RESUMEN

Objetivo: el análisis inmunoradiométrico (IRMA) es uno de los métodos principales utilizados en la determinación analítica de la enolasa neuronal específica (NSE). Se ha estudiado la influencia de la temperatura en las gráficas de calibración obtenidas por dicha técnica y se propone una justificación fisicoquímica basada en dos modelos teóricos.

Material y métodos: usamos un kit comercial de IRMA para NSE y un contador gamma. Los resultados son analizados mediante el programa Statistica.

Resultados y discusión: las actividades ligadas al anticuerpo aumentan con la temperatura, lo que da resultados que se ajustan a sendas modificaciones de las ecuaciones de los cuatro parámetros y Langmuir.

Conclusiones: los dos modelos utilizados reproducen satisfactoriamente los resultados, pero es preferible el modelo de adsorción debido a su mayor simplicidad y significado físico más claro.

© 2008 Elsevier España S.L. y SEMN. Todos los derechos reservados.

Influence of temperature on the calibration curves in IRMA for neuron specific enolase and its physicochemical interpretation

ABSTRACT

Background: immunoradiometric assay (IRMA) is one of the principal methods used for the analytical determination of neuron specific enolase (NSE) concentration. We studied the influence of temperature on the calibration curves obtained by this method, and a physicochemical justification based on two theoretical models is proposed.

Material and methods: we used a commercially available RIA kit for NSE and a gamma counter. Data was analysed using Statistical software.

Results and discussion: activity bound to the antibody increases with temperature, producing results that are consistent with two modifications to the four parameter and Langmuir equations.

Conclusions: the two models used successfully reproduce the results, with the adsorption model being preferable due to its greater simplicity and clearer physical significance.

© 2008 Elsevier España, S.L. and SEMN. All rights reserved.

Key words:

Four parameter equation

Langmuir isotherm

Antigen-antibody reaction

Immunoradiometric assay

Introducción

La concentración de enolasa neuronal específica (NSE) en suero humano es de interés en pacientes a los que se ha diagnosticado o en los que se sospecha la presencia de neuroblastoma y carcinoma de pulmón de célula pequeña, y se determina, entre otros métodos, mediante la técnica de análisis inmunoradiométrico (IRMA). Esta técnica es una modificación del radioinmunoanálisis (RIA)¹ debida a Miles et al²,

quienes presentaron algunas consideraciones críticas frente al conocido carácter decreciente de las curvas de calibración en RIA. En el IRMA se hace reaccionar el antígeno presente en la muestra (analito) con un anticuerpo generalmente inmovilizado, y con un segundo anticuerpo marcado radiactivamente (trazador). A continuación se mide la radiactividad del complejo anticuerpo inmovilizado-antígeno-anticuerpo marcado («sándwich») que, lógicamente, aumenta con la concentración de antígeno. Como puede verse, la diferencia fundamental entre RIA e IRMA consiste en que el trazador radiactivo es el antígeno en el primero y el anticuerpo en el segundo, con el resultado ya señalado de que las gráficas de calibración son decrecientes en el primer caso y crecientes en el segundo. Dichas gráficas necesitan un método de ajuste de cuya bondad depende la exactitud del valor de la concentración problema.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jose.l.moreno@uv.es (J.L. Moreno Frigols).

Tabla 1

Valores obtenidos para las curvas de calibración a distintas temperaturas

x (ng/ml)	0	2	6	20	60	200
y (cpm), 4 °C	379,5	718,5	950,2	2.055,2	4.673,8	12.218,6
y (cpm), 25 °C	577,5	661,5	1.524,2	3.097,1	5.645,6	18.309
y (cpm), 30 °C	289,5	448,5	1.325,1	2.715,5	7.093,3	20.835
y (cpm), 37 °C	466,5	700,5	1.610,5	3.226,5	9.699,2	22.915,1

x = concentración de los patrones en ng/ml.

y = actividad en cuentas por minuto (cpm) obtenida para cada patrón a las temperaturas indicadas.

El modelo no lineal más usado en inmunoanálisis es el modelo logístico de los 4 parámetros³. Se puede escribir de varias formas, una forma común es la que se muestra a continuación (ecuación 1):

$$y = (A - D) / (1 + (x / C)^B) + D$$

Los términos de esta ecuación representan: x: concentración de una muestra; y: radiactividad correspondiente a dicha muestra; A: valor de y para x = 0 (blanco); B: exponente relacionado con el grado de cooperatividad en la unión antígeno-anticuerpo; C: valor de x para el que y = (A + D) / 2; D: valor de y para x muy grande.

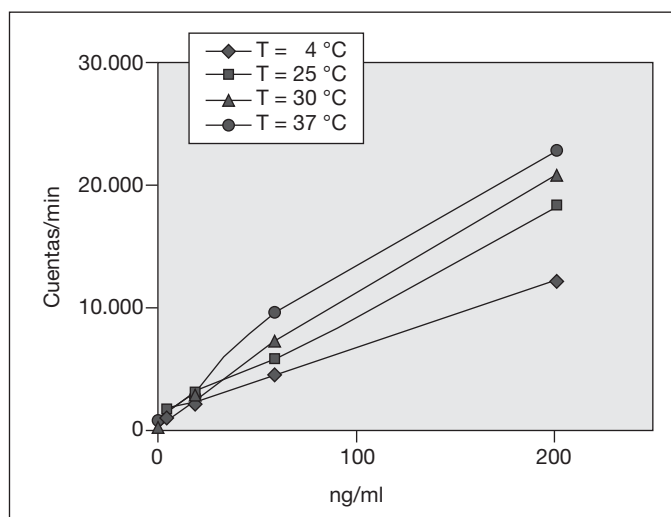
Objetivo

En trabajos anteriores⁴⁻⁹ hemos estudiado la influencia de algunos factores fisicoquímicos en la cinética de las reacciones implicadas en las técnicas inmunoanalíticas, así como una justificación teórica de la ecuación de 4 parámetros a partir del modelo de interacción ligando-receptor¹⁰. En este caso pretendemos analizar la influencia de la temperatura en las gráficas de calibración obtenidas en el caso concreto de la NSE, tratando de utilizar dicha ecuación y la isoterma de adsorción de Langmuir¹¹ para justificar y asignar un sentido fisicoquímico a las variaciones encontradas.

Material y métodos

Reactivos:

- Glóbulos recubiertos de anticuerpo monoclonal anti-NSE.
- Disolución de anticuerpo monoclonal anti-NSE marcado con ¹²⁵I.

**Figura 1.** Gráficas de calibración para el IRMA de NSE a las cuatro temperaturas estudiadas.

- Disoluciones patrones de NSE. Concentraciones: 0, 2, 6, 20, 60, 200 ng/ml.

Todos los reactivos usados estaban incluidos en el kit Polifigen® NSE IRMA, suministrado por Diasorin, Stillwater, Minnesota, Estados Unidos.

Instrumentos: LKB Gammamaster Automatic Gamma Counter.

Procedimiento experimental: a cada tubo recubierto se añadieron 25 µl de disolución patrón, 200 µl de anticuerpo marcado y un glóbulo recubierto, y se dejaron en reposo durante 3 h en baño termostático a distintas temperaturas. Transcurrido ese tiempo, los tubos se lavaron con agua destilada y se midió su actividad en el contador. Se realizó una sola curva de calibración para cada temperatura.

Análisis de los resultados: se usó el programa Statistica (StatSoft®, 1993) con ecuaciones específicas para regresión no lineal. Para la elección entre diferentes ecuaciones se usa el GraphPad Software Quick Calcs¹², que utiliza el Corrected Akaike's Information Criterion (AICc), expresado como $AICc = N \cdot \ln(SS/N) + 2 \cdot P + 2 \cdot P \cdot (P + 1) / (N - P - 1)$ donde N es el número de puntos, SS la suma de cuadrados de residuales y P el número de parámetros en la ecuación, y debe elegirse el modelo que dé un AICc más bajo. También se utiliza el ANOVA (F test).

Resultados y discusión

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos para la curva de calibración a distintas temperaturas.

Las gráficas correspondientes a los resultados mostrados en la tabla 1 se muestran en la figura 1.

La ampliación de la zona de valores menores de 20 ng/ml se muestra en la figura 2.

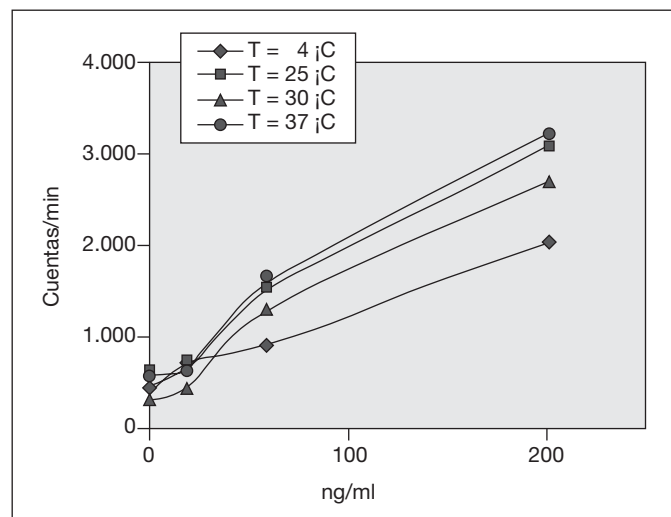
Los resultados mostrados en la figura 1 se ajustan bien a la ecuación:

$$y = (A - D) / (1 + (x / C \cdot \exp(E / T))^B) + D \text{ (ecuación 2)}$$

Cuyos parámetros, coeficiente de correlación (r), y suma de cuadrados de residuales (ss) son:

$$A = 481; D = 111.600; C = 0,931; E = -2.100; \\ B = 0,973; r = 0,998; ss = 3,82 \times 10^6.$$

La ecuación 2 se obtiene a partir de la ecuación 1, teniendo en cuenta que el parámetro C contiene la constante de equilibrio para la formación del inmunocomplejo y expresa dicho parámetro como

**Figura 2.** Gráficas de calibración para el IRMA de NSE a las cuatro temperaturas estudiadas para valores menores que 20 ng/ml.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/4249090>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/4249090>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)