



Ajustes alternativos sobre la distribución de datos en ELISAs comerciales.

MANLAB[®]
Diagnóstico Bioquímico y Genómico

>>> MANLAB nos presenta un interesante trabajo donde se evalúan distintos modelos para ajustar los datos de calibración y cuáles de estos modelos alternativos generan menor error relativo porcentual (ERP) para ELISA semicuantitativo.

>>> AUTORES

Víctor Manuel Cárdenas Delgado

Doctor de la Universidad de Buenos Aires
Laboratorio Mantel-MANLAB. Sección Virología y Autoinmunidad

Myriam Nuñez

Doctor de la Universidad de Buenos Aires
Cátedra de Bioestadística. Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA.

Guillermo Gabriel Nuñez Taquia

Doctor de la Universidad de Buenos Aires
Laboratorio Mantel-MANLAB. Sección Virología y Autoinmunidad

>>> CORRESPONDENCIA:

Víctor M. Cárdenas Delgado

Laboratorio Mantel-MANLAB. Sección Virología y Autoinmunidad. Marcelo T. de Alvear 2263 (1122), Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.
E-mail: victor.cardenas@manlab.com.ar

>>> 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 haga 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 (4 PL) (Fig. 1) 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 es determinar, para un ELISA semi-cuantitativo: 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).

>>> **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.

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

>>> 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´ iv) Deming v) Regresión lineal vi) 4 PL 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 compara la concentración predicha (CP) con la concentración nominal (CN) de los calibradores y se calcula 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 software GraphPad Prism v4.03 (GraphPad Software, Inc.).

>>> RESULTADOS

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.

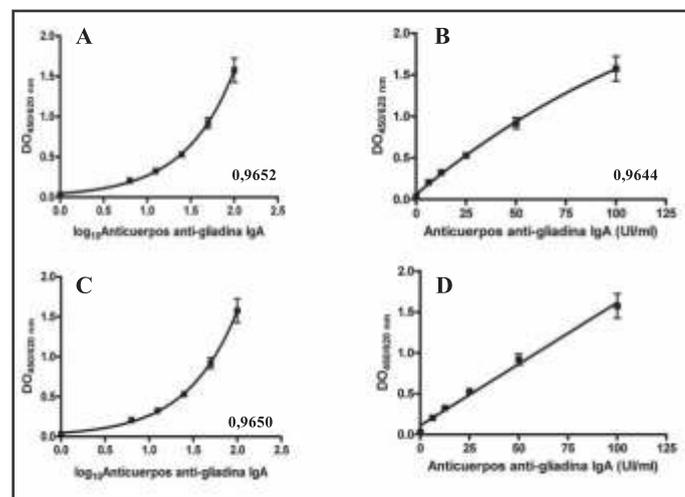
Considerando como tolerable un ERP $\leq 10\%$ del valor nominal, se representó dicho intervalo de aceptación en línea punteada en el panel de la Fig. 3, agrupando en las figuras A y B los ERP vs. CN para evaluar el desempeño de los siete modelos en todo el rango de niveles de los calibradores y así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

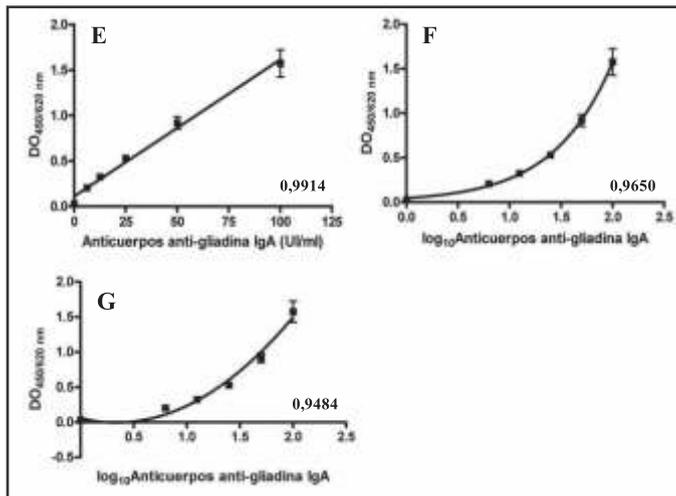
Según el criterio basado en el coeficiente

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 $R^2=0,9650$.

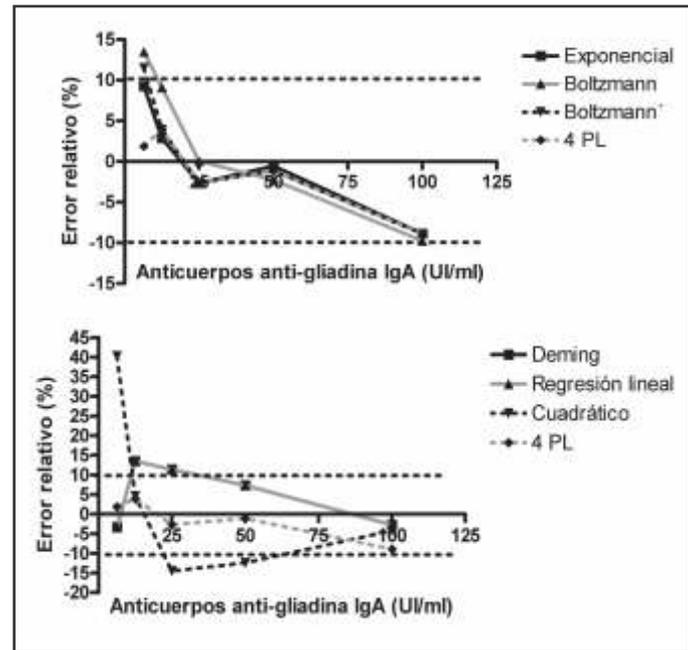
Sin embargo, para este ensayo, los modelos i) y iii) tienen mejor desempeño en el procedimiento de ajuste inverso: en el caso en estudio, para el modelo i) los errores relativos porcentuales (ERP) fueron $\leq 10\%$ (0,52-9,27%), y para el modelo iii) el ERP se mantuvo $\leq 15\%$ (1,13-11,51%) con un 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%).

>> **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).





>>> **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%).



>>> DISCUSIÓN

Mediante ELISA solo se puede realizar la

GEMATEC
equipamiento para medicina



Int. Avalos 3651 | (1605) | Munro
Buenos Aires, Rep. Argentina
Tel./Fax: (54 11) 4512 5666

✉ ventas@gematec.com.ar
🌐 www.gematec.com.ar
📘 @Gematecarg

>> 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		4 PL		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	-

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 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 4 PL (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 a criterios adicionales. Entre éstos, 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 modelo cuadrático generó tres puntos fuera del rango de aceptación. Es de destacar que si bien los ajustes lineales exhiben valores altos del estadístico R^2 , hay inconsistencia con los inaceptablemente altos valores de ERP para el tercer y cuarto punto de

calibración, tal como muestra la tabla 1.

En endocrinología se ha estudiado extensamente la aplicación de distintos modelos matemáticos en la 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 ELISAs, sino respetar la tendencia de los datos y usar el modelo que mejor los describe. Una de las ventajas de nuestro 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 standard 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 4 PL sólo es adecuado si se utiliza 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 ELISAs 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 4 PL (11, 12). En resumen, creemos que 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.

>>> 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, Rodbard D, Rodgers RP. 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, Khan MN, Bowsheer RR. 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):285-289.
- 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 The five-parameter logistic: a characterization and comparison with the four-parameter logistic. *Anal Biochem* 2005 Aug 1; 343(1):54-65.
- 11-,, 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; 35:567-574.