



Diseño y Construcción de Placa de Elución de Muestras Colectadas en Papel de Filtro

José Luis Arce Quintana, Efigenio Llanes, Nadiezhda Sánchez González,
Alexis Codina García, Gustavo Frías Figueroa

CENTRO DE INMUNOENSAYO

Ave 25 y calle 134. Aptdo 6653. Playa. C. Habana. Cuba. inchapa@cie.sld.cu

RESUMEN

En el desarrollo de los pesquisajes, especialmente en el caso de los neonatales, es muy común que las muestras se colecten en forma de sangre seca sobre papel de filtro, lo que hace imprescindible el empleo de una placa para eluir las muestras. Este trabajo describe el desarrollo y construcción de una placa de 96 pocillos para el empleo en la elución y transferencia automatizadas de muestras, en ensayos para pesquisajes neonatales que utilizan la técnica de papel de filtro. La placa se obtiene a través de la tecnología del termoconformado de láminas de PVC.

Palabras clave: Placas de reacción, pesquisajes neonatales, inmunoensayos.

Design and manufacturing of a plate for elution of blood samples as dried blood-spot on filter paper.

ABSTRACT:

In neonatal screening, the samples are often collected as dried blood-spot on filter paper. For that reason it is needful to use a microplate for samples elution. This article describes the design and manufacturing process of a microplate for automated elution and transfer of the blood samples in the paper filter disk punched. The microplate is obtained by means of thermoforming plastic foil technology. The paper includes a brief reference to the shapes and attributes of the designed moulds, and also the application of the experimental design techniques in order to find the appropriate thermoforming rate.

Keywords: Immunoassays, neonatals

1 INTRODUCCIÓN

Con el empleo de la técnica de papel de filtro para coleccionar las muestras de sangre en los pesquisajes neonatales, resulta indispensable el empleo de una placa o soporte para eluir las mismas. En los ensayos para pesquisaje neonatal del sistema ultramicroanalítico (SUMA) la elución se lleva a cabo en una placa microELISA, en cuyos pocillos se colocan los ponches que contienen las muestras de sangre seca. Posteriormente se añaden 70 µl de solución de elución o eluyente.

Después de la elución las muestras son sometidas a 1 hora de incubación a temperatura ambiente, lo cual provoca la pérdida por evaporación de parte del líquido contenido en los pozos. Esto, unido a la absorción de los ponches, hace que en muchas ocasiones el volumen de muestra eluida quede en 55 µl. De ese volumen deben cargarse, sin retirar el ponche del pocillo, 10 µl para transferir hacia la placa de reacción o lectura.

Los procesos de elución y transferencia se realizan manualmente, utilizando una pipeta multicanal. Los pozos de las placas microELISA que se utilizan para la elución tienen un diámetro de 7mm, lo cual

implica que un volumen de 55 μl alcanza 1.43 mm de altura de columna de líquido en placas de fondo plano y 2.57 mm para placas de fondo en U. Los ponches tienen un diámetro de 5 mm, aunque el contorno real puede variar en dependencia del corte del papel. Aún así, la variabilidad del tamaño de los ponches y la diferencia de absorción entre uno y otro es mínima. Por otra parte, pueden caer dentro del pozo en cualquier posición, de modo que no puede esperarse un comportamiento uniforme como se muestra en la fig. 1.

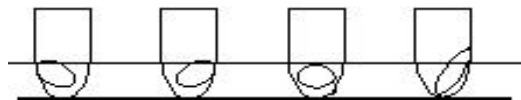


Fig.1 Comportamiento del ponche en el pocillo de la placa de elución

Conseguir que la elución y la transferencia de las muestras se realicen de manera automática significa evitar la intervención manual en dos de los procesos más laboriosos de estos ensayos. Pero este objetivo se complica, como en este caso, cuando la altura del volumen de muestra eluída es tan pequeña que el ponche interfiere en la correcta aspiración del volumen a transferir.

2 METODOLOGÍA

2.1 Solución geométrica

El proyecto de automatización de las fases de elución y transferencia de las muestras tendrá éxito si ambos procesos pueden realizarse sin interferencias. En otras palabras, si se logra cargar el volumen a transferir (10 μl) de un volumen de muestra eluída (55 μl) sin sustraer el ponche de papel de filtro. Para esto se concibió una placa de 96 pocillos donde cada uno de ellos posee una geometría formada por dos cavidades cilíndricas cónicas de distinto diámetro y que se solapan en la dirección de la mayor dimensión de la placa, fig. 2.

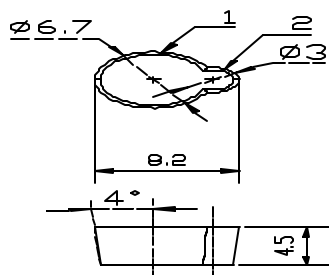


Fig.2 Geometría de los pocillos de la nueva placa

En la cavidad de mayor diámetro (1) se coloca el ponche de papel de filtro y en ella ocurre la elución. En la cavidad de menor diámetro (2) se produce la aspiración del volumen a transferir. De esta manera la elución y la aspiración ocurren en sitios diferentes evitando así que haya interferencia entre ambos procesos.

2.2 Factibilidad tecnológica

En esta etapa predomina el criterio de fabricar el soporte utilizando las tecnologías instaladas en la institución. Concretamente la variante escogida es la termoconformación, a partir de la existencia en el Centro de una máquina blistadora del tipo Compacker 10. Además hay existencias de dos tipos de láminas para termoconformación a base del polímero Cloruro de Polivinilo (PVC), cuyas características están recogidas en la bibliografía consultada [3]. Estas láminas son: PVC 135 y PVC

PH23-T3. Otro elemento influyente en la elección fue el bajo costo de esta variante respecto a otras como por ejemplo la inyección de plástico.

Aunque la relación profundidad (h)-diámetro (D) de las cavidades no está cercana a los valores críticos ($h \leq D$), existe sin embargo otro riesgo: El solapamiento de las cavidades hace que el espacio entre pocillos contiguos en cada fila de 12 se reduzca considerablemente, como puede apreciarse en la Fig. 3.

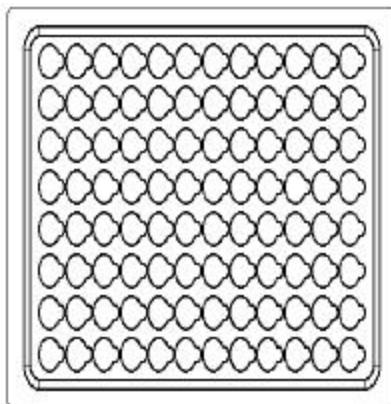


Fig.3 Vista superior de la placa

Esta situación complica la obtención de la geometría en la zona de transición entre pocillos contiguos de una misma fila, existiendo incluso la posibilidad de que queden comunicados, lo cual resulta inadmisibles.

Un elemento clave en el proceso de termoconformación lo constituyen los moldes. Los mismos se construyeron teniendo en cuenta las peculiaridades y exigencias de este diseño. Básicamente se componen de un contramolde y un molde, los cuales ocupan las cámaras superior e inferior respectivamente de la estación de termoconformación.

El molde negativo (fig. 4) posee las cavidades con la geometría que deben adoptar los pocillos y sobre todo los orificios a través de los cuales se evacua el aire que queda entre el molde y la lámina del polímero.

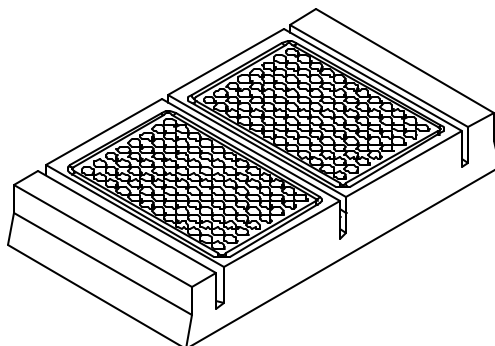


Fig. 4 Molde

El contramolde (**fig. 5**) por su parte, es positivo respecto al molde y contiene los agujeros por los cuales la presión de aire actúa sobre la lámina en estado termoplástico, haciendo que se copie la forma del molde.

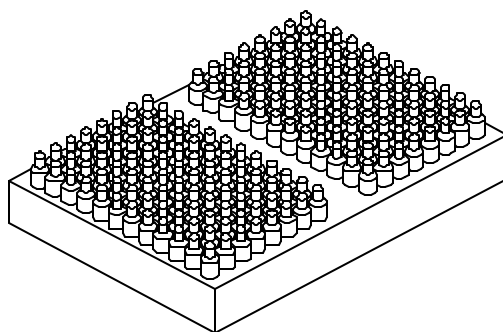


Fig. 5 Contramolde

La disposición de los agujeros de presión y evacuación de aire resulta clave en el proceso, por lo que estos deben situarse de manera que favorezcan la formación de las zonas de mayor complejidad geométrica

2.3 Tecnología de fabricación

En un proceso de termoconformado influyen un grupo de variables que es necesario controlar, pues determinan la calidad del producto final. La tecnología para un proceso de este tipo consiste, básicamente, en fijar los valores que tomarán las variables durante el proceso. En general, al aumentar la complejidad geométrica de los moldes, se requiere un régimen de termoconformado más exigente. En este caso las variables influyentes a controlar son:

- A: Temperatura de calentamiento del polímero.
- B: Temperatura de enfriamiento del molde
- C: Presión de aire
- D: Tipo de polímero

En la literatura pueden encontrarse algunas expresiones que permiten relacionar los parámetros de un proceso de esta índole [2]; sin embargo, no se ajustan a las condiciones concretas en que se fabrican las placas. Esto se debe al tiempo de explotación de la máquina en cuestión y las peculiaridades geométricas de los moldes. Por esto, en lugar de confiar en un régimen establecido mediante cálculos, se diseña un experimento con el fin de establecer el régimen de termoconformado adecuado para este caso.

2.3.1 Diseño del experimento

La investigación se inicia con un diseño fraccionario saturado del tipo 2_{IV}^{4-1} , tal como se describe en la literatura consultada [3], con el objetivo de hacer un primer análisis con todos los factores y un número de experiencias reducido. En la tabla I se muestra los niveles de los factores en el experimento.

Tabla I
Niveles de los factores

Factor	Tipo	Nivel bajo	Nivel alto
A	cuantitativo	393 ° K	423 ° K
B	cuantitativo	283° K	288° K
C	cuantitativo	6 bar	10 bar
D	cualitativo	PVC 135	PVC PH23-T3

Respuesta: se obtuvo a partir de una evaluación de la placa sobre la base de una escala continua de 0 a 2 unidades, donde el valor mínimo corresponde a la peor calidad. Los parámetros que definen la calidad de la placa son los siguientes:

Profundidad de los pocillos.
Radio de la unión paredes laterales-fondo.
Ondulación de la cinta de polímero.

Codificación de los factores: los niveles bajos se han representado por -1 y los niveles altos por 1 . Las relaciones entre los valores reales de los factores y su codificación son las siguientes:

$$A = \frac{T - 408}{288} \quad (1)$$

$$B = \frac{t - 285.5}{275.5} \quad (2)$$

$$C = \frac{P - 8}{2} \quad (3)$$

Donde T : temperatura de calentamiento del polímero ($^{\circ}$ K); t : temperatura de enfriamiento del molde ($^{\circ}$ K); P : Presión de aire (bar)

Generador: ABCD=1.

Modelo: lineal, incluye los factores individuales y las interacciones de segundo orden.

2.3.2 Resultados Experimentales

En la siguiente tabla aparecen los resultados de la primera fracción 2^3 del experimento realizado.

Tabla II
Resultados experimentales

Exp.	Factores				Resp.
	A	B	C	D	
1	-1	-1	-1	-1	0.9
2	1	-1	-1	1	1.1
3	-1	1	-1	1	0.2
4	1	1	-1	-1	1.6
5	-1	-1	1	1	0.5
6	1	-1	1	-1	1.9
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	1	1.5

El procesamiento de los datos se hizo empleando el paquete estadístico STATGRAPH. En la tabla III se muestran los efectos principales a partir de los datos de la primera fracción del experimento.

Tabla III
Efectos principales primera fracción 2³

Estimated effects for Respuesta

```

-----
average      = 1,0875
A:Tempcal    = 0,875
B:Tempenf    = -0,025
C:Presion    = 0,275
D:Material   = -0,525
AB+CD        = 0,075
AC+BD        = 0,075
AD+BC        = 0,075
-----

```

Al no disponer de la desviación estándar de las fluctuaciones inherentes al proceso, se realiza la interpretación subjetiva siguiente:

- Tanto las interacciones como el factor B no son influyentes.

En un nuevo análisis excluyendo las interacciones, se determina que el factor B no resulta significativo. El polinomio resultante es el siguiente:

$$Y = 1.09 + 0.44 \cdot A + 0.14 \cdot C - 0.26 \cdot D \quad (4)$$

Partiendo de que la respuesta más elevada se obtiene en la experiencia 6, se toma ese punto como base para experiencias posteriores. La nueva línea experimental tiene la dirección y el sentido del eje de temperatura (factor A), manteniendo la presión (C) en su nivel alto (10 bar) y utilizando PVC 135. Esto es equivalente a efectuar una regresión en la cual la variable independiente es la temperatura y la dependiente es la respuesta. Las experiencias se realizan aumentando la temperatura con un paso de 5 ° K. En la tabla IV se muestran los resultados de estos experimentos.

Tabla IV
Resultados experimentales

Temperatura (A)	Respuesta
428 ° K	1,9
433 ° K	1,9
438 ° K	2
443 ° K	1,8
448 ° K	1,5

La ecuación de regresión (R = 93,82 %) obtenida es la siguiente:

$$Y = -87.46 + 0.959 \cdot A - 0.026 \cdot A^2 \quad (5)$$

Esto indica que hay curvatura en esta zona y por tanto existe un valor de temperatura para el cual la respuesta toma su valor máximo.

2.3.3 Análisis de los resultados

Los experimentos realizados han permitido establecer los parámetros del régimen de termoconformado idóneo para la obtención de la placa. En la siguiente tabla se muestran los parámetros de este régimen.

Tabla V
Parámetros del régimen de termoconformado

Parámetro	Valor
Temperatura de calentamiento del polímero	438 ° K
Temperatura de enfriamiento de los moldes	*288 ° K
Presión de aire para el soplado	10 bar
Tipo de polímero	PVC 135

Este factor resultó ser intrascendente por lo que se fija este valor aplicando un criterio de ahorro energético.

3. DISCUSIÓN

Se propone una solución al problema que representa la automatización de los procesos de elución y transferencia de muestras cuando se emplea la técnica de papel de filtro. En este caso la solución se basa en una configuración geométrica peculiar de los pocillos de la placa de elución, la cual permite que puedan efectuarse ambos procesos sin interferencias. Su fabricación se realiza utilizando una tecnología bastante conocida y extendida, a la vez que resulta menos costosa que la variante de inyección de plástico.

4. CONCLUSIONES

Se ha obtenido una placa para elución y transferencia de muestras que permite materializar un proyecto de automatización de estas laboriosas etapas de los ensayos para pesquiasaje neonatal. La solución propuesta es relativamente sencilla y resulta factible tanto desde el punto de vista tecnológico como económico. La placa diseñada esta en proceso de solicitud de registro de patente de invención ante la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial (OCPI).

6. AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro sincero agradecimiento por la contribución al desarrollo de este trabajo a los compañeros: Alejandro García Pérez (CIE), Lianny Fernández Fernández (CIE), Grisell Turró Grau (DACC- CIE)

REFERENCIAS

- [1] E. Miller, "Introduction to plastics and composites", Ed. L. L. Faulkner. Marcel Dekker, NY 1996
- [2] Adolf Illig Maschinenbau GmbH & Co., "Documentation for the course: Working at Warm-Form-Machines". Heilbronn, Alemania, 1987
- [3] R. L. Planes *Diseño estadístico de experimentos*, Ed. Científico-Técnica, La Habana, 1988
- [4] J. P. Holman, "Experimental methods for engineers", Ed. J. J. Corrigan, E. Castellano, McGraw-Hill, New York, 1994