

Cálculo de la actividad hemolítica del complemento sérico mediante un programa en "Basic": Comparación con el método gráfico manual

Dr. Bruno Lomonte*, Dr. Abel Robles*, Dra. Eugenia Mata*, y Dr. Luis Cerdas*

Introducción

La cuantificación de la actividad del complemento sérico posee importancia en una serie de situaciones patológicas (2,3). Dicha determinación se realiza cuantificando la hemólisis debida al complemento del suero en estudio, al mezclarlo con una suspensión estandarizada de eritrocitos recubiertos de anticuerpos (5). Los resultados de este análisis se expresan en unidades arbitrarias, denominadas "unidades hemolíticas 50%". Una unidad hemolítica 50% se define por convención como aquella cantidad de suero capaz de lisar la mitad de los eritrocitos de una suspensión estandarizada, bajo ciertas condiciones definidas. Estas condiciones, así como la estandarización de la suspensión de eritrocitos, pueden variar ligeramente entre los distintos métodos; no obstante, el principio teórico mencionado es común a todos.

Recientemente, hemos descrito una técnica simple y confiable para la cuantificación del complemento sérico humano con la cual hemos determinado los niveles de referencia para la población adulta normal. En dicho método, al igual que en otros, el resultado final de la prueba se obtiene a partir de un gráfico logarítmico, que relaciona la cantidad de suero empleado, con el grado de hemólisis. La hemólisis es expresada en la forma $y/1-y$, en donde "y" representa el porcentaje de hemólisis dividido por cien. Este tipo de gráfico se basa en la ecuación de von Krogh (5), y debido a que proporciona una línea recta, presenta una serie de ventajas sobre los gráficos lineales simples: (a) requiere de pocos puntos para su trazado; (b) da menor error de interpolación; y, (c) permite estimar la precisión del trabajo técnico.

Con el fin de agilizar la prueba y reducir el tiempo que requiere la elaboración del gráfico, diseñamos un programa simple en lenguaje "BASIC", que puede ser usado en calculadoras de bolsillo programables, así como en microcomputadoras, y que proporciona el resultado final de la prueba partiendo únicamente de las lecturas espectrofométricas. En el presente trabajo se describe el programa para el cálculo de la actividad hemolítica del complemento sérico, y se muestran los resultados de un estudio comparativo entre el método gráfico manual y el método matemático empleando dicho programa.

* Instituto Cloromiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José-Costa Rica.

Material y métodos

El programa para obtener el valor de CH50, directamente en unidades por mililitro (U/ml), se elaboró en lenguaje "BASIC", adaptado para su utilización en una calculadora de bolsillo programable Casio FX-710 P. El programa se basa en una fórmula de regresión matemática para calcular la línea de mejor ajuste, y procesa las lecturas de los tubos de hemólisis obtenidas en el espectrofotómetro (porcentajes de transmitancia), según el esquema de trabajo de la técnica descrita por Mata & Lomonte (4).

Con dicho programa, se analizó retrospectivamente los resultados de 86 muestras para la determinación de complemento sérico (61 correspondientes a muestras de donadores de sangre y 25 correspondientes a alícuotas del suero empleado en el control de calidad), que habían sido procesadas mediante el método gráfico manual. Ambos tipos de resultados se compararon haciendo un análisis de correlación lineal simple (1).

Resultados

El Cuadro 1 muestra el programa utilizado. El gráfico de correlación obtenido con la totalidad de las muestras ($n=86$) se presenta en el gráfico 1. En dicho análisis global, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,9863, mientras que al analizar por separado las muestras del suero control y de los donadores se obtuvo coeficientes de 0,9920 y 0,9823, respectivamente.

Los valores del promedio y la desviación estándar en el conjunto de individuos estudiados ($n=61$) fueron calculados por ambos métodos, obteniéndose 91,57 + 14,01 por el método manual, y 91,80 + 13,92 por el método automático.

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el cálculo del valor CH50 empleando el programa descrito correlaciona muy bien ($r=0,9863$) con el método gráfico manual. Esto era de esperar, dado que la técnica de cuantificación empleada proporciona una alta linealidad, y pocas veces requiere del trazado de una línea mejor de ajuste. En aquellos casos en que las lecturas de hemólisis no proporcionan una linealidad perfecta, el uso del programa resulta en un valor más objetivo y exacto que el calculado mediante el trazo "visual" de una línea de mejor ajuste. Por otra parte, los coeficientes de correlación obtenidos al analizar por separado las muestras del suero control de los donadores fueron muy similares, con una correlación ligeramente mayor en el grupo del suero control. Lo anterior puede deberse a la menor variabilidad de valores de complemento en dicho suero.

Cuadro 1

Programa para el cálculo del valor CH50 en U/ml. adaptado para una calculadora programable Casio FX-710-P.

```
10 PRINT "COMPLEMENTO"
20 SET N
30 FOR N=1 TO 7
40 PRINT "%I":N;"=";
50 INPUT B(N)
60 B(N)=2-LOG B(N)
70 PRINT "A":N;"=";
80 SET F3
90 PRINT B(N)
100 SET N
110 NEXT N
120 FOR N=1 TO 5
130 B(N)=B(N)-B(6)
140 PRINT "A'":N;"=";
150 SET F3
160 PRINT B(N)
170 SET N
180 NEXT N
190 FOR N=1 TO 6
200 B(N)=B(N)/B(7)
210 PRINT "Y":N;"=";
220 SET F2
230 PRINT B(N)
240 SET N
250 NEXT N
260 IF B(6)>0.05 THEN PRINT "AUTOLISIS!"
270 FOR N=1 TO 5
280 B(N)=B(N)/(1-B(N))
290 PRINT "Y/1-Y":N;"=";
300 SET F2
310 PRINT B(N)
320 SET N
330 NEXT N
340 FOR N=1 TO 5
```

Continúa

Continuación del Cuadro 1

```

350 B(N)=LOG B(N)
360 NEXT N
370 Q=0:Z=0:W=0:V=0:P=0:S=0:O=0:X=0:R=0:U=0
380 FOR L=1 TO 5
390 READ A
400 IF B(L)<-1 THEN GOTO 490
410 IF B(L)>1 THEN GOTO 490
420 P=P+1
430 A=LOG A
440 Q=Q+A
450 Z=Z+A↑2
460 W=W+B(L)
470 V=V+B(L)*A
480 A=0
490 NEXT L
500 S=(P*V-Q*W)/(P*Z-Q↑2)
510 O=(W-Q*S)/P
520 X=-(O)/S
530 R=10↑X
540 U=1000/R
550 SET F1
560 PRINT U:"U/ml"
570 SET N
580 DATA 5, 7.5, 10, 15, 20
590 END

```

Nota: si se desea obtener el resultado directamente, se puede omitir los pasos 70, 90, 140, 160, 210, 230, 290, y 310. Si se incluyen dichos pasos en el programa es posible copiar los cálculos para archivo o para una corroboración mediante gráfico.

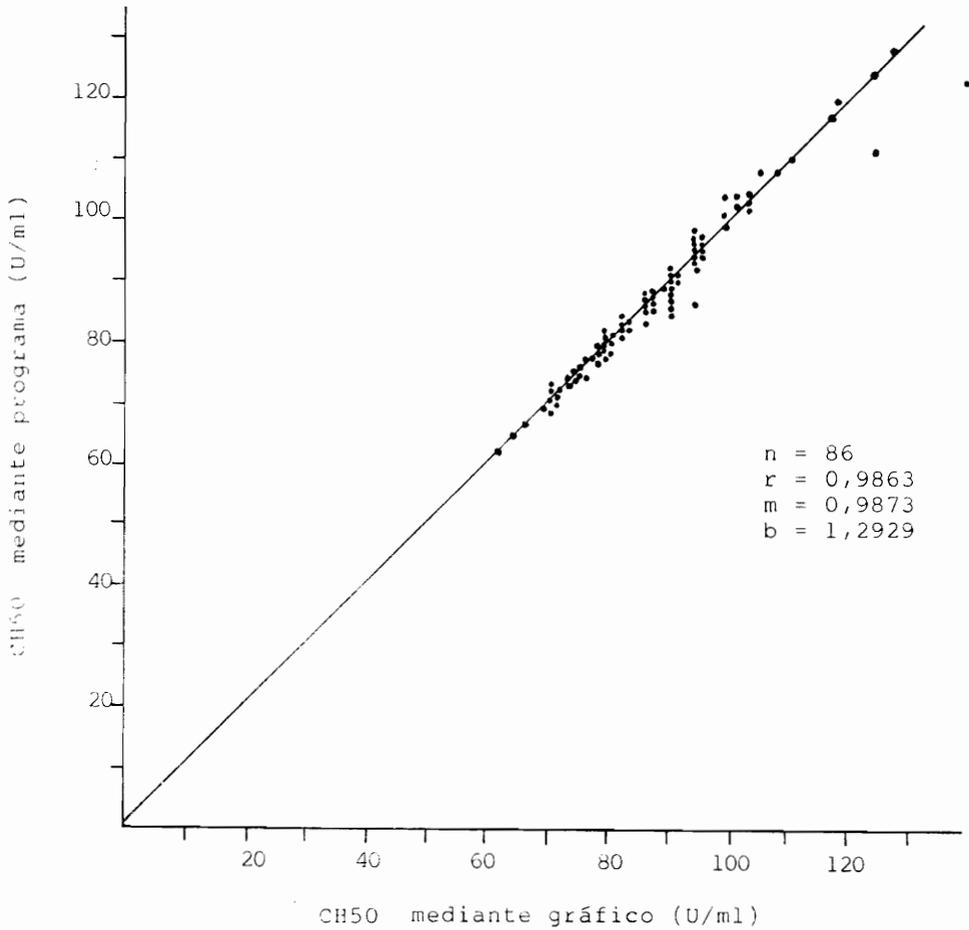


Gráfico 1: Correlación lineal simple entre los valores de complemento sérico calculados por el método gráfico manual y los valores calculados empleando el programa.

Cada punto representa una determinación. n: número de muestras analizadas; r: coeficiente de correlación; m: pendiente; b: intersección en el eje Y.

El uso del programa permite un ahorro sustancial de tiempo, ya que no sólo se evita la elaboración del gráfico, sino también todo el procesamiento de los datos previo a la gratificación, el cual incluye: conversión de las lecturas de porcentaje de trasmittancia a absorbancia, corrección de las absorbancias (por hemólisis del tubo de control), cálculo del porcentaje de hemólisis en cada tubo, cálculo de los valores "y", y cálculo de los valores "y/1-y". Además, otras características ventajosas del programa son: (a) la detección de situaciones en las que hay una hemólisis mayor del 5% en el tubo de control de reactivos, causada por errores en la isotonicidad del amortiguador o por fragilidad excesiva de los eritrocitos. En este caso aparece antes de los resultados una señal de alerta ("autohemólisis") indicando que hay que descartar la prueba; y (b) el programa elimina automáticamente los valores de los tubos en los que "y/1-y" es mayor de 10 ó menor de 0,1. Esto se realiza debido a que se ha demostrado que en valores de hemólisis muy extremos ocurren desviaciones (2).

El programa descrito ha sido adaptado y utilizado por nosotros en otras computadoras, como la Sinclair ZX-81 y la Commodore 64, con iguales resultados. En tales casos solamente se requiere adaptar el programa a las características particulares de cada máquina. En resumen, consideramos que este programa puede sustituir el cálculo manual del valor CH50 en la determinación de la actividad hemolítica del complemento sérico.

Resumen

Se describe un programa en lenguaje "BASIC" para calcular la actividad hemolítica del complemento sérico, en U/ml, según el método descrito por Mata & Lomonte. Se demuestra, mediante un análisis retrospectivo de 86 muestras, que hay una alta correlación ($r=0,9863$) entre los valores de CH50 obtenidos mediante el uso del programa, y los valores obtenidos por el método gráfico convencional. Se analiza algunas características ventajosas del programa, y se sugiere que el mismo puede sustituir al método convencional gráfico.

Agradecimientos

Agradecemos la valiosa ayuda del personal del Instituto Cloromiro Picado, de las personas que donaron muestras para el estudio y de la Vicerrectoría de Investigación por su apoyo en la asignación de carga académica.

Bibliografía

1. Daniel, W.: Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa, México, 1979.
2. Gewurz, H. & Suyehira, L.: Complement. En: Manual of Clinical Immunology, Rose, N. & Friedman, H. Eds. American Society for Microbiology, Washington, 1976.
3. Luskin, A.: Alterations of complement in disease. Amer. J. Med. Technol. 48: 749, 1982.
4. Mata, E. & Lomonte, B.: Determinación cuantitativa de la actividad lítica del complemento sérico (CH50) en adultos costarricenses. Rev. Cost. Cienc. Med. (en prensa), 1986.
5. Mayer, M.: Complement and complement fixation. En: Experimental Immunochemistry; Kabat, E. & Mayer, M. Eds. Charles C. Thomas Publisher, Springfield. 1961.