

Validación del sistema UMELISA HBsAg PLUS utilizando muestras de suero de cordón umbilical

Validation of UMELISA HBsAg PLUS system based on umbilical cord serum samples

Lic. Kenia Romero Martínez, Lic. María T. Pérez Guevara, Téc. Norma García Agramonte, Téc. Esperanza Sánchez Diéguez

Laboratorio de Investigaciones del sida. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la selección y el desarrollo de métodos analíticos siempre ha sido un tema importante para los laboratorios de ensayo. Para adoptar un método se hace necesario validarlo, porque el objetivo de la validación es probar la aptitud de los métodos, así como la competencia del laboratorio para realizar determinado ensayo. El sistema UMELISA HBsAg PLUS no contempla dentro de su aplicación el empleo de muestras de suero obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical, sin embargo, con este tipo de muestra se certifica el uso de la placenta como materia prima.

Objetivo: teniendo en cuenta la necesidad de demostrar que el cambio no afecta los parámetros de desempeño del sistema, se hizo su validación para muestras de suero de cordón umbilical.

Métodos: se emplearon tres paneles de muestras en los estudios de especificidad, concordancia con el sistema de referencia Hepanostika HBsAg Uni-Form II, robustez, precisión a dos niveles de repetibilidad (intraensayos) y precisión intermedia (interensayos), y límite de detección.

Resultados: la validación del sistema mostró los siguientes indicadores: especificidad y concordancia del 100 %, sistema robusto frente a los cambios de temperatura entre 35 y 38 °C, elevada precisión intraensayos (4,65 %) e interensayos (CV menores que 20 %), límite de detección correspondiente a una dilución de 1/10 000.

Conclusiones: los resultados demostraron que el sistema UMELISA HBsAg PLUS se puede emplear para la detección de HBsAg en muestras de suero de cordón umbilical.

Palabras clave: validación, diagnóstico de HBsAg, ELISA, métodos.

ABSTRACT

Introduction: the selection and the development of analytical methods have always been an important issue for testing laboratories. The adoption of a method requires validation because the objective is to prove the capability of a method as well as the competencies of the laboratory to make an specific assay. The range of applications of UMELISA HbsAg PLUS system does not include the use of serum samples taken from the umbilical cord blood; however the use of placenta as raw material is certified with this kind of sample.

Objective: to validate this system for umbilical cord serum sample taking into account the need of proving that this change does not affect the performance parameters of the system.

Methods: three panels of samples were used to study specificity, agreement with the reference system Heapanostika HbsAg Uni-Form II, robustness, precision at two levels of repeatability (intrassay) and intermediate precision (interassay) and detection limit.

Results: validation of the system showed the following indicators: specificity and agreement of 100 %, robust system against temperatures changes between 35 and 38 °C, high intraassay precision (4.65 %) and interassays (VC less than 20 %), detection limit corresponding to 1/10 000 dilution rate.

Conclusions: obtained results showed that UMELISA HbsAg PLUS system may be used to detect HBsAg in umbilical cord serum samples.

Key words: validation, HBsAg diagnosis, ELISA, methods.

INTRODUCCIÓN

La selección y el desarrollo de métodos analíticos siempre ha sido un tema importante para los laboratorios de ensayo. Para adoptar un método se hace necesario validarlo, porque el objetivo de la validación es probar la aptitud de los métodos, así como la competencia del laboratorio para realizar determinado ensayo.¹ Esto cobra cada día mayor vigencia en la certificación de la sangre, los órganos y tejidos, para garantizar su seguridad durante las transfusiones sanguíneas, los trasplantes de órganos o las producciones que emplean como materia prima sangre o sus derivados.

El Centro de Histoterapia Placentaria es una institución cubana dedicada a la fabricación de productos a partir de la placenta humana, órgano en el cual la infección por virus como el de la hepatitis B (VHB), la hepatitis C (VHC) y la inmunodeficiencia humana tipos 1 y 2 (VIH-1 y 2), ha sido demostrada;² por tal motivo se realiza su pesquisaje por la tecnología SUMA, inmunoensayo ultramicroanalítico, que incluye técnicas para la determinación del antígeno de superficie del VHB y anticuerpos al VHC y VIH 1 y 2, con el objetivo de certificar su uso en el proceso productivo, empleando muestras de suero obtenidas a partir de la sangre de cordón umbilical.³

El sistema UMELISA HBsAg PLUS no contempla dentro de su aplicación este tipo de muestras, por tanto, para demostrar que el cambio no afecta los parámetros de desempeño del sistema, nos propusimos como objetivo validarlo utilizando muestras de suero de cordón umbilical.

MÉTODOS

Aspectos generales y regulatorios

Para la realización de este estudio se siguieron los aspectos establecidos por las agencias reguladoras nacionales e internacionales.⁴⁻⁶

Toma de las muestras utilizadas en la validación

Las muestras de suero de cordón umbilical se tomaron según lo establecido en la regulación 2/2002 del Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED).³

Técnica a validar: UMELISA HBsAg PLUS (CIE)

En los ensayos se siguieron estrictamente las indicaciones de uso recomendadas por el fabricante (Literatura interior, edición Abril 20, 2006). Los procesos de lavado se realizaron en el lavador MAS-501 y la lectura e interpretación de los resultados se hizo empleando el lector PR-521, con el *strip reader software* 9.0, para el sistema UMELISA HBsAg PLUS, producidos por el Centro de Inmunoensayo (CIE, La Habana, Cuba). La intensidad de la fluorescencia emitida permitió detectar la presencia de HBsAg en la muestra.

Diagnosticadores empleados para la caracterización de las muestras

Hepanostika HBsAg Uni-Form II (Biomérieux).

Hepanostika HBsAg Uni-Form II Confirmatory (Biomérieux).

Hepanostika HCV Ultra (Biomérieux).

Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab (Biomérieux).

Especificidad

Se ensayaron en el sistema UMELISA HBsAg PLUS, 980 muestras no reactivas a HBsAg caracterizadas por el sistema de referencia Hepanostika HBsAg Uni-Form II; 10 muestras reactivas a anticuerpos contra el VHC caracterizadas por el sistema Hepanostika HCV Ultra y 10 muestras reactivas a anticuerpos contra el VIH caracterizadas por el sistema Vironostika HIV Uni-Form II Ag/Ab. Las muestras no concordantes con el resultado esperado se repitieron por duplicado. Los resultados discrepantes con la segunda repetición se confirmaron con el hepanostika HBsAg Uni-Form II Confirmatory. Se calculó la especificidad diagnóstica y analítica.⁷

Concordancia

Se analizaron en el sistema UMELISA HBsAg PLUS, las 980 muestras no reactivas correspondientes al estudio anterior y 10 muestras con diferentes niveles de reactividad a HBsAg caracterizadas por el sistema Hepanostika HBsAg Uni-Form II. Se calculó la concordancia entre ambos sistemas y el índice Kappa (k).⁷

Robustez

Se analizaron 2 réplicas de 10 muestras reactivas y 9 muestras no reactivas a HBsAg. Se estudiaron variaciones en la temperatura (35, 37 y 38 °C) durante la incubación de las muestras y el conjugado, y la contaminación cruzada entre muestras reactivas y no reactivas durante el proceso de lavado. Se calculó la media (0), desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV) para cada una de las variantes.⁷ Los resultados se expresaron en gráficos de barras. Los cálculos y gráficos se realizaron empleando el programa Excel de Microsoft Office.

Precisión

La precisión fue evaluada a dos niveles: intraensayo (repetibilidad) e interensayo (precisión intermedia), empleando dos muestras con diferentes concentraciones de HBsAg: 3 574,6 UI/mL y 2 154,6 UI/mL, cuantificadas en el CIE con el sistema UMELISA HBsAg PLUS (CIE), por extrapolación de la curva de calibración del patrón internacional del Instituto Paul-Erlich (Alemania).

Para la repetibilidad se analizaron 10 réplicas de una dilución 1/1 000 a partir de la muestra con concentración de 2 154,6 UI/mL de HBsAg, con el mismo lote de reactivos, en el mismo día, en tres ensayos diferentes bajo las mismas condiciones.

Para la precisión intermedia se ensayaron tres diluciones (1/500, 1/1 000 y 1/5 000) a partir de la muestra con concentración de 3 574,6 UI/mL de HBsAg. Se analizaron 6 réplicas de cada dilución en 3 días, con 3 lotes diferentes de reactivos.

Se calculó la media, DE y CV entre réplicas de la misma muestra para los ensayos de repetibilidad y para los diferentes días y lotes de reactivos en la precisión intermedia. Se analizó la normalidad de los valores y se determinó la homogeneidad de medias y varianzas por las dójimas de *Grubbs* y *Cochran*, respectivamente.⁵ Para todos los cálculos se empleó el programa Excel de Microsoft Office.

Límite de detección

Se prepararon 5 diluciones de la muestra de 2 154,6 UI/mL de HBsAg correspondiente al estudio anterior de la forma siguiente: 1/500, 1/1 000, 1/5 000, 1/10 000 y 1/20 000. Se analizaron 4 réplicas de cada una de las diluciones por los sistemas UMELISA HBsAg PLUS y Hepanostika HBsAg Uni-Form II. Se compararon los resultados obtenidos mediante gráficos y se determinó el límite de detección en nuestras condiciones de ensayo.⁸ Para los gráficos se empleó el programa Excel de Microsoft Office.

RESULTADOS

Especificidad

En el estudio, las 980 muestras de suero de cordón umbilical no reactivas a HBsAg, y las que contenían anticuerpos contra el VHC y VIH, respectivamente, resultaron no reactivas por UMELISA HBsAg PLUS, obteniéndose 100 % de especificidad, lo cual significa que no se detectaron resultados falsos reactivos.

Concordancia

Al comparar los resultados de las 980 muestras no reactivas y las 10 con diferentes niveles de reactividad por Heparostika HBsAg Uni-Form II, con los obtenidos en el sistema UMELISA HBsAg PLUS, la concordancia fue de 100 %, o sea, se obtuvo un índice Kappa de 1.

Robustez

En la evaluación de la robustez no hubo variación en los resultados de las 10 muestras reactivas, ni contaminación cruzada con las muestras no reactivas a 35, 37 y 38 °C. Los CV mostraron valores hasta 15,57 % para las muestras reactivas, y hasta 16,97 % para las no reactivas, excepto para la muestra 9 no reactiva a 35 °C, donde se obtuvo 23,57 %. Exceptuando esta muestra, los CV no fueron superiores a 20 %.

En la figura 1 se muestra el comportamiento de los valores de fluorescencia obtenidos para las muestras reactivas y no reactivas a las diferentes temperaturas. Las muestras que no presentaron variación, no se tomaron en cuenta a la hora de los cálculos ni del gráfico.

Precisión

Tanto para la repetibilidad como para la precisión intermedia se aceptaron todos los valores como normales al analizarlos por d^ocima de *Grubbs*, para $\alpha = 5\%$.

En las tablas 1 y 2 se muestran los resultados de los estadígrafos *G*_{máx}, *G*_{mín} y *C*, que en todos los casos resultaron ser menores que el valor crítico para $\alpha = 5\%$.

En la tabla 1 se puede apreciar el CV obtenido en el estudio de repetibilidad y en la tabla 3 se resumen los resultados obtenidos para el CV en las dos variantes empleadas para la precisión intermedia, los cuales resultaron inferiores al 10 y 20 %, respectivamente.

Tabla 1. Análisis de la homogeneidad entre las medias y las varianzas de las muestras en la repetibilidad

	\bar{x}	DE	Coeficiente de variación (%)	D ^o cima de Grubbs*		D ^o cima de Cochran**
				G _{máx}	G _{mín}	C
Muestra 1	37,37	0,756	4,650	0,649	1,148	0,485

G: estadígrafo para la d^ocima de Grubbs; C: estadígrafo para la d^ocima de Cochran;
 * valor crítico de la tabla de Grubbs para n=10 2,290 para $\alpha = 5\%$; ** valor crítico de la tabla de Cochran para p= 3 y n= 10 0,628 para $\alpha = 5\%$.

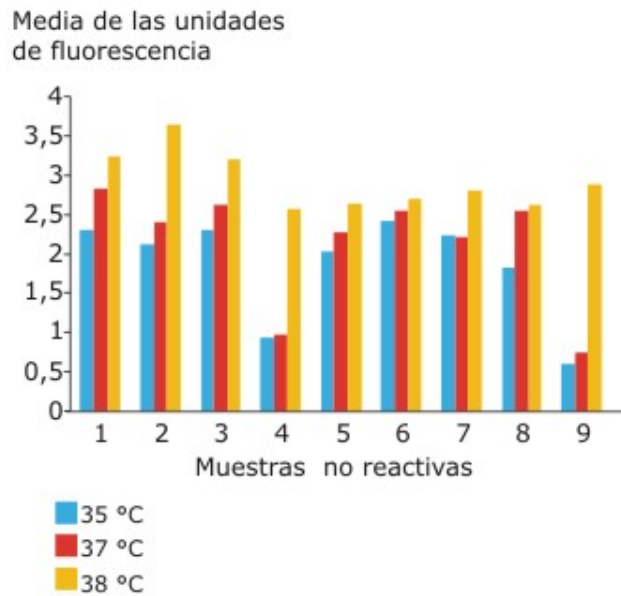
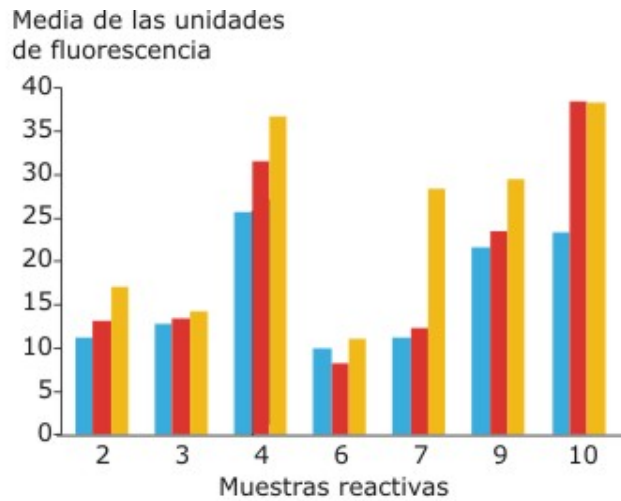


Fig. 1. Comportamiento de las muestras en el estudio de robustez a 35, 37 y 38 °C.

Límite de detección

El límite de detección en nuestras condiciones de ensayo correspondió a una dilución de 1/10 000, por ser la última en la que se detectó la presencia de antígeno en ambos sistemas (Fig. 2).

Tabla 2. Análisis de la homogeneidad entre las medias y las varianzas de las muestras para las dos variantes analizadas en la precisión intermedia

Variante	Muestras	\bar{x}	DE	Dócima de Grubbs*		Dócima de Cochran***
				G _{máx}	G _{min}	C
Días	Muestra 1	158,320	17,015	0,675	1,149	0,461
	Muestra 2	66,378	5,172	0,821	1,113	0,390
	Muestra 3	14,684	1,563	0,678	1,148	0,415
Lotes	Muestra 1	158,320	6,216	1,109	0,833	0,362
	Muestra 2	66,378	4,432	1,007	0,992	0,494
	Muestra 3	14,684	0,427	1,112	0,826	0,439

G: estadígrafo para la dócima de Grubbs; C: estadígrafo para la dócima de Cochran
 * valor crítico de la tabla de Grubbs para n=6 1,887 para $\alpha= 5 \%$; *** valor crítico de la tabla de Cochran para p=3 y n= 6 0,707 para $\alpha= 5 \%$

Tabla 3. Resultados del coeficiente de variación en el estudio de precisión intermedia

	Coeficiente de variación entre días (%)			Coeficiente de variación entre lotes (%)		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Día 1	Día 2	Día 3
Muestra 1	12,795	8,305	7,832	12,280	12,697	13,096
Muestra 2	8,002	9,109	8,902	7,923	7,885	12,240
Muestra 3	10,914	7,834	7,305	11,576	10,641	14,062

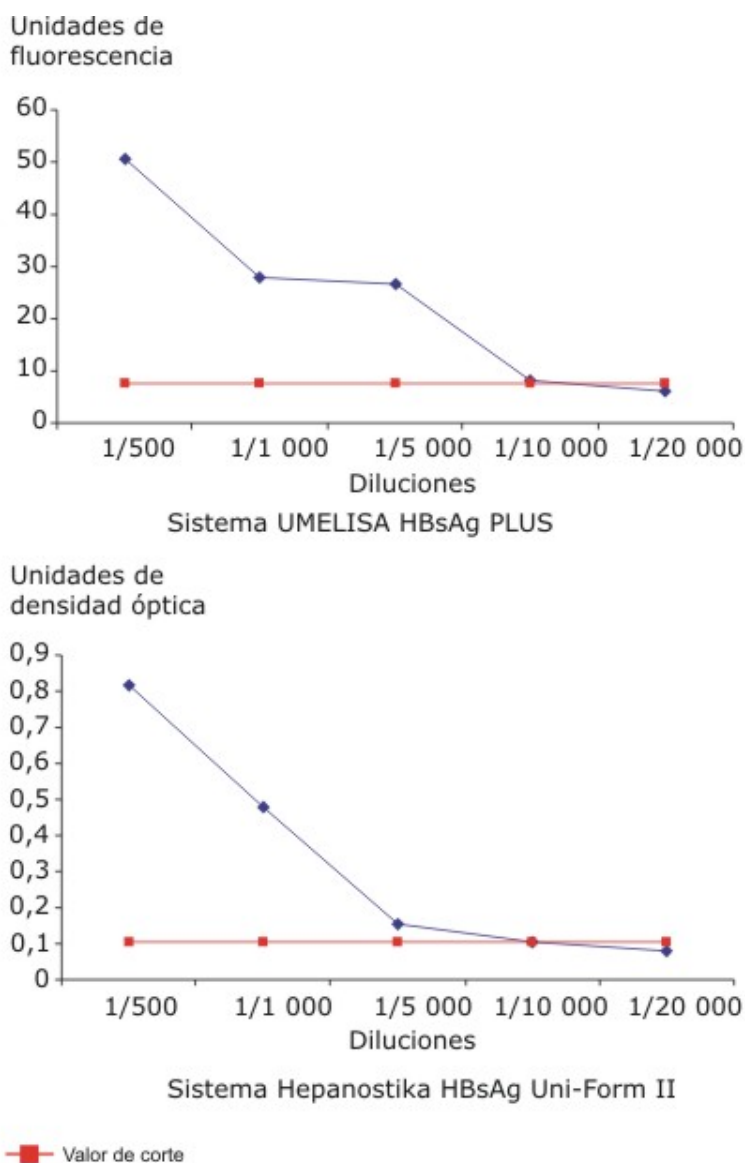


Fig. 2. Límite de detección obtenido en las condiciones de ensayo.

DISCUSIÓN

En Cuba se cuenta con programas de pesquiasaje dirigidos a la certificación de la sangre y sus derivados. La base analítica para estos programas es el sistema ultramicroanalítico (SUMA), de producción nacional, que se caracteriza por emplear mínimos volúmenes de muestras y reactivos.

La factibilidad de uso del UMELISA HBsAg PLUS en el pesquiasaje de la infección por VHB en suero de cordón umbilical se demostró con los resultados del desempeño del sistema.

En el caso de la especificidad, los resultados obtenidos fueron superiores a los descritos por los productores en los parámetros de evaluación del sistema, quienes plantean 99,92 % de especificidad para muestras de suero o plasma (Literatura interior, edición Abril 20, 2006), aunque en la evaluación del UMELISA HBsAg PLUS para muestras de sangre seca en papel de filtro, el índice de especificidad alcanzado también fue de 100 %.⁹ Otros autores han referido resultados similares para otros sistemas de detección de HBsAg.¹⁰⁻¹²

En cuanto a la concordancia con el sistema de referencia Hepanostika HBsAg Uniform II, en estudios comparativos realizados entre diferentes técnicas para la detección de HBsAg, se ha encontrado que, tanto para sueros positivos como negativos, la prueba de ELISA ha mostrado una concordancia de hasta 98,3 %, la cual es significativamente mayor que la observada en otras pruebas como el ensayo inmunoenzimático de micropartículas (90 %) y la hemaglutinación (89 %),¹³ por lo que nuestros resultados no difieren de lo referido por otros autores.

En el estudio de robustez, el haber obtenido un CV de 23,57 %, para la muestra 9 no reactiva a 35 °C, constituye un resultado esperado si se tiene en cuenta que los valores de fluorescencia observados están muy cercanos a cero, lo que afecta el cálculo del CV. En los ensayos se emplearon solo dos réplicas de cada muestra, por lo que pequeñas fluctuaciones en los valores pueden aumentar la dispersión, lo cual influye en el cálculo de la DE, y por tanto, del CV.¹⁴

Al analizar la figura 1, se puede apreciar el efecto de la temperatura sobre la reacción enzimática, donde un incremento de esta proporciona a las moléculas reaccionantes más energía cinética, lo que produce un aumento de colisiones productivas por unidad de tiempo hasta un punto (temperatura óptima de reacción), por encima del cual el incremento de la velocidad de la reacción puede ser anulado debido a la pérdida de la estructura tridimensional de la enzima.¹⁵

Del estudio de precisión se puede decir que tanto para la repetibilidad como para la precisión intermedia, a un nivel de confianza de 95 %, la dócima de *Grubb* indicó homogeneidad entre las medias y la dócima de *Cochran* mostró homogeneidad entre las varianzas. En nuestro estudio el CV obtenido para la repetibilidad (4,650 %) se considera óptimo, porque no excedió el 5 % y para la precisión intermedia el CV de las 3 muestras tuvo una variación de 7,305 % a 12,795 % entre días y de 7,885 % a 14,062 % entre lotes; los valores no fueron superiores a 20 %. En ambos casos los resultados obtenidos concuerdan con lo referido por *Ochoa* y otros,⁷ y por el CECMED,⁶ quienes plantean que en los inmunoensayos enzimáticos el coeficiente de variación no debe superar el 10 % en la prueba de precisión intraensayo y el 20 % en la interensayo; y se consideran óptimos los inferiores al 5 % y al 10 %, respectivamente.

Para el límite de detección, los resultados fueron similares a los hallados por *Huh* y otros¹⁷ quienes refieren una sensibilidad analítica para ELISA de detección de HBsAg de 0,2 UI/ mL.

El resultado obtenido con el sistema UMELISA HBsAg PLUS permite demostrar la capacidad de este ensayo para detectar bajas concentraciones del antígeno de superficie del VHB en etapas tempranas, lo cual contribuye a que no formen parte del proceso productivo aquellas unidades de placenta reactivas para este marcador viral.

La validación de este método de ensayo, empleado en el laboratorio de control viral del Centro de Histoterapia Placentaria, constituye uno de los requisitos para el

otorgamiento de la licencia de fabricación, por parte del órgano regulatorio de la República de Cuba; porque a través de un diseño riguroso de este proceso es que el fabricante puede establecer, con un alto grado de confianza, que todos los lotes producidos cumplen con las especificaciones de calidad. En este caso se puede garantizar que las unidades de placenta que van a formar parte del producto final son no reactivas a HBsAg.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NC ISO/IEC 17025:2006. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración; 2006.
2. Burnouf T, Radosevich M. Reducing the risk of infection from plasma products: specific preventative strategies. *Blood Rev.* 2000;14:94-110.
3. CECMED. Regulación 2/2002. Placenta humana como materia prima farmacéutica. Cuba; 2002.
4. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research; 2001.
5. NC-TS-368: 2004. Guía para la Validación de Métodos de Ensayos Químicos para Alimentos. Anexo A, A 1-3; 2004.
6. CECMED. Regulación 41/2007. Validación de métodos analíticos. Cuba; 2007.
7. Ochoa R, Martínez J, Ferriol X, García A, Estrada E, Blanco R, et al. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacciMonitor.* 2000;9(3):13-8. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2000000300003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
8. Jacobson RH. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev sci tech Off int Epiz.* 1998;17(2):507-26.
9. Delahanty A, Valdivia I, Ventura J, Trujillo J, Ortega D, Palenzuela A. Detección de HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel filtro empleando el UMEHISA HBsAg PLUS. *Rev Biomed.* 2003;14:17-21.
10. Valanne A, Huopalaht S, Vainionpaa R, Lovgren T, Harma H. Rapid and sensitive HBsAg immunoassay based on fluorescent nanoparticle labels and time-resolved detection. *J Virol Methods.* 2005;129(1):83-90.
11. Van Roosmalen MH, de Jong JJ, Haenen W, Jacobs T, Couwenberg F, Ahlers de Boer GJ, et al. A new HBsAg screening assay designed for sensitive detection of HBsAg subtypes and variants. *Intervirology.* 2006;49(3):127-32.
12. Weber B, Van der Taelem- Brule N, Berger A, Simon F, Geudin M, Ritter J. Evaluation of a new automated assay for hepatitis B surface antigen (HBsAg) detection VIDAS HBsAg Ultra. *J Virol Methods.* 2006;135(1):109-17.

13. Beltrán M, Ayala M. Evaluación externa de los resultados serológicos en los bancos de sangre de Colombia. Pan Am J Public Health. 2003;13(2/3):138-43.
14. Romero K. Validación del sistema UMELISA HBsAg PLUS utilizando muestras de suero de cordón umbilical [Tesis en opción al título de Máster en Ciencias]. La Habana: Facultad de Biología, Universidad de La Habana; 2008.
15. Chávez MA, Díaz J, Pérez U, Delfín J. Efectos del pH y la temperatura. En: Temas de enzimología. La Habana: Universidad de La Habana, Facultad de Biología; 1990. p. 287-90.
16. Huh HJ, Chae SL, Cha YJ. Comparison study with enzyme immunoassay and chemiluminescence immunoassay for hepatitis B virus surface antigen detection Korean. J Lab Med. 2007;27(5):355-9.

Recibido: 16 de abril de 2012.
Aprobado: 5 de mayo de 2012.

Kenia Romero Martínez. Laboratorio de Investigaciones del sida. Carretera de Jamaica y Autopista Nacional. La Habana, Cuba. Correo electrónico: lisida@infomed.sld.cu