

Escalado de kits de diagnóstico ELISA

Dr. Julio Coll Morales*

Desde hace unos años los inmunoensayos enzimáticos ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) en fase sólida, están ganando una aceptación creciente, debido principalmente a que ofrecen una alta sensibilidad junto con una gran versatilidad y simplicidad de manejo. Aunque existen numerosos ELISA descritos en la literatura, solo unos pocos pueden obtenerse en el mercado. La producción comercial de kits de diagnóstico ELISA está todavía poco estudiada. En este trabajo se comentan algunos de sus problemas y soluciones.

Etapas de desarrollo

Las etapas de desarrollo de un kit diagnóstico típico son:

1. **Estudio bibliográfico.** Incluye la puesta al día en el tema utilizando bancos de datos, así como consultas a especialistas, asesorías y el diseño experimental preliminar. Dura unos tres meses, si bien continúa durante todo el proyecto.
2. **Obtención de reactivos y aparataje complementario.** Es una fase que dura de 3 a 5 meses, dependiendo mucho del proyecto (importación de aparataje y reactivos, obtención de serotecas en hospitales, etc...).
3. **Investigación o desarrollo a escala de laboratorio.** Hacia la mitad de su duración debe preguntarse si se sigue o no el proyecto, debido a dificultades técnicas insuperables, o muy costosas en tiempo y/o dinero.
4. **Pruebas clínicas internas.** Para lo que hay que hacer un pre-diseño del kit, documentación prelimi-

nar, y al menos, 10 kits prototipo. Los resultados de estas pruebas suelen sugerir variaciones importantes en el diseño del kit, por lo que se vuelve a la etapa anterior a efectuar las modificaciones. Al finalizar ésta es posible haber obtenido suficiente material para efectuar alguna publicación de apoyo para el sector médico. La duración de esta etapa es de 3 a 8 meses.

5. **Desarrollo a escala de planta piloto, pruebas clínicas externas y modificaciones a escala planta piloto.** La escala planta piloto se define como 3-4 lotes de 50 kits por lote. Principalmente hay que comprobar la reproducibilidad dentro de un mismo lote y efectuar un estudio multicentro. Puede que incluso haya que volver a la etapa de investigación si se demuestran algunas anomalías. Por todo ello es previsible que la duración de esta etapa esté entre los 6-12 meses.
6. **Desarrollo a escala de producción.**

Diseño en el laboratorio

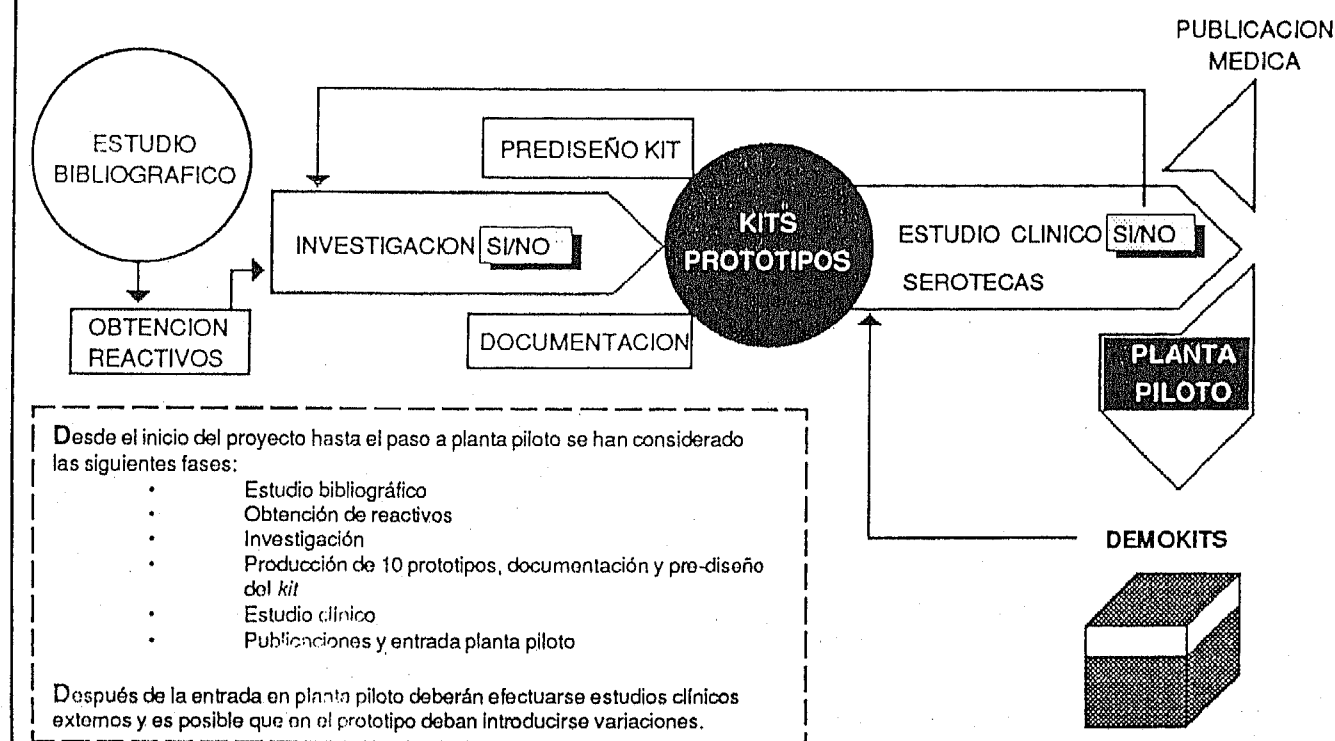
El hacer un ensayo en el laboratorio para usar en el laboratorio es relativamente fácil, se trata de poner en práctica una idea, hacer los tam-

pones, preparar los reactivos de hoy para mañana, guardar congelado todo aquello que no es estable y realizar el ensayo en un laboratorio preparado, con medios y con personal bastante formado. El preparar un ensayo a escala de laboratorio, pero para ser usado en un laboratorio clínico, plantea problemas distintos, tales como:

- La estabilidad de los reactivos ha de ser preferiblemente en disolución (para evitarle al clínico reconstituciones que son fuente de trabajo y error), y necesariamente a 4°C (ya que el transporte se efectúa a esas temperaturas). Todos los reactivos del kit han de soportar además tiempos cortos de exposición a temperaturas de 20-25°C. Para evitar tiempos reales al hacer estos experimentos tiempo/temperatura, se recurre a experiencias con temperaturas forzadas; lo que da una estimación de su estabilidad.
- En el diseño (número de frascos, diluciones, reconstituciones, sellados, etc...) debe tenerse en cuenta la mayor simplicidad de manejo, preparando todos los reactivos y manipulaciones para que se puedan realizar en laboratorios no bien equipados y por personas no expertas.

* Dr. Julio Coll Morales, Departamento de Virología, Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias.

Fig. 1. Esquema del desarrollo típico de un proyecto de kit de diagnóstico



- Hay que demostrar en un número suficiente de muestras clínicas que lo que se mide con el nuevo método es lo mismo que se medía con los métodos utilizados normalmente (correlaciones).
- Hay que estudiar las variables analíticas del ensayo y demostrar que son mejores que en otros métodos (curva estándar, linealidad del ensayo, reproducibilidad, intensidad de respuesta, valores de fondo, sensibilidad, precisión intra- e inter-ensayo, etc...)
- Hay que comprobar que la distribución de los valores paramétricos en una población normal, no enferma, es la adecuada. Se debe poder definir un valor de corte que clasifique claramente las muestras en positivas y negativas.
- Se debe verificar que en el nuevo método no interfieren sustancias que se encuentran con relativa frecuencia en las muestras de suero en un hospital y que por lo incontrolado de las

mismas podrían afectar a las medidas. Ejemplos son la hemoglobina (debida a la mayor o menor hemolización de los sueros) y sustancias que se emplean para evitar la coagulación (citrato, heparina, etc.).

- El sistema de ensayo ha de tener unos fondos muy bajos, ya que estos al cambiar de persona y/o de laboratorio tienden a aumentar. El uso de tampones especiales para los sistemas enzimáticos tiene aquí especial relevancia.
- Ha de conseguirse la mayor flexibilidad posible para que se adapte al número de muestras que el clínico debe efectuar en cada ensayo. Un ensayo realizado en tubos se adapta totalmente a las necesidades del clínico, pero un ensayo en placas de 96 pocillos es algo más fijo que no se adapta fácilmente. Una solución intermedia lo constituyen las placas de 96 pocillos divididas en tiras de 2 x 8 pocillos. Se adaptan con mayor facilidad al usuario aunque plantean problemas de estabili-

dad al quedar sin vacío las tiras que no se usan en un determinado ensayo.

Todavía a escala de laboratorio, el test ha de estar listo para que un laboratorio distinto, pero bien preparado, pueda llevarlo a feliz término. Nos encontramos con que hay que comprobar:

- ¿Cómo varía el comportamiento del ensayo, cuando distintas personas del mismo laboratorio lo realizan?
- Introducir las instrucciones precisas en el manual de instrucciones según se vayan comprobando los errores y malas interpretaciones.
- Comprobar la reproducibilidad inter- e intra-ensayo con varios lotes de unos 10 kits.
- Enviar los kits junto con su manual de instrucciones a varios laboratorios de hospitales y comprobar los resultados, introduciendo las modificaciones oportunas en los mismos.

Producción

Viene ahora el tema de cómo varían esos problemas cuando en vez de un *kit* se han de fabricar 100 ó 1000 *kits*, un lote, que es la única manera de poner en el mercado la idea original. Nuevos problemas vuelven a surgir:

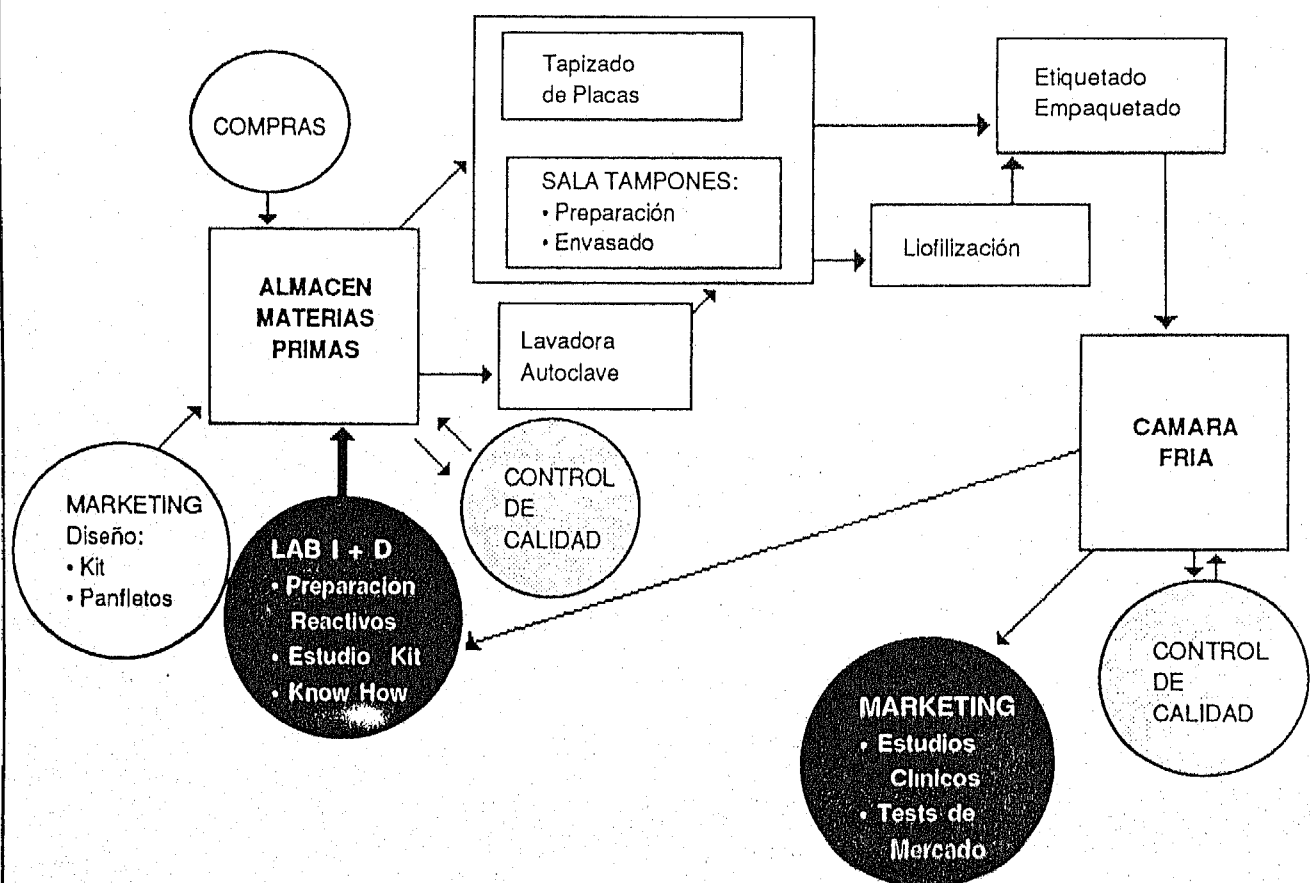
- La calidad de los frascos y tapones, cuyos proveedores deben comprometerse a suministrar cantidades adecuadas durante un período suficientemente largo. Estos componentes deben ser probados antes de utilizarlos en el *kit* ya que puede haber sorpresas inesperadas. Es preciso comprobar que los cierres supuestamente herméticos, son herméticos.

- Los componentes químicos de los tampones se han de revisar en cuanto a relación calidad/ precio. Los compuestos, como la albúmina bovina, no son equiparables, dependiendo de la casa comercial que los suministre ó del lote. Idealmente se tiende a utilizar la más alta pureza de reactivos, pero cuando se trata de escalar la producción, los precios pueden ser prohibitivos.
- El conjugado puede dar problemas ya que el escalado de un conjugado a base de anticuerpos policlonales exige un suministro de antígeno suficientemente puro, mantenimiento de un animalario, purificaciones, etc... Dado que un policlonal es una mezcla compleja, cada lote debe ser cuidadosamente controlado para asegurarse que se

va a comportar tal y como debe. El uso de monoclonales es de gran importancia de cara a producción, ya que simplifica todas las manipulaciones mencionadas anteriormente, eso sí, requiere una inversión importante en recursos (medios humanos) para obtener y seleccionar el monoclonal adecuado al *kit*. Aporta además una mayor especificidad y menores fondos de cara al usuario y es para él, una garantía de que lotes distintos se van a comportar igual.

- El extendido de placas es uno de los mayores problemas con los que se enfrenta el desarrollo de *kits* cuantitativos de ELISA. Cada uno de los pocillos de una placa de 96 debe tener una misma cantidad de antígeno, anticuerpo ó ligando pegado a su

Fig. 2. Diagrama de flujos de la producción



superficie. Para ello hay que controlar especialmente el protocolo de pegado de un gran número (100 a 1.000 placas) de placas por lote. Se utilizan dispensadores y lavadores de 96 puntas y protocolos que se adapten a una producción a esa escala. El control de calidad es aquí muy importante, ya que el funcionamiento de los dispensadores y lavadores simultáneos, muy a menudo no resulta todo lo homogéneo que cabría esperar (obturación de puntas, pérdidas preferenciales de presión, pérdidas de sustancias en las conducciones etc...)

- La mayor simplicidad para presentar el tampón sustrato en el *kit*, es poner este en presencia del cromógeno / "sustrato" de la reacción. Esto puede conseguirse, por ejemplo, con sistemas que utilizan como enzima la fosfatasa alcalina. Sin embargo, el sistema de peroxidasa y en concreto el sistema peroxidasa-o-phenylenediamina son claramente superiores para un ELISA cuantitativo en fase sólida, al aportar una mayor sensibilidad y menor coste de producción. Este sistema tiene la desventaja de que es inestable y por lo tanto el cromógeno y el tampón sustrato han de ocupar dos frascos distintos en el *kit*, lo que es un mal menor necesario si se compara con las ventajas que aporta el uso del sistema. Para que este u otro sistema se adapte a la flexibilidad que exige un *kit* para un número de muestras variables es necesario empaquetar el cromógeno en alícuotas ó pastillas, lo que a su vez impone nuevos problemas al escalado.
- Los patrones en el laboratorio se hacen con sustancias purificadas y controladas, evitando de esta manera complicar el sistema con otra fuente de posibles interpretaciones a los resultados. Ahora bien, de cara al escalado es preferible usar sustancias contenidas en gran cantidad en los líquidos fisiológicos naturales (anticuerpos ó antígenos) y usarlos a una alta dilución en el ensayo.

Hay que comprobar su estabilidad en disolución en esta forma final, lo que a menudo significa añadir inhibidores de proteasas y estabilizadores, junto con pruebas a temperaturas forzadas.

- Por último, quedan el empaquetado y el etiquetado, que han de tener presentes los problemas de estabilidad (por ejemplo, las cajas de *styrofoam* son buenos aislantes) y de correcta interpretación e identificación de cada uno de los frascos del *kit*.

Instrucciones para el uso

Como ejemplos de algunas de las causas identificadas que originan variaciones inter-ensayo en el desarrollo de un *kit*, pueden mencionarse:

- El calibrado de pipetas, que puede llegar a afectar hasta en un 20% a los resultados.
- Pequeños errores de pipeteo de cada persona.
- Diferencias de temperatura en las habitaciones (cada 6°C pueden inducir errores del 20%).
- El atemperamiento de los reactivos puede afectar distintamente a las muestras y a los standards, a los pocillos según su situación en la placa, etc...
- Las diferencias entre pipeteos al principio y al final de la placa, sobre todo cuando se analiza un número grande de muestras, puede llegar al 20%.
- La forma del lavado de placas (con *multichannel*, con frasco lavador, con lavador automático, etc...) y la forma de sacudir la placa después de cada lavado, ya que los restos de algunos taponnes de lavado activan las enzimas utilizadas en los ensayos.
- Las diferencias de temperatura/evaporación entre los pocillos interiores y exteriores.
- Diferencias en la agitación de los pocillos.

Estas variaciones, aunque no causan problemas especiales para un ensayo en unas condiciones dadas, debido a que afectan a todas

las muestras por igual, pueden afectar cuando se intentan comparar resultados entre laboratorios ó en el mismo laboratorio en días distintos, por ello siempre se debe utilizar una curva patrón cada vez que se realice un ensayo. La mayoría de estas variaciones se corrigen con un buen manual de instrucciones, pero exigen un estudio muy completo del ensayo para poder dar las indicaciones precisas; en caso contrario, el usuario encontrará que el *test* no funciona y no seguirá averiguando.

Conclusión

La tecnología de producción de *kits* de diagnóstico ELISA en fase sólida está en su infancia. Las múltiples ventajas de estas técnicas, reflejadas en el gran número de publicaciones recientes sobre ellas, han hecho que se vayan solucionando los problemas que han surgido de cara a su producción comercial. El estudio de las causas de variabilidad entre lotes ha aportado mejoras indiscutibles y en el futuro es de esperar que la automatización de la producción aumente de forma espectacular el número de *kits* que se ofrezcan en el mercado. B

Referencias

- 1) Martinez, J. y Coll, J.M. (1987). *Clinical preliminary studies on C-reactive protein quantification by ELISA*, Clin. Chem. 33, 2185-2190.
- 2) Martinez, J. y Coll, J.M. (1988). *Selection and clinical performance of monoclonal antibody C-reactive protein in ELISA quantitative assay*. Clin. Chim. Acta (en prensa).
- 3) Coll, J.M. (1987). *La industria española y las nuevas biotecnologías*. Biotecnología para empresarios. Curso organizado por el C.S.I.C. Febrero 1987. Barcelona.
- 4) Coll, J.M. (1988). *Production and performance of enzyme-immunoassay kits in microtiter plates*. Reviews on Immunoassay Technology. MacMillan Press Ltd. (en prensa).