

# Validación de inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas

Rolando Ochoa, Juan C. Martínez, Eric Estrada, Ana M. García, Xenia Ferriol, Rosa Blanco, Franklin Sotolongo.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: ochoa@finlay.edu.cu

Se realizó una revisión y actualización sobre la importancia de la validación de los inmunoensayos cualitativos usados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas, sus principios y procedimientos. Se discutieron los principales parámetros empleados para evaluar estas técnicas. Se analizaron detalladamente los procedimientos para estudiar la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, valor de discriminación y zona gris. Se exponen nuestras experiencias.

**Palabras claves:** Validación, vacunas, inmunoensayos

## Introducción

Los inmunoensayos cualitativos son empleados habitualmente en la evaluación de la inmunogenicidad de vacunas. Sin embargo, la evaluación de estos ensayos presenta varios problemas, ya que no todos los investigadores conocen con precisión qué rasgos lo distinguen de un ensayo cuantitativo, ni cuáles parámetros deben emplearse. En una prueba cuantitativa, los resultados se dan en una distribución continua (1), mientras que en las cualitativas vienen dados en forma binaria: 0/1, no/si, negativo/positivo, no seroconvierten/si seroconvierten, etc. La mayor parte de los ensayos semicuantitativos son analizados como cualitativos y la interpretación de muchos ensayos cuantitativos usados para evaluar inmunogenicidad, se hace en términos cualitativos al determinar la seroconversión o serorespuesta inducida por una vacuna (1, 2).

Un ensayo cualitativo no brinda una información numérica de los resultados, pero esto no implica que sea inferior a una prueba cuantitativa. Las aplicaciones de estos dos ensayos pueden ser diferentes y en algunas situaciones un resultado cualitativo es suficiente. Debe tenerse en cuenta que en muchos casos no existen materiales de referencia y en otros la naturaleza de los mecanismos de protección no es bien conocida, lo que limita la cuantificación de los resultados o al menos su interpretación.

Los inmunoensayos cualitativos requieren de una adecuada estandarización y validación. Como es conocido, para estandarizar un ensayo se deben establecer las condiciones de trabajo óptimas de los reactivos químicos y biológicos, la temperatura y el tiempo de incubación en cada etapa y la dilución idónea de las muestras, preparar controles adecuados y calcular el valor de corte con paneles de muestras negativas y positivas. Sin embargo, no existe

suficiente información con respecto a la validación de este tipo de ensayos, de ahí que analicemos con detalle los principales parámetros empleados.

## Procedimientos para la validación de inmunoensayos cualitativos

Los parámetros fundamentales a evaluar son: valor de discriminación, ancho de la zona gris, sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivos y negativos (2).

Si la concentración del analito de una muestra dada es superior al **valor de discriminación** se obtiene un resultado positivo. No debe confundirse ni con el límite de detección de los ensayos cuantitativos ni con el valor de corte ("cut-off"), este último es un valor que se obtiene utilizando diferentes criterios según los intereses del productor, la mayor parte de las veces analizando la sensibilidad y especificidad del ensayo. Alrededor del valor de discriminación se encuentra la llamada "zona gris", donde los resultados positivos para una muestra procesada varias veces, varían según se encuentren por debajo o encima de ese nivel. El ancho de esta zona es importante y define la precisión de un ensayo cualitativo, que será mayor a medida que sea más estrecha (2), tal y como ocurre en el ensayo A de la Figura 2. Se evalúa preparando varias diluciones de una muestra de referencia, analizando al menos 20 replicados de cada dilución en orden aleatorio y registrando los resultados en positivos o negativos, según el valor de corte definido para el ensayo. El valor de discriminación corresponderá a la dilución en la que se obtenga el 50% de resultados positivos. La zona gris se extenderá entre el 5% y el 95% de resultados positivos (Figura 2). Si no existe una referencia conocida se puede usar una muestra fuertemente positiva y los resultados se expresarán en términos arbitrarios (2, 3).

Figura 1. Diagrama de flujo para la validación de ensayos cualitativos

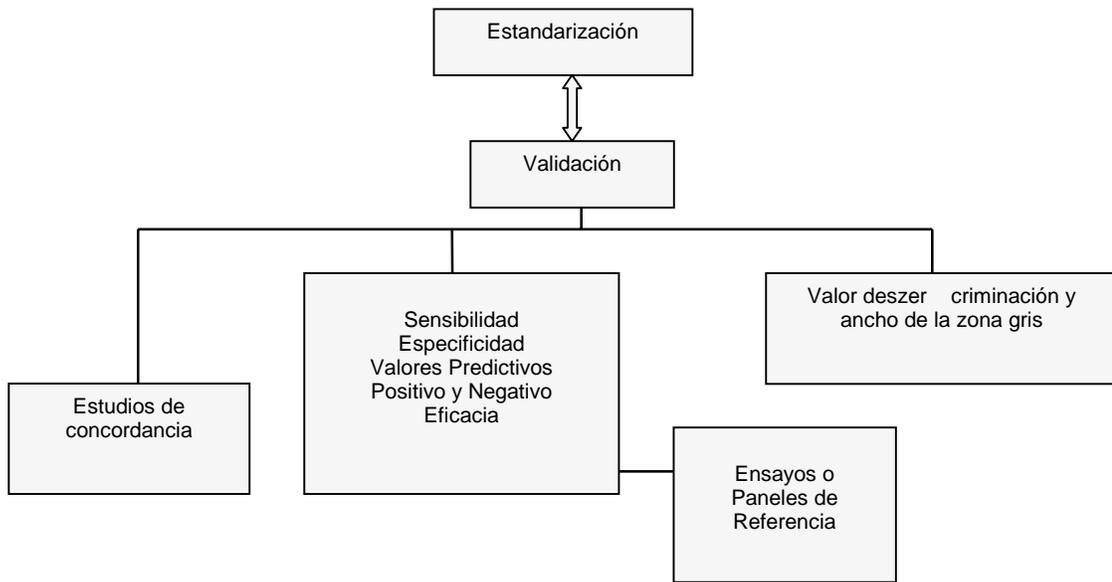
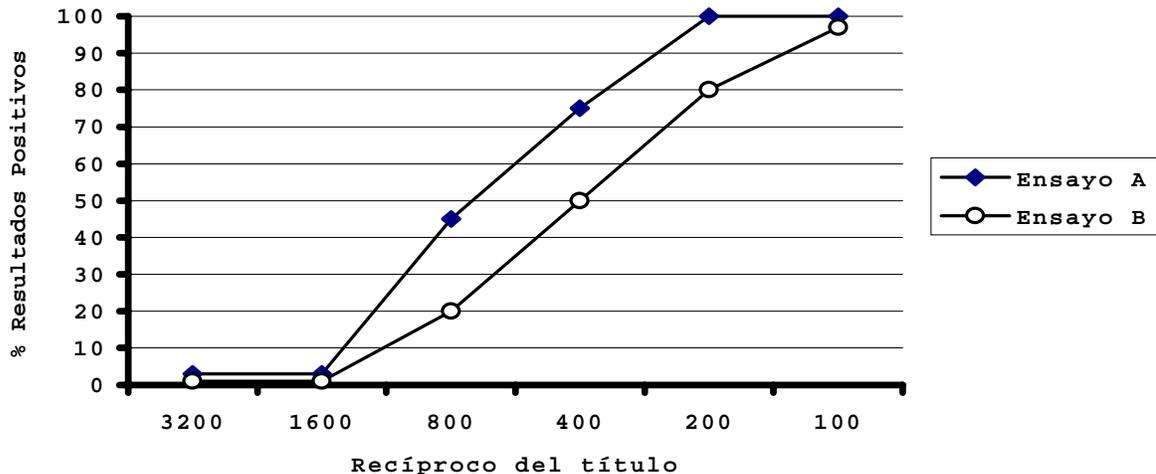


Figura 2. Ancho de la zona gris (entre el 5% y el 95%) y valor de discriminación (50%)



La **sensibilidad** es definida como la proporción de muestras positivas o reactivas correctamente identificadas por la prueba empleada y la **especificidad** como la proporción de muestras negativas (no reactivas) correctamente identificadas. Después de evaluar paneles de muestras adecuadamente clasificadas o comparar nuestro ensayo con uno de referencia, se calcula la sensibilidad (positivos correctamente detectados x 100 / positivos correctamente detectados + falsos negativos) y la especificidad (negativos correctamente detectados x 100 / negativos correctamente detectados + falsos positivos) (4, 2, 5). Deben estudiarse al menos 100 muestras representativas de la población sobre la que la técnica será usada, en las que se deben encontrar muestras con diverso grado de positividad

y muestras negativas obtenidas de individuos con enfermedades relacionadas, inmunizados con otro preparado vacunal y entidades que pudieran condicionar falsos resultados, como enfermedades autoinmunes (2). Los valores óptimos de sensibilidad y especificidad dependen de los propósitos de la técnica, idealmente 100% para ambos, aunque generalmente una elevada sensibilidad se alcanza a expensas de la especificidad y viceversa, estableciéndose habitualmente un compromiso sobre los valores deseados.

El **valor predictivo positivo** (VPP) es la probabilidad que tiene un individuo de ser realmente positivo, cuando el resultado de la prueba que se le practica resulta reactivo

(positivos correctamente clasificados x 100 / positivos correctamente clasificados + falsos positivos). **Valor predictivo negativo (VPN)** es la probabilidad que tiene un individuo de ser negativo, cuando el resultado de la prueba es no reactivo (negativos correctamente clasificados x 100 / negativos correctamente clasificados + falsos negativos). Los valores predictivos, manteniendo la sensibilidad y especificidad invariables, se modifican drásticamente de acuerdo con la prevalencia de la enfermedad, marcador inmunológico, genético, bioquímico o de otra índole, estudiado en la población. A medida que la prevalencia disminuye el VPN aumenta y el VPP disminuye. Esta probabilidad se calcula según el teorema de Bayes (5):

$$VPP = [S \times P] / [S \times P + (1 - E) \times (1 - P)]$$

$$VPN = [E (1 - P)] / [E (1 - P) + (1 - S) \times P]$$

Donde:

P = Prevalencia.

S = Sensibilidad.

E = Especificidad.

La **eficacia** es la capacidad general de un ensayo para detectar correctamente todos los positivos y los negativos (positivos correctamente clasificados + negativos correctamente clasificados / positivos correctamente clasificados + falsos positivos + negativos correctamente clasificados + falsos negativos), es decir una eficacia óptima se alcanzará en aquella técnica que no tenga falsos resultados positivos ni falsos negativos.

Para el cálculo de estos parámetros resulta muy útil el uso de tablas de contingencia:

Ensayo a evaluar	Referencia		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	a	b	a + b
Negativos	c	d	c + d
<b>Total</b>	a + c	b + d	a + b + c + d

$$\text{Sensibilidad} = (a / a + c) \times 100$$

$$\text{Especificidad} = (d / b + d) \times 100$$

$$\text{Valor Predictivo Positivo} = (a / a + b) \times 100$$

$$\text{Valor Predictivo Negativo} = (d / c + d) \times 100$$

$$\text{Eficacia} = \{(a + d) / (a + b + c + d)\} \times 100$$

Cuando se requiere la evaluación de diferentes métodos frente a un mismo panel de sueros de referencia, se usan estudios de concordancia (o eficiencia), como son el Índice Kappa y la Prueba de Mac Nemar. Tomemos como ejemplo

para el Índice Kappa la comparación de un método en estudio con otro de referencia, con un panel de 50 sueros:

Ensayo estudiado	Referencia		Total
	Positivos	Negativos	
Positivos	23 (a)	0 (b)	23 (a + b)
Negativos	6 (c)	21 (d)	27 (c + d)
<b>Total</b>	29 (a + c)	21 (b + d)	50 (n)

Procedimiento de cálculo:

$$K = (p_o - p_e) / (1 - p_e)$$

Donde:

$$p_o = (a + d) / n$$

$$p_e = (P + N) / n$$

$$\text{Concordancia en el caso de positivos } P = \left[ \left\{ \frac{(a + b)}{n} \right\} \times \left\{ \frac{(a + c)}{n} \right\} \right] \times n$$

Concordancia en el caso

$$\text{de negativos } N = (c + d) - \{(a + c) - P\}$$

En el ejemplo K = 0,77

El índice de concordancia (K) puede clasificarse en cinco grupos distintos:

Concordancia	Kappa
Deficiente	< 0,20
Regular	0,21 - 0,40
Moderada	0,41 - 0,60
Buena	0,61 - 0,80
Muy buena	0,81 - 1,00

En la práctica, cualquier valor de Kappa < 0,5 denota una baja correlación. Un problema del uso de este índice es que los valores dependen de la proporción (prevalencia) de muestras de cada categoría, haciendo que no sea posible la comparación de diferentes índices procedentes de estudios distintos. La prueba de Mac Nemar es empleada cuando se comparan dos métodos con las mismas muestras y las sensibilidades y especificidades pueden aparearse (5, 6).

### Conclusiones

Aunque los ensayos analíticos cualitativos no brindan una información numérica de los resultados, son usados habitualmente para analizar la inmunogenicidad de vacunas, sobre todo en aquellos casos en que no se cuenta con materiales de referencia, o cuando no son bien conocidos los niveles protectores de los efectores involucrados en los posibles mecanismos de protección.

En este sentido no debe subestimarse la importancia de estos inmunoensayos, los cuales deben normalizarse y validarse adecuadamente de tal forma que se garantice la reproducibilidad de los resultados.

## Referencias

1. Broughton PMG, Bergonzi C, Lindstedt G, Loeber IG, Malan PG, Mathieu M, Pozet S. *Guidelines for a user laboratory to evaluate and select a kit for its own use*. Part 1. Quantitative tests. European Committee for Clinical Laboratory Standard, Vol. 3, No 3, 1986.
2. Broughton PMG, Bergonzi C, Lindstedt G, Loeber JG, Malan PG. *Guidelines for the evaluation of diagnostic kits*. Part 2. General principles and outline procedures for the evaluation of kits for qualitative tests. European Committee for Clinical Laboratory Standards, Vol. 3, No. 3, 1986.
3. Ochoa R. A new format ELISA for the detection of HBsAg. *Biotechnología Aplicada* 1998;15:250-253.
4. Thielmann K. *Principios de metodología en bioquímica clínica*. ed. Organismos: Instituto Cubano del Libro, 1973.
5. Cura E, Wendel S. Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los Bancos de Sangre. *Organización Panamericana de la Salud*. Washington DC, 1994.
6. Rodríguez L, Balmaseda A, Bravo J, Trujillo J, Martínez L, Ochoa R et al. Validación de un ultramicroELISA de detección de anticuerpos contra el antígeno de superficie de la hepatitis B. *Rev Cubana Med. Trop.* 1996;48(1):45-49.

## Validation of qualitative immunoassays used to evaluate the immunogenicity of vaccines

### Abstract

The importance of general principles and outline of procedures for the validation of qualitative immunoassays used to evaluate the immune response elicited by vaccines were analyzed. The main parameters used are discussed. Guidelines for the evaluation of the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, discrimination value and gray zone were carefully studied. Our experience is presented.

**Key words:** Validation, vaccines, immunoassays