

Control de calidad interno de la determinación de folatos séricos por metodologías inmunométricas

Internal quality control of the determination of serum folate by immunometric methods

Sara Rodríguez Aguilar¹, Louella Cunningham Lucas²

¹ Licenciada en Microbiología y Química Clínica, especialista en Radioinmunoensayo, Centro Nacional de Referencia en Química Clínica. Instituto costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (CNRQC-Inciensa), srodriguezaguilar@gmail.com, srodriguez@inciensa.sa.cr

² Licenciatura en Microbiología y Química Clínica, CNRQC-Inciensa, louellacu@yahoo.es

Recibido: 25 setiembre 2012

Aprobado: 23 noviembre 2012

RESUMEN

Objetivo: Comparar dos tecnologías de determinación de folatos séricos en mujeres en edad fértil, que comparten el mismo principio y evidenciar la mejora tecnológica, así como, la validez de los resultados.

Materiales y Método: Los datos provienen de tres estudios poblacionales y cuatro de comunidades centinela. El tamaño de muestra se calculó usando el procedimiento propuesto por Fleiss (1981) y se aplicó un diseño de muestra multi-etapa y se incorporó en el análisis estadístico un ajuste por efecto de diseño de 1,5.

Resultados: Desde la perspectiva del laboratorio se nota una mejora en la variabilidad analítica de la determinación de folatos, expresada como el porcentaje del coeficiente de variación inter-ensayo, llevada a cabo con dos sistemas analíticos diferentes donde la variabilidad fue 15,3 % con Radio Inmuno Ensayo y 6,4 % con el método quimio-luminiscente automatizado. La concentración de folatos mostró un aumento progresivo durante el periodo estudiado.

Discusión: La evidencia histórica de 13 años de estudio permite demostrar el progreso tecnológico y la mejora en la concentración de folatos en la población, como resultado de la fortificación de alimentos, principalmente las harinas de trigo y de maíz, el arroz y la leche que se implementó en Costa Rica a partir de 1997.

Palabras clave: Técnicas de Diagnóstico por Radioisótopo, Inmunoensayo, Técnicas de Química Analítica, Control de Calidad (fuente: DeCS, BIREME)

ABSTRACT

Objective: To compare two technologies sharing the same principle to determine serum folates in women of child-bearing age; and to show the technological improvements, as well as the validity of the derived results.

Method: The size of the sample was calculated using the procedure proposed by Fleiss (1981), a multi-stage sampling design was applied and an adjustment due to experimental design of 1,5 was included in the statistical analysis.

Results: From the laboratory perspective an improvement in the analytical variability of the folate determination is observed, expressed as the percentage of inter-assay variation coefficient, carried out with two different analytical systems where the variability was 15,3 % with Radio Immuno Essay and 6,4 % with the automated chemi-luminescent method. The concentration of folates showed a progressive increase during the studied period.

Discussion: Historic evidence of 13 years of study demonstrates the technological progress and the improvement in the folate concentration in the population, as a result of the fortification of food that was implemented in Costa Rica from 1997 onwards, including mainly wheat and cornmeal flours rice, and milk.

Key words: radio-isotope techniques, Immunoassay, Chemistry Techniques, Analytical, Quality Control (source: MeSH, NLM)

Los países en vías de desarrollo presentan una alta prevalencia de anemias nutricionales que en ocasiones se deben a una deficiencia combinada de hierro y folato. El ácido fólico (folato) es un micronutriente esencial en la hematopoyesis y la división celular. Juega un importante papel en la síntesis y metabolismo de los aminoácidos y los ácidos nucleicos en el cuerpo al fungir como coenzima, para el tratamiento de la anemia megaloblástica, así como en la prevención de los defectos del tubo neural y más recientemente, asociado a las enfermedades cardiovasculares (1-3).

Los primeros reportes relacionados con el comportamiento de los folatos en la población costarricense provienen del estudio realizado en 1966 por el Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), sobre la evaluación nutricional de la población de Centroamérica y Panamá-Costa Rica. La encuesta indicó que la prevalencia de la deficiencia de folatos en las mujeres en edad fértil (MEF) de las zonas rural y urbana fue 25 % (4), siendo un problema severo de salud pública que pasó a moderado en 1996 (24,7 %) y drásticamente a leve (3,8 %) en 2008/2009 (<http://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/gestores-salud-tecno-ciencia-encuestas-ms>).

La Encuesta Nacional de Nutrición de 1996 se llevó a cabo con el fin de actualizar la información relacionada con la situación alimentaria nutricional y se identificaron los nutrientes deficientes en la población. Para determinar la deficiencia de folatos se utilizó la técnica radioisotópica RIA (Radio Inmuno Ensayo).

La Encuesta Nacional de Nutrición del 2008/2009 se realizó con el propósito de contar con información actualizada y confiable de la situación nutricional del país, así como medir el impacto de las políticas de fortificación de alimentos implementadas a partir de 1997 como medidas de salud pública. En esa ocasión, la concentración de folatos se determinó mediante un inmunoanálisis automatizado quimioluminiscente mostrando una mejoría en la concentración sérica de folatos en el ámbito nacional.

El objetivo de este trabajo es brindar a la comunidad científica, desde la perspectiva analítica, información que valida y garantiza la calidad de los resultados que se generan en el laboratorio clínico, al utilizar técnicas inmunométricas para el diagnóstico y seguimiento de problemas hematológicos y la medición del impacto de las estrategias nacionales, entre otros. En este documento se presentan los parámetros de calidad de las determinaciones de folatos y su comportamiento en cinco estudios nacionales, en su mayoría bajo el marco de las Encuestas Nacionales de Nutrición (ENN)

y las Encuestas de Comunidades Centinelas sobre Alimentación y Nutrición (ECCAN) realizadas en Costa Rica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron las muestras de mujeres entre 15 y 44 años de edad (edad fértil, MEF) provenientes de estudios transversales: tres de alcance nacional (ENN-96, 2008/2009) y el Consumo de ácido fólico en mujeres en edad fértil incluidas en los programas de suplementación y fortificación (2005, Tesis de maestría en Nutrición Humana. Universidad de Costa Rica), dos estudios en la comunidad centinela (ECCAN) zona rural San Antonio de Nicoya 2000 y 2008; dos en ECCAN zona urbana Damas de Desamparados 1999 y 2009 (5) (<http://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/gestores-salud-tecno-ciencia-encuestas-ms>, <http://centroamerica.oer.bvsalud.org/index.php?P=Advance&Search&Q=Y&G82=406&SF=4>).

El tamaño de muestra se calculó usando el procedimiento propuesto por Fleiss (1981) en todos los estudios, excepto en el año 2005 (Consumo de ácido fólico) que se hizo por cuota. Se aplicó un diseño muestral multietápico el cual consiste en seleccionar primero segmentos, luego viviendas y por último los sujetos de estudio dentro de las viviendas. Para obtener estimaciones correctas se incorporó en el análisis estadístico, Epi Info versión 3.5.1, un ajuste por efecto de diseño (error muestral), basado en la experiencia adquirida anteriormente en la ENN-96 (Deff de 1,5) y se omitieron las mujeres embarazadas y las lactantes. Con previa firma del consentimiento informado, a cada participante se le extrajo una muestra sanguínea de al menos 5 ml de sangre total en tubo al vacío, libre de minerales traza y protegido de la luz para evitar la degradación de los folatos, condición que se mantuvo a lo largo del proceso. A más tardar dos horas después de la extracción se procedió a la separación del suero por centrifugación de la muestra a 4 °C, durante 10 minutos a 3000 rpm. El suero se transvasó en tubos cónicos color ámbar tipo "Eppendorf" y se almacenó a -20° C hasta el momento del análisis.

En las determinaciones entre los años 1996 y 2005 se usaron radioinmunoensayos (RIA) de la casa DPC (Dualcount Solid Phase No Boil). En el 2008/2009 se realizaron con un método automatizado de quimioluminiscencia en el sistema analítico Immulite 1000 de Siemens-DPC (Dualcount Solid Phase No Boil). Ambas técnicas tienen el mismo principio metodológico, según lo describe el inserto de los reactivos y fueron analizadas en el laboratorio del Centro Nacional de Referencia en Química Clínica del Inciensa.

La calidad de las determinaciones se evaluó con base en los parámetros de control de calidad interno de las técnicas radioisotópicas. En RIA-DPC se reportó la unión máxima, la unión no específica, relación error respuesta y la dosis al 20, 50 y 80 %; en los ensayos de quimioluminiscencia la pendiente. En ambos casos se evaluaron sueros control comercial con los cuales se determinó la variabilidad intra e inter ensayo expresada como el porcentaje de coeficiente de variación. Además, en los años 2008/2009 los ensayos fueron validados con sueros control propios producidos para el Programa

de Evaluación Externa del Desempeño en Química Clínica (PEEDQC) coordinado por el Centro Nacional de Referencia del Inciensa. Todos los parámetros del control interno, los resultados de los sueros control comercial y propio fueron satisfactorios.

RESULTADOS

En la tabla 1, se muestran los parámetros de control de calidad interno de ambas metodologías. El promedio de la pendiente fue $1,51 \pm 0,10$ (1,21-1,81) y estuvo dentro del ámbito esperado (1-2).

Tabla 1. Parámetros de control de calidad interno en los ensayos inmunométricos^a Evaluación de folatos séricos en mujeres en edad fértil Costa Rica, 1996 – 2009.

Parámetro	ENN 1996	Consumo ác. fólico MEF ^b 2006	ENN 2008/2009 ^c CC Nicoya San Antonio 2008 ^c	CC Nicoya San Antonio 2000	CC Damas Desamparados 1999	CC Damas Desamparados 2009
Sueros control CON4	2,6±0,4 (1,7-3,5)	1,2±0,4 (0,78-1,42)	3,2±0,2 (2,54-3,66)	1,8±0,2 (1,3-2,3)	1,3±0,2 (1,5-2,0)	2,8±0,3 (2,54-3,66)
Sueros control CON5	6,1±1,2 (3,6-8,5)	4,4±0,7 (4,3-5,5)	8,8±0,5 (6,8-9,2)	6,8±0,5 (5,7-9,3)	5,1±0,8 (6,3-8,1)	8,6±0,3 (6,76-9,24)
Sueros control CON6	17,2±1,9 (13,9-2,3)	8,3±1,7 (7,3-8,9)	13,5±0,9 (10,8-13,8)	8,9±0,9 (8,6-13,8)	8,2±1,4 (8,9-11,3)	14,0±0,14 (10,8-13,8)
Variabilidad inter-ensayo (%CV)	15,3	17,0	6,4	9,7	15,9	6,3
Variabilidad Intraensayo (%CV)			2,4			1,1
Metodología Quimioluminiscente						
Pendiente	0,86	0,71	1,51±0,10 (1,21-1,81)	0,83	0,80	1,61±0,12 (1,49-1,73)
Metodología Radioisotópica						
Unión Máxima (%)	35,9±3,8	30,3±3,7	NA	40,7±3,1	42,8±4,2	
Unión No específica (%)	0,42±0,14	0,85±0,5	NA	1,35±0,14	0,28±0,04	
Dosis al 20%mg/ml	35,6±11,3		NA		23,1±7,5	
Dosis al 50%mg/ml	5,4±0,9	3,4±0,5	NA	5,0±0,4	4,9±2,1	
Dosis al 80%mg/ml	1,2±0,9		NA		1,2±0,5	

CC: Centro Centinela

^a: Radio inmuno ensayo (RIA) y quimioluminiscencia

^b: Mujeres en edad fértil (MEF) incluidas en los programas de suplementación y fortificación

^c: en ambos estudios las muestras se analizaron con los mismos lotes de reactivo

NA: No aplica (): Entre paréntesis, el rango esperado

Con los tres niveles del suero control comercial (bajo, CON 4; medio, CON 5 y alto, CON6) se obtuvieron concentraciones de 2,6; 6,1 y 17,2 ng/ml en la ENN

2008/2009 que caen dentro de los rangos esperados propuestos por la casa comercial para cada lote.

En ENN de 1996 la variabilidad inter ensayo fue 15,3

% y 6,4 % en ENN de 2008/2009 para las técnicas de RIA y quimioluminiscencia, respectivamente. Todos los parámetros de control de calidad interno según metodología presentaron un comportamiento satisfactorio.

En la tabla 2, se muestra la estadística descriptiva de la población estudiada: mediana, promedio, intervalo de confianza y desvío estándar de folatos obtenidos en los diferentes estudios, así como, el método utilizado.

Tabla 2. Estadística descriptiva de la determinación de folatos séricos en mujeres en edad fértil Costa Rica, periodo 1996 - 2009

Estudio	N	Mediana (ng/ml)	Concentración promedio (ng/ml)	IC 95%	σ	Método
Ámbito Nacional						
Encuesta Nacional de Nutrición 1996	879	8,7	10,1	9,5-10,6	5,8	RIA
Consumo ácido fólico MEF^a 2006	600	8,3	11,1	4,3-14,9	9,6	RIA
Encuesta Nacional de Nutrición 2008/2009	809	14,6	14,7	14,2-15,2	0,2	Quimio luminiscencia
Comunidades Centinela						
San Antonio Nicoya 2000	190	10,6	12,5	10,4-14,6	7,3	RIA
San Antonio Nicoya 2008/2009	190	14,5	15,4	12,9-18,3	6,2	Quimio luminiscencia
Damas Desamparados 1999	207	14,3	15,8	14,7-16,9	0,6	RIA
Damas, Desamparados 2008/2009	276	24,0	17,1	7,8- 26,0	9,1	Quimio luminiscencia

^a: Mujeres en edad fértil (MEF) incluidas en los programas de suplementación y fortificación.

Las mujeres en edad fértil tuvieron un aumento en la concentración promedio de folatos el cual pasó de $10,1 \pm 5,8$ ng/ml (9,5- 10,6) a $14,8 \pm 0,2$ ng/ml (14,2-15,2), al comparar los datos de las últimas encuestas nacionales de nutrición (1996 y 2008/2009, respectivamente). Además, los hallazgos encontrados en el estudio sobre los efectos de la suplementación en las mujeres en edad fértil del año 2005 y los resultados en las comunidades centinelas rural y urbana en el 2008-09 señalan un avance similar con promedios de $11,1 \pm 9,6$; $15,4 \pm 6,2$ y $17,1 \pm 9,1$ ng/ml, respectivamente.

DISCUSIÓN

En las últimas décadas el proceso de automatización en el laboratorio clínico permitió dejar atrás las técnicas manuales radioisotópicas con Iodo¹²⁵ e incursionar en un sistema de inmunoanálisis automatizado, no radiactivo, que utiliza un sustrato quimioluminiscente generador de una señal lumínica. Este avance tecnológico permitió al CNRQC del Inciensa comparar dos metodologías que comparten el mismo principio

(Radio inmuno ensayos, RIA, a quimioluminiscencia) y comprobar el cambio, ya que la quimioluminiscencia posee una curva maestra almacenada en el sistema en donde el parámetro de control interno es la pendiente y proporciona el más alto nivel de sensibilidad posible, que no puede ser alcanzado con ensayos inmunológicos radiactivos utilizados anteriormente para tamizar en estudios masivos según describe el manual del operador del Immulite 1000. Aun utilizando sistemas analíticos automatizados, se debe tener en cuenta la alta variabilidad biológica (superiores al 33 %) que presentan los folatos en las tablas generadas por diferentes organizaciones internacionales (http://www.cap.org/apps/docs/proficiency_testing/surveys_catalog/2010_surveys_catalog.pdf <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>).

En este trabajo se muestra la mejora en la concentración promedio de folatos en las MEF (sin tomar en cuenta las prevalencias de las deficiencias) que se evidenció con el aumento de 4,7 ng/ml en la última encuesta nacional de nutrición con respecto a la del 96. De igual

forma los hallazgos encontrados en el resultado del 2005 sobre los efectos de la suplementación con ácido fólico en las mujeres en edad fértil y los resultados en las comunidades centinela estudiadas también aumentaron. Toda esta evidencia histórica de 13 años permite dar fe de los beneficios y del logro alcanzado con la estrategia de fortificación de alimentos con hierro y ácido fólico que consume toda la población en una cantidad similar cada día, especialmente las harinas de trigo y de maíz, el arroz y la leche que se implementó en Costa Rica a partir de 1997 (6, 7).

La fortificación de alimentos es una estrategia nutricional ampliamente recomendada y utilizada en muchos países desarrollados y en vías de desarrollo (Suiza, USA, Chile, Venezuela) para corregir las deficiencias de nutrientes esenciales, debido a su cobertura, biodisponibilidad y bajo costo. La deficiencia de folatos está directamente relacionada con anemias nutricionales por ser esencial para la formación de eritrocitos y leucocitos en la médula ósea y para su maduración; con las enfermedades cardiovasculares por la acción que ejercen en el metabolismo de los aminoácidos como coenzimas en la transformación de homocisteína en metionina; y con las malformaciones del tubo neural y espina bífida en recién nacidos por la prevención de los defectos (8-12).

En Costa Rica los últimos informes técnicos del Centro de Registro de Enfermedades Congénitas (CREC) del Inciensa reportan una disminución de casos y la publicación de Barboza Argüello y Umaña Solís, sobre el impacto de la fortificación de alimentos con ácido fólico en los defectos del tubo neural (DTN), concluye que la fortificación contribuyó una reducción de DTN al nacimiento y de la tasa de mortalidad infantil por esta malformación al igual que la general, en el periodo 1997-2009 (7, 13).

Los resultados de la última encuesta nacional de nutrición en Costa Rica en el año 2008/2009 revelaron un descenso de 20 puntos en la prevalencia general de la deficiencia de folatos en la población femenina con respecto al año 1996, en concordancia con el hallazgo del estudio antes mencionado, demostrándose la efectividad de la fortificación de alimentos con ácido fólico en los últimos catorce años.

En este trabajo se evidencia el sentido de cumplimiento asumido por el Centro Nacional de Referencia en Química Clínica del Inciensa al garantizar desempeños dentro de los límites permitidos para cada analito o sustancia mediante el control interno de los sueros control comerciales y propios a fin de brindar datos confiables y de calidad. Es responsabilidad del

profesional del laboratorio clínico, responder o rendir cuentas no sólo de sus actos sino también de los realizados por otro, de implementar nuevas tecnologías que permitan innovadores procedimientos diagnósticos y terapéuticos, la aplicación de protocolos de trabajo y planificar la garantía de calidad, entre otros aspectos.

REFERENCIAS

1. Balloy L.B, Gregoru J.F. Folate metabolism and requirements. *J.Nutr.* 1999; 129(4):779-782.
2. Hoffpauer D.W., Bonnette R.E. Enrichment update on folic acid. *Cereal Food Word* 1998; 43(5):365-367.
3. Pietzick K, Bronstrup a. Folate in Preventive Medicine: A new role in cardiovascular disease, Neural tube Defects and Cancer. *Ann Nutr. Metabol.* 1997; 41(6):331-343.
4. INCAP et al. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá. Oficina de Investigaciones Internacionales del los institutos nacionales de salud, Ministerio de Salubridad Pública. Evaluación Nutricional de la población de Centroamérica y Panamá-Costa Rica. INCAP U-28. Guatemala, 1969.
5. Ministerio de Salud, Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud, Caja Costarricense de Seguro Social, Ministerio de Educación. 2000. Desarrollo de Comunidades Centinela sobre Alimentación y Nutrición. San José, Costa Rica: Ministerio de Salud, 1999. ISBN 9967-62-099-1
6. Darnton H.I, Mora J.O, Weinstein H, Wilbur S and Nalubola P.R. Iron folate fortification in the Americas to prevent and control micronutrient malnutrition: An analysis. *Nutr. Rev* 1999; 57(1):25-31.
7. Tacsan L, Ascencio M. The Costa Rican Experience: Reduction of Neural Tube Defect following Food Fortifications Program. *Nutr. Rev* 2004; 62(6, Supl 2):S40-S43.
8. Jacques P.H, Selhub J, Boston A.G, Wilson PW. And Rosemberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total Homocysteine concentrations. *New Engl. J. Med.* 1999; 340(19):144-1454.
9. Martinez L, Limón C, Valdez R, Sánchez M.A, Villarreal J. Efecto de la administración semanal de ácido fólico sobre los valores sanguíneos. *Sal. Publ. Mex.* 2001; 43(2):103-107.
10. Jiménez Z, Mata C, Chabero S, Luna M.L. Uso de encuestas dietéticas para evaluar la ingesta de ácido fólico y su relación con los defectos del tubo neural. *Rev. Fac. Sal. Publ. Mex* 2001; 2(1):1-6.
11. Ford E, Ballew C. Dietary Folate intake in US adults: Finding from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Ethn and Dis.* 1998; 8(3):299-305.
12. Suárez del Rondero MP. Acido fólico: Nutriente redescubierto. *Acta Médica Costarricense.* 2003; 45(1):5-9.
13. Barboza Argüello MP, Umaña Solís LM. Impacto de la fortificación de alimentos con ácido fólico en los defectos del tubo neural en Costa Rica. *Rev Panam Salud Pública.* 2011; 30(1):1-6.