

Automatización en el laboratorio de autoinmunidad: cómo garantizar la confiabilidad de los resultados

MANLAB®

Diagnóstico Bioquímico y Genómico

 9 min.



La constante búsqueda de innovación en el laboratorio bioquímico lleva a incorporar equipos de la más alta tecnología en las diferentes secciones. Este es el caso que se presentó con la adquisición del equipo ALEGRIA (ORGENTEC Diagnostika GmbH) para la sección de Inmunoserología y Autoinmunidad del laboratorio MANLAB, con el que se logró automatizar un gran número de

ELISA manuales. Con el objeto de garantizar la exactitud y confiabilidad de los resultados obtenidos, en el siguiente trabajo MANLAB nos presenta el análisis comparativo entre estos métodos alternativos.



Cárdenas Delgado¹,
V.M.; Rodríguez, V.;
Ferrería, M.;
Longo, I.;
Monti, F.;
Armanini, P.;

Nuñez Taquia², G.G.

¹ Bioquímico. Doctor de la UBA.

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

² Bioquímico. Doctor de la UBA.

E-mail: guillermo.nunez@manlab.com.ar

Área Inmunoserología y Autoinmunidad

MANLAB



Introducción

En el laboratorio de autoinmunidad, y

 **BD Vacutainer®**

Líder en Soluciones Preanalíticas

Calidad y Bioseguridad:
Su interés y nuestro compromiso

Para contactarse, llámenos al: 0800-444-55BD (23)
o escribanos a: vacutainer@bd.com



para una misma determinación, es frecuente encontrarse con la necesidad de tener que alternar entre distintas marcas de reactivos comerciales de ELISA o entre métodos manuales, semiautomatizados o automatizados, debido a circunstancias relacionadas con la importación de reactivos. Este requerimiento le impone al bioquímico la necesidad de adaptarse al cambio para así continuar satisfaciendo las exigencias del sector donde se desempeña.

Por otro lado, la constante búsqueda de innovación lleva a incorporar equipos de la más moderna tecnología a todas las secciones, lo que plantea, una vez más, un desafío al profesional encargado de validar el reemplazo de las tradicionales técnicas manuales por aquellas que ejecutan los nuevos instrumentos de manera totalmente automatizada. Este es el caso que se presentó con la adquisición del equipo ALEGRIA (ORGENTEC Diagnostika GmbH) para la sección de Inmunoserología y Autoinmunidad del laboratorio MANLAB, con el que se logró automatizar un gran número de ELISA manuales. Este instrumento es capaz de procesar muestras que tienen una variedad de peticiones en simultáneo y en pocos minutos y con mínima intervención del operador, agilizando notablemente la entrega de resultados.

En este contexto, y para garantizar la exactitud y confiabilidad de los resultados, resultó de sumo interés realizar el análisis comparativo entre estos métodos alternativos (técnicas manuales de ELISA vs. ELISA automatizado por ALEGRIA) con el fin de:

- 1) establecer el grado de correlación y concordancia que existe entre ellos y
- 2) definir si es correcto sustituir uno en ausencia del otro.

Métodos

En el presente estudio se compararon:

- a) la determinación de anticuerpos del isotipo IgA anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) por un método de ELISA manual (Biosystems SA) vs. el método automatizado ALEGRIA (ORGENTEC Diagnostika GmbH);
- b) la determinación de anticuerpos anti-factor intrínseco (AFI) IgG por método de ELISA manual (ORGENTEC Diagnostika

GmbH) vs. el método automatizado ALEGRIA (ORGENTEC Diagnostika GmbH);

- c) la determinación de anticuerpos anticardiolipinas totales (CDT) por método de ELISA manual (ORGENTEC Diagnostika GmbH) vs. el método automatizado ALEGRIA (ORGENTEC Diagnostika GmbH).

El grado de correlación se analizó según el coeficiente de Pearson, mientras que el grado de concordancia de los resultados generados por ambos métodos se evaluó mediante el análisis de Bland-Altman. En todos los casos se tuvo en cuenta el valor de corte de cada ensayo de ELISA (ASCA, AFI y CDT) para definir si las diferencias en los resultados que se comparan son o no clínicamente aceptables.

Resultados y discusión

Del análisis de muestras de pacientes procesadas en paralelo por ambos métodos se obtuvieron las siguientes características:

- Para la condición a) se obtuvo una correlación significativa (Pearson $r=0,9885$, $P<0.0001$, $R^2=0,9771$, $n=24$) con una concordancia clínicamente aceptable (Análisis de Bland-Altman: sesgo=2.5, DS=1.26, límites de concordancia 95%=0.1-4.9 UI/ml)
- Para la condición b) se obtuvo una correlación significativa (Pearson $r=0,9052$, $P<0.0001$, $R^2=0,8195$, $n=24$) con una concordancia clínicamente aceptable (Análisis de Bland-Altman: sesgo=0,635510, límites de concordancia 95%=-0,221960-1,49298 UI/ml).
- Para la condición c), se obtuvo una correlación significativa (Pearson $r=0,7818$, $P<0.0001$, $R^2=0,6112$, $n=24$) con una concordancia clínicamente aceptable (Análisis de Bland-Altman: sesgo= 2,90909, límites de concordancia 95 % = 0,451424-5,36676 UI/ml).

Las muestras de los pacientes evaluadas por los dos métodos en las condiciones a) b) y c) arrojaron valores esencialmente similares. Si bien los coeficientes de correlación presentaron valores elevados recomendamos extender el análisis a series con mayor número de muestras de pacientes testeadas en paralelo.

En términos operativos, el equipo

ALEGRIA simplificó notablemente el ensayo y redujo los tiempos de procesamiento al evitar el manipuleo de la placa para su carga, lavados y lectura en espectrofotómetro. Globalmente, las condiciones del test resultaron más estables y reproducibles que en los ensayos manuales al garantizar el instrumento un mejor control sobre las temperaturas y los tiempos de incubación. Asimismo, la interpolación en una curva de calibración, algoritmo de cálculo e interpretación del resultado se realizó de manera totalmente automatizada.

Se observó una pequeña discrepancia en los valores obtenidos entre ambos métodos, la que se podría atribuir a diferencias en la metodología, particularmente el tiempo de detención de la reacción enzimática y la lectura e interpolación de los resultados son factores a tener en cuenta al evaluar estas diferencias. El instrumento ALEGRIA efectúa una lectura de absorbancia a $\lambda=650$ nm a un tiempo estipulado, sin detener el desarrollo de color del sustrato e interpolando en una curva de calibración almacenada en la memoria del equipo. Por otro lado, las técnicas manuales implican el agregado final de una solución de ácido a las muestras y calibradores de manera tal que se produce un viraje que detiene el desarrollo de color de sustrato a los 15 minutos, permitiendo medir la absorbancia a $\lambda=450/620$ nm. Considerando el error experimental en el tiempo de detención, los volúmenes agregados manualmente, sumado a la interpolación en una curva de calibración de 6 puntos leída en paralelo a las muestras de pacientes, es esperable que los valores obtenidos por ambos métodos para cada paciente no sean idénticos. Afortunadamente, estas diferencias son cuantitativamente importantes sólo a valores que estén muy por encima del punto de corte, de manera que no afectaron la interpretación de los resultados.

Conclusión

En resumen, se puede afirmar que es correcto el reemplazo de los métodos manuales ELISA por el sistema totalmente automatizado ALEGRIA para la detección de los analitos estudiados ya que no sólo existe correlación sino que las diferencias en la cuantificación son tolerables desde el punto de vista clínico.



Analizador Multiparamétrico Totalmente automatizado

CHORUS TRIO



- Dispositivo individual de un solo uso que contiene todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo.
- Capacidad multiparamétrica: Procesa hasta 30 diferentes pruebas por corrida.
- La velocidad permite obtener resultados simultáneos de diferentes paneles.
- El primer resultado se obtiene antes de 90 minutos.
- Volumen de muestra:
La muestra se dispensa manualmente.
ELISA: Mínimo de muestra 60 uL.
Fijación de complemento: Mínimo de muestra 120 uL.

Enfermedades Infecciosas

Adenovirus IgG	Legionella Pneumophyla 1-6 IgG
Adenovirus IgA	Measles IgG
Chlamydia Pneumoniae IgG	Measles IgM
Chlamydia Pneumoniae IgM	Mycoplasma Pneumoniae IgA
Chlamydia Pneumoniae IgA	Mycoplasma Pneumoniae IgG
Cytomegalovirus IgG	Mycoplasma Pneumoniae IgM
Cytomegalovirus IgG Avidity	Mumps IgG
Cytomegalovirus IgM	Mumps IgM
Epstein-Barr VCA IgG	Respiratory Syncytial Virus IgG
Epstein-Barr VCA IgM	Respiratory Syncytial Virus IgG
Epstein-Barr EBNA IgG	Rubella IgG
Epstein-Barr Early Antigen IgG	Rubella IgG Avidity
Epstein-Barr Early Antigen IgM	Rubella IgM
Helicobacter Pylori IgG	Syphilis Screen Recombi
Helicobacter Pylori IgA	Treponema IgG
HSV 1 Screen	Treponema IgM
HSV 2 Screen	Toscana Virus IgG (Sandfly Fever Virus)
Herpes Simplex 1+2 IGM	Toscana Virus IgM (Sandfly Fever Virus)
Herpes Simplex 1+2 IgG	Toxoplasma IgG
Influenza A IgG	Toxoplasma IgG Avidity
Influenza A IgG	Toxoplasma IgM
Influenza B IgG	Toxoplasma IgA
Influenza B IgG	Varicella IgG
Legionella Pneumophyla IgM	Varicella IgM
Legionella Pneumophyla 1 IgG	

Autoinmunidad

AINA-B	Glutadin-B
ENA-6-S	Deaminated Glutadin
ANA Screen	Preptide-G
SM	Deaminated Glutadin
SS-A	Preptide -A
SS-B	ITg-A
Scl-70	ITg-G
Cemp-B	ASCA-A
Jo-1	ASCA-G
dsDNA-G	PR3
dsDNA-M	MPO
CCP	GBM
RF-G	a-TG
RF-M	a-TPO
Cardiolipin-IgG	TG
Cardiolipin-IgM	LKM-1
Beta 2-Glycoprotein-G	AMA-M2
Beta2-Glycoprotein -M	Insulin
Glutadin-A	

Fijación del Complemento

Bordetella Pertussis	Chlamydia
Borrelia	Echo Virus P Mix
Brucella	Influenza A Virus
Campylobacter Jejuni	Influenza B Virus
Legionella Pneumophila	Mycoplasma Pneumoniae
Leptospira Mix	Parainfluenza Mix
Listeria Monocytogenes	O-Fever
Shigella Flexneri	Reovirus
Yersinia Enterocolitica	Respiratory Syncytial Virus
Echo Virus N Mix	Coxsackie Virus A Mix
Poliovirus Mix	Coxsackie Virus B Mix
Adenovirus	Achinococcus

Próximamente disponibles: Borellia IgG - IgM, Vitamina D, Chlamydia Trachomatis IgG - IgA, Parvovirus IgG - IgM, Panel Vacunacion (Tetanos - Difteria - polio IgG), EBV VCA Recombinante.





Tabla 1. Concordancia entre los métodos comparados en las condiciones a, b y c. Todos los valores están expresados en UI/ml.

Bland-Altman	ASCA	AFI	CDT
sesgo	2,500	0,745	2,909
DE	1,26	1,99	1,25
LC _{95%}	0,1-4,9	-4,6- 3,1	0,45-5,36

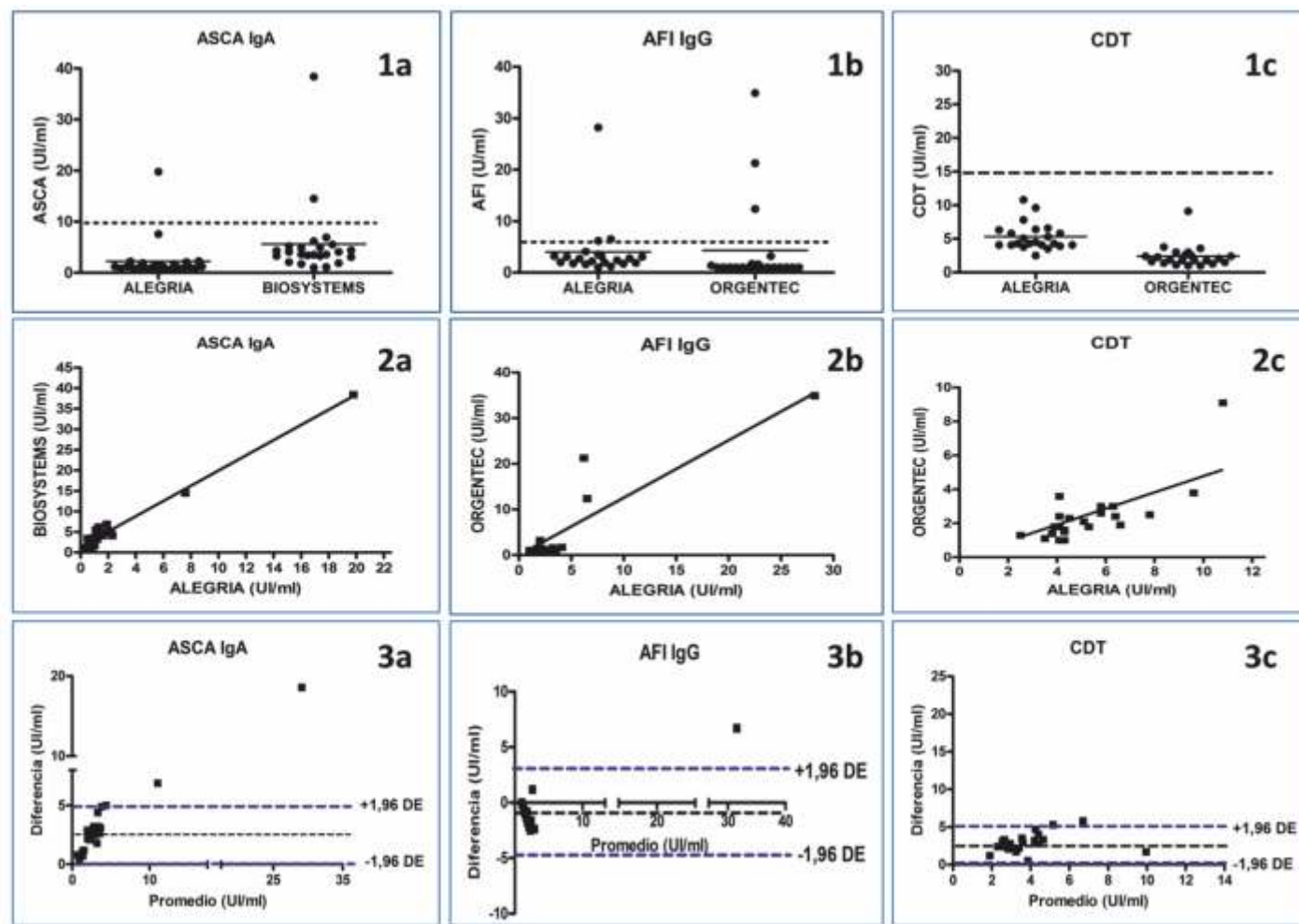


Tabla 2. Correlación entre los métodos comparados en las condiciones a, b y c.

Pearson	ASCA	AFI	CDT
r	0,9885	0,9052	0,7818
P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
R ²	0,9771	0,8195	0,6112
n	24	24	24



Panel 1. Fila superior (1a, 1b, 1c): dispersión de datos para las condiciones a, b y c según lo descrito en el texto. Fila intermedia (2a, 2b, 2c): correlación para las condiciones a, b y c. Fila inferior (3a, 3b, 3c): Concordancia para las condiciones a, b y c. Línea de puntos negra: valor de corte del ELISA. Línea de puntos azul: límites de concordancia. DE: Desvío estándar.



Bibliografía

- Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem. Med.* (2015); 25(2): 141–151.
- Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat. Methods Med.* (1999); 8: 135–160.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Int. J. Nurs. Stud.* (2010); 47: 931–936.
- Bland JM, Altman DG. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading. *Lancet* (1995); 346:1085–1087.
- Dewitte K, Fierens C, Stöckl D, Thienpont LM. Application of the Bland-Altman plot for interpretation of method - comparison studies: a critical investigation of its practice. *Clin. Chem.* (2002); 48:799–801.
- Dietemann J, Berthoux P, Gay-Montchamp JP, Batié M, Berthoux F. Comparison of ELISA method versus MEIA method for daily practice in the therapeutic monitoring of tacrolimus. *Nephrol. Dial. Transplant.* (2001); 16(11):2246-2249.