



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

ISSN: 0325-2957

ISSN: 1851-6114

actabioq@fbpba.org.ar

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Argentina

Cárdenas Delgado, Víctor Manuel; Nunez, Myriam; Núñez Taquia, Guillermo Gabriel
Validación de inmunoensayos en fase sólida
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 52, núm. 3, 2018, pp. 339-345
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53568423009>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

Validación de inmunoensayos en fase sólida

Validation of solid phase immunoassays

Validação de imunoensaaios em fase solida

- Víctor Manuel Cárdenas Delgado^{1a}, Myriam Nuñez^{1b},
Guillermo Gabriel Nuñez Taquia^{1a}

¹ Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

^a Laboratorio Mantel-MANLAB. Sección Virología y Autoinmunidad. Marcelo T. de Alvear 2263 (1122), Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

^b Cátedra de Matemática. Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA. Junín 954 (1113), Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

Resumen

La determinación del nivel de anticuerpos por medio de ensayos ELISA exige construir una curva de calibración según el modelo logístico de 4 parámetros (4PL); no obstante, es común que el bioquímico realice estimaciones y ajuste los datos de calibración con modelos alternativos. Se buscó determinar para un ensayo ELISA semicuantitativo el modelo que mejor ajusta los datos de calibración y cuál de los modelos alternativos explorados genera menor error relativo porcentual (ERP) al predecir las concentraciones de los calibradores. Para esto se empleó un ELISA indirecto y se ajustaron las densidades ópticas (DO) de los calibradores según los modelos i) exponencial ii) Boltzmann iii) Boltzmann semi log iv) Deming v) regresión lineal vi) 4PL vii) cuadrático. Se encontró que el mejor ajuste lo proveen los modelos v) ($R^2=0,9914$), i) ($R^2=0,9652$) y iii) ($R^2=0,9650$). Sin embargo, los modelos i) y iii) tienen mejor desempeño en el procedimiento de ajuste inverso: el ERP se mantuvo $\leq 20\%$ en el rango cubierto por los 6 calibradores (0-100 UI/mL). Los modelos lineales iv) y v) presentaron ERP elevados en el rango testado. En resumen, el ajuste exponencial i) y el ajuste de Boltzmann iii), combinan valores de R^2 y ERP comparables al modelo 4PL, por lo cual es inapropiado cualquier tipo de ajuste lineal.

Palabras clave: calibración * ELISA semicuantitativo * inmunoensayo * modelo logístico * modelo lineal * validación * comparación * ajuste inverso * error relativo * estimación

Abstract

Determination of the levels of specific antibodies by semiquantitative ELISAs requires the construction of a 4 parameter logistic regression (4PL) calibration curve. However, alternative models are often employed to adjust and estimate calibration data. The aims of this work were to determine the model that best adjusts calibration data, and which alternative model generates a lower relative percentage error (RPE) in the prediction of calibrator concentrations. An IgA anti-gliadin ELISA was used. The optical density values (OD) of calibrators were adjusted with the following mathematical models: i) Exponential, ii) Boltzmann, iii) Boltzmann semilog, iv) Deming, v) Linear regression, vi) 4PL, and vii) Quadratic. Results indicated that the

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

best adjustment is given by models v) ($R^2=0.9914$), i) ($R^2=0.9652$) and iii) ($R^2=0.9650$). However, models i) and iii) performed better in the reciprocal adjustment procedure: RPE values were $\leq 20\%$ for all the calibrator levels analyzed (0-100 IU/mL). The linear models iv) and v) had high RPE values. To sum up, the exponential (i) and Boltzmann (iii) adjustments present R^2 and RPE values similar to those of the 4PL, the use of any linear adjustment being inappropriate.

Keywords: calibration * semiquantitative ELISA * immunoassay * logistic model * linear model * validation * comparison * reciprocal adjustment * relative error * estimation

Resumo

A determinação do nível de anticorpos por meio de ELISA requer a construção de uma curva de calibração de acordo com o modelo logístico de 4 parâmetros (4PL); no entanto, é comum o bioquímico fazer estimativas e ajustar os dados de calibração com modelos alternativos. Procurou-se determinar para um ensaio ELISA de modelo semiquantitativo o modelo que melhor se ajusta os dados de calibração e qual dos modelos alternativos explorados gera menor erro relativo percentual (ERP) ao prever as concentrações dos calibradores. Para isso, um ELISA indireto foi utilizado e se ajustaram as densidades ópticas (DO) dos calibradores segundo os modelos i) exponencial ii) Boltzmann iii) Boltzmann semi log iv) Deming v) regressão linear iv) 4PL vii) quadrático. Verificou-se que o melhor ajuste é fornecido pelos modelos v) ($R^2= 0,9914$), vi) ($R^2= 0,9652$) e iii) ($R^2= 0,9650$). No entanto, os modelos i) e iii) têm melhor desempenho no procedimento de ajuste inverso: o ERP permaneceu $\leq 20\%$ na faixa coberta pelos 6 calibradores (0-100 UI/mL). Os modelos lineares iv) e v) apresentaram alto ERP na faixa testada. Em resumo, o ajuste exponencial i) e o ajuste de Boltzmann iii) combinam valores de R^2 e ERP comparáveis ao modelo de 4PL, sendo inadequado qualquer tipo de ajuste linear.

Palavras-chave: calibração * ELISA semiquantitativa * imunoensaio * modelo logístico * modelo linear* validação * comparação * ajuste inverso * erro relativo * estimativa

Introducción

La determinación del nivel de anticuerpos por medio de ELISA semicuantitativos es un recurso diagnóstico útil en el área de serología y autoinmunidad. La robustez, sencillez en la ejecución y versatilidad de la técnica ha permitido su empleo en el estudio de una variedad de enfermedades infecciosas y autoinmunes, adaptando su formato a ensayos de captura para determinar antígenos/anticuerpos que se encuentran en muy bajo título o bien a variantes de ensayos competitivos (1). Este método exige, una vez culminada la etapa analítica, ajustar los valores de densidad óptica (DO) de los calibradores a una curva de calibración que permita interpolar las DO de las muestras para, de esta manera, determinar el nivel de anticuerpos específicos o antígenos en cada una de ellas (2) (3). Por este motivo, en los reactivos que se comercializan, se recomienda el ajuste de los datos según un modelo no lineal para generar la curva de calibración que mejor describe la relación entre el nivel de los calibradores y la respuesta; no obstante, en la práctica diaria –para simplificar los cálculos– es común que el bioquímico realice estimaciones y ajuste los datos de calibración a modelos alternativos cuyo desempeño no es óptimo.

Al aplicar algunos de esos modelos alternativos se podría asumir erróneamente, por ejemplo, que existe una

relación lineal entre las variables con que se construye la curva de calibración. Por el contrario, usualmente la relación entre la respuesta y el nivel de analito es sigmoidea, dando lugar a una curva estándar con un punto de inflexión en torno al cual existe simetría (4). El ajuste adecuado en la mayoría de los casos lo provee entonces el modelo logístico de 4 parámetros (4PL) o a lo sumo de 5 parámetros, si la distribución de las DO de los calibradores sugiere que no hay simetría (5). Si bien se han propuesto otros modelos no lineales para reemplazar el modelo 4PL, no solo no puede asegurarse que su desempeño sea satisfactorio en todo el rango de niveles cubierto por los calibradores –especialmente al determinar niveles muy altos o muy bajos de analito–, sino que además muchos no describen adecuadamente la tendencia de los datos experimentales (6).

Por todo lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue determinar, para un ELISA semicuantitativo: **1)** Cuál de los siete modelos alternativos evaluados ajusta mejor los datos de calibración, basando la calidad del ajuste en el valor del coeficiente de correlación (R^2), y **2)** cuáles de estos modelos alternativos genera menor error relativo porcentual (ERP) al predecir las concentraciones de los calibradores. Con este fin se comparan sus concentraciones nominales con aquellas obtenidas al interpolar la DO en cada uno de los modelos (procedimiento de ajuste inverso).

Materiales y Métodos

Se empleó un ELISA para medir el nivel de anticuerpos anti-gliadina de clase IgA (6 calibradores: calibrador A=0 UI/mL, B=6,25 UI/mL, C=12,5 UI/mL, D=25 UI/mL, E=50 UI/mL, F=100 UI/mL; ORGENTEC Diagnostika GmbH) y se ajustaron las DO de los calibradores según los modelos: i) Exponencial ii) Boltzmann iii) Boltzmann semi log iv) Deming v) Regresión lineal vi) 4PL vii) Cuadrático.

Se determinó el nivel de anticuerpos de cada punto de calibración por triplicado. En los modelos **i**), **iii**), **vi**) y **vii**) se efectuó una transformación logarítmica del nivel de anticuerpos anti-gliadina IgA (en UI/mL) declarados en los calibradores antes de representar la curva estándar. Para el procedimiento de ajuste inverso se compararon la concentración predicha (CP) con la concentración nominal (CN) de los calibradores y se calculó el error relativo % ($ERP = (CN - CP) / CN * 100$). Se considera tolerable un desvío de $ERP \leq 10\%$ en las CP. Todos los ELISA se realizaron de forma automatizada con el instrumento ALISEI (Radim Diagnostics). El análisis de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism v4.03 (GraphPad Software, Inc.).

Resultados

El fabricante del reactivo recomienda ajustar los datos de calibración según el modelo logístico de 4 parámetros (Fig. 1). En este estudio se exploran las posibles consecuencias del empleo de modelos matemáticos alternativos en el procedimiento de calibración. Así, en el panel de la Fig. 2 se aprecian las curvas estándar ($n=3$, se grafican las medias y el desvío estándar) generadas por los modelos **i**) a **vii**) al procesar las DO de los calibradores y sus correspondientes concentraciones. La Tabla I resume los hallazgos al efectuar el ajuste inverso, se muestran las medias ($n=3$) únicamente. Todo punto de calibración cuya concentración predicha presenta un $ERP \geq 10\%$ se destaca en negrita. Para cada uno de los ajustes, se compara la concentración predicha (CP) con la concentración nominal (CN) de los calibradores y se calcula el ERP. Considerando como tolerable un

$$Y = D + \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)}$$

Figura 1. Ecuación del modelo logístico de 4 parámetros.

Y representa la respuesta, D es la respuesta cuando la concentración de analito tiende al infinito, A es la respuesta cuando la concentración de analito es igual a cero, x es la concentración de analito, C es el punto de inflexión de la curva de calibración y B es un factor relacionado con la pendiente.

$ERP \leq 10\%$ del valor nominal, se representó dicho intervalo de aceptación en línea punteada en el panel de la Figura 3, agrupando en las Figuras A y B los ERP vs. CN para evaluar el desempeño de los siete modelos en todo el rango de niveles de los calibradores y así facilitar la interpretación.

Según el criterio basado en el coeficiente de correlación, se encontró que el mejor ajuste lo proveen los modelos **v**) ($R^2=0,9914$); **i**) ($R^2=0,9652$) y **iii**) ($R^2=0,9650$); el modelo **vi**) tomado como referencia presentó un $R^2=0,9650$.

Sin embargo, para este ensayo, los modelos **i**) y **iii**) tienen mejor desempeño en el procedimiento de ajuste inverso: en el caso en estudio, para el modelo **i**) los errores relativos porcentuales (ERP) fueron $\leq 10\%$ (0,52-9,27%), y para el modelo **iii**) el ERP se mantuvo $\leq 15\%$ (1,13-11,51%) con un solo calibrador cuyo $ERP \geq 10\%$ para la determinación de concentraciones en el rango de niveles del ensayo (0-100 UI/mL). Los modelos lineales **iv**) y **v**) presentaron $ERP \leq 20\%$ en el rango ensayado, pero dos calibradores (C y D) presentaron $ERP \geq 10\%$. El modelo **vi**), tomado como referencia presentó un $ERP \leq 10\%$ (1,13-8,9%).

Discusión y Conclusiones

Mediante la técnica de ELISA solo se puede realizar la determinación semicuantitativa de los niveles de anticuerpos. Esta última es una limitación conocida de este tipo de ensayos. No obstante, en este estudio se siguieron las recomendaciones del fabricante del reactivo, realizando el tratamiento de los datos de calibración como si se trabajase con un método cuantitativo. Otra limitación inherente a estos inmunoensayos es la falta de pasos previos de extracción del analito de la matriz en que se encuentra. Así, la especificidad de la medida reposa en la interacción antígeno-anticuerpo (6) y la posibilidad de reacciones cruzadas (7). Además, no existe consenso acerca de cuál es la descripción matemática más adecuada de los datos de calibración, sino que existen ciertas recomendaciones para llevar a cabo el tratamiento de los datos. Esto último obliga al profesional bioquímico a prestar especial atención cuando decide validar o rechazar los resultados derivados de un ensayo de este tipo.

A partir del análisis presentado se puede concluir que el ajuste exponencial (**i**) y el ajuste de Boltzmann (**iii**), ambos con transformación logarítmica del nivel de anticuerpos, combinan valores de R^2 y ERP comparables al modelo 4PL (**vi**), tomado como referencia y que es el recomendado por el fabricante del reactivo. Considerado individualmente, se confirma que un valor alto y cercano a la unidad en el coeficiente de correlación de la curva estándar es insuficiente como requerimiento para garantizar la exactitud del ajuste (3), y es necesario recurrir

Tabla 1. Se indica la concentración nominal (CN) de cada uno de los calibradores. Para cada modelo, la concentración predicha (CP) y el error relativo (ER%) permiten evaluar la calidad del ajuste. Los valores de ER% ≥ 10% figuran resaltados en negrita. Boltzmann': ajuste de Boltzmann con transformación logarítmica del nivel de anticuerpos. NA: no aplica.

Calibrador	CN (UI/mL)	Exponencial		Boltzmann		Boltzmann'		Deming		Regresión lineal		4PL		Cuadrático	
		CP (UI/m)	ER%	CP	ER%	CP	ER%	CP	ER%	CP	ER%	CP	ER%	CP	ER%
A	0		NA		NA		NA		NA		NA		NA		NA
B	6,5	7,10257	9,27	7,37736	13,49	7,24842	11,51	6,28461	-3,31	6,28435	-3,31	6,621	1,86	9,117824	40,27
C	12,5	12,8586	2,86	13,6403	9,12	12,9925	3,94	14,1877	13,5	14,18756	13,5	12,99255	3,94	13,06805	4,54
D	25	24,3370	-2,65	25,0115	0,04	24,3318	-2,67	27,8466	11,38	27,84661	11,38	24,33175	-2,67	21,37267	-14,5
E	50	49,7374	-0,52	48,8703	-2,25	49,4322	-1,13	53,6591	7,31	53,65932	7,31	49,43204	-1,13	43,77121	-12,45
F	100	91,125	-8,87	90,237	-9,76	91,091	-8,9	97,2480	-2,75	97,24873	-2,75	91,091	-8,9	95,765	-4,23

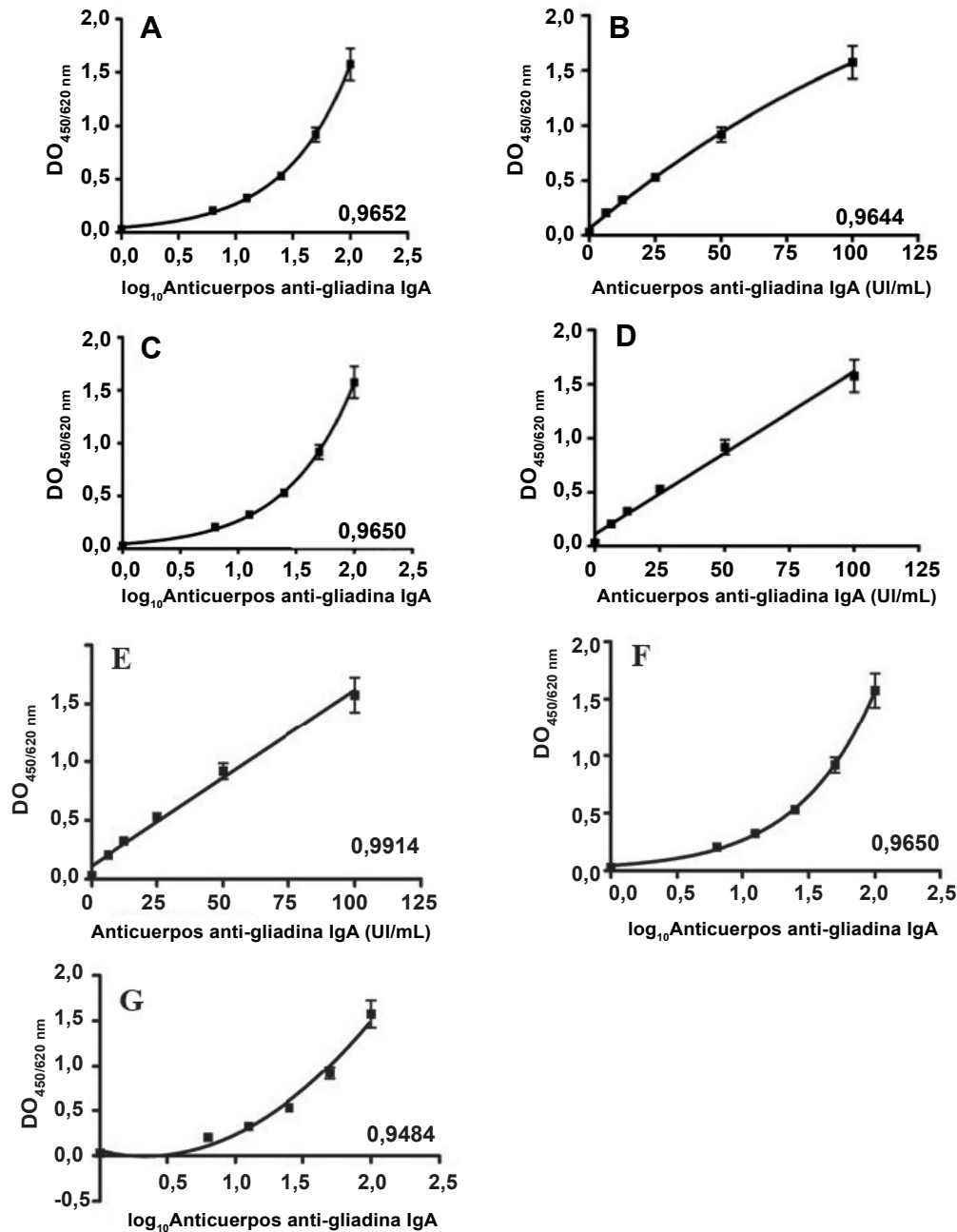


Figura 2. Curvas de calibración generadas por los ajustes

A) Exponencial B) Boltzmann C) Boltzmann con transformación logarítmica del nivel de anticuerpos D) Deming E) Regresión lineal F) Logístico de 4 parámetros G) Cuadrático. Se grafican las medias y desvío estándar (n=3), indicando el valor del R² en la esquina inferior derecha de cada curva de calibración. No aplica para la curva de calibración D).

a criterios adicionales. Entre estos, además de la reproducibilidad, se considera conveniente minimizar el valor del ERP en las concentraciones de los calibradores estimadas a través del procedimiento de ajuste inverso (4) (8). En este trabajo se consideró tolerable una desviación <10% en el ERP, condición satisfecha por los modelos **i**) y **vi**). Por otro lado, los ajustes lineales **iv**) y **v**) presentaron dos calibradores con ERP ≥10% y el mo-

delo cuadrático generó tres puntos fuera del rango de aceptación. Es de destacar que si bien los ajustes lineales exhiben valores altos del estadístico R², hay inconsistencia con los valores inaceptablemente altos de ERP para el tercer y cuarto punto de calibración, tal como muestra la Tabla I.

En endocrinología se ha estudiado extensamente la aplicación de distintos modelos matemáticos en la

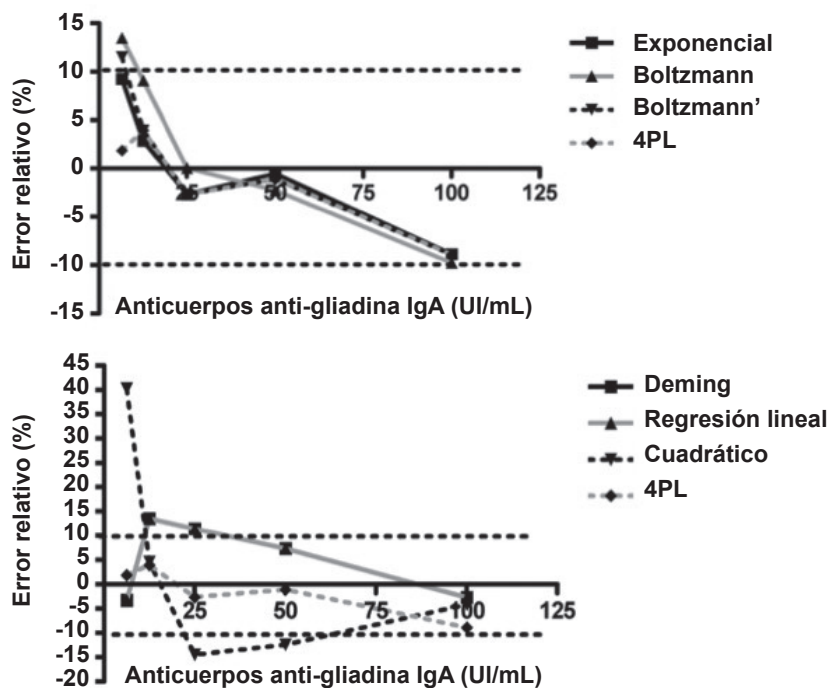


Figura 3. Valores de error relativo porcentual

(ERP) representados en función de cada nivel de calibrador para los siete ajustes alternativos ensayados, agrupados en los gráficos A y B según la leyenda a la derecha. La línea punteada representa los límites tolerables de ERP ($ERP \leq 10\%$).

técnica de radioinmunoanálisis (RIA) para cuantificar analitos presentes en concentraciones muy bajas en muestras biológicas. Estos modelos fuerzan la linealidad de los datos de calibración por medio de transformaciones en las escalas (9). Por el contrario, el enfoque del desarrollador del reactivo utilizado en este trabajo apunta a no extender esos criterios a las calibraciones de los ensayos ELISA, sino respetar la tendencia de los datos y usar el modelo que mejor los describe. Una de las ventajas de este estudio consiste en usar los niveles de los calibradores declarados o nominales en el análisis de ajuste inverso en lugar de diluciones seriadas de un estándar de concentración conocida (3), lo que elimina la posibilidad de introducir errores experimentales que dificulten la interpretación. Con respecto a la descripción de los calibradores por el modelo 4PL es esperable que la matriz de los calibradores no sea idéntica a la matriz de las muestras biológicas a analizar en cuanto a su composición, ya que es posible que los calibradores contengan conservantes, colorantes, entre otros aditivos no declarados. En este trabajo se asumió que la diferencia es mínima y la matriz de los calibradores es suficientemente representativa del suero humano de manera que sería válido extender las conclusiones del ajuste inverso a lo que ocurriría al procesar las muestras incógnitas.

Por lo tanto, y según los resultados presentados, el reemplazo del modelo 4PL sólo es adecuado si se utili-

za el modelo exponencial o a lo sumo Boltzmann y es inapropiado cualquier otro tipo de ajuste lineal o no lineal. El análisis presentado en este trabajo se simplifica notablemente en los instrumentos modernos que ejecutan ensayos ELISA de manera automatizada, ya que incorporan datos del ajuste inverso y estadísticos para cada curva de calibración y los ponen a disposición del operador al finalizar la corrida. Por otro lado, se espera que el avance en el desarrollo de programas de análisis facilite la implementación de rutina del modelo 5PL (10) si fuese necesario representar una curva asimétrica en lugar del modelo 4PL (11) (12). En resumen, la aplicación de este breve análisis brinda al bioquímico herramientas para tomar la decisión más acertada antes de validar un inmunoensayo de estas características y prevenir la introducción de errores sistemáticos en su rutina diaria.

CORRESPONDENCIA

Dr. VÍCTOR M. CÁRDENAS DELGADO

Laboratorio Mantel-MANLAB

Sección Virología y Autoinmunidad

Marcelo T. de Alvear 2263

1122 CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, Argentina

Tel: 011-60090537

E-mail: victor.cardenas@manlab.com.ar

Referencias bibliográficas

1. Gan SD, Patel KR. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol* 2013 Sep; 133 (9): 1-3.
2. Dudley RA, Edwards P, Ekins RP, Finney DJ, McKenzie IG, Raab GM, *et al.* Guidelines for immunoassay data processing. *Clin Chem* 1985 Aug; 31 (8): 1264-71.
3. Plikaytis BD, Turner SH, Gheesling LL, Carlone GM. Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitate *Neisseria meningitidis* group A polysaccharide antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 1991 Jul; 29 (7): 1439-46.
4. Findlay JW, Dillard RF. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *AAPS* 2007 Jun 29; 9 (2): 260-7.
5. Cumberland WN, Fong Y, Yu X, Defawe O, Frahm N, De Rosa S. Nonlinear calibration model Choice between the Four and Five-Parameter Logistic Models. *J Biopharm Stat* 2015; 25 (5): 972-83.
6. Findlay JW, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, *et al.* Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal* 2000 Jan; 21 (6): 1249-73.
7. Cho HJ, Gale SP, Masri SA, Malkin KL. Diagnostic specificity, sensitivity and cross-reactivity of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against *Leptospira interrogans* serovars pomona, sejroe and hardjo in cattle. *Can J Vet Res* 1989 Jul; 53 (3): 285-9.
8. Shah VP, Midha KK, Findlay JW, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ. Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. *Pharm Res* 2000 Dec; 17 (12): 1551-7.
9. Rodbard D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin Chem* 1974 Oct; 20 (10): 1255-70.
10. Gottschalk PG, Dunn JR. The five-parameter logistic: a characterization and comparison with the four-parameter logistic. *Anal Biochem* 2005 Aug 1; 343 (1): 54-65.
11. Karpinski KF, Hayward S, Tryphonas H. Statistical considerations in the quantitation of serum immunoglobulin levels using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Immunol Methods* 1987 Nov 5; 103 (2): 189-94.
12. Tiede JJ, Pagano M. The application of robust calibration to radioimmunoassay. *Biometrics* 1979; 35: 567-74.

Recibido: 1 de noviembre de 2017

Aceptado: 10 de mayo de 2018