

## Relevancia clínica del diagnóstico, análisis y compensación de la varianza heterogénea en ELISA comerciales

► Víctor Manuel Cárdenas Delgado<sup>1a,b</sup>

<sup>1</sup> Doctor de la Universidad de Buenos Aires, área Farmacia y Bioquímica, Especialista en Inmunología Clínica.

<sup>a</sup> Laboratorio de Virología y Autoinmunidad, Laboratorio Mantel, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

<sup>b</sup> Facultad de Medicina, IUCS Fundación HA Barceló, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

### Resumen

La compensación de la varianza no uniforme en inmunoensayos plantea un desafío al bioquímico que valida pruebas semicuantitativas. Su impacto positivo en la estimación de los coeficientes de la curva de calibración redundante en una mejora del ajuste y la exactitud en el reporte de resultados que respaldan la toma de decisiones clínicas en autoinmunidad. Dos alternativas se han descrito en la literatura: la regresión por mínimos cuadrados ponderados (MC) y la transformación de los datos experimentales. La ventaja de la transformación radica en que es menos laboriosa, aunque para asignarle prioridad debería demostrarse la equivalencia entre los dos abordajes en ELISA comerciales. Fue objetivo del presente trabajo diagnosticar la heterocedasticidad y verificar si el procedimiento de transformación resulta equivalente a la regresión por MC ponderados en el ámbito clínico. Se llevó a cabo el ELISA para determinación semicuantitativa de los Ac IgG anti- $\beta$ -2-glicoproteína I en suero. Se diagnosticó la heterocedasticidad por análisis gráfico de los residuos del ajuste: su representación reveló un patrón en "abanico", confirmando la heterogeneidad de la varianza. Para verificar la equivalencia se tomó como criterio de evaluación el cambio en el perfil gráfico de los residuos y el cálculo inverso de las concentraciones de calibrador. En conclusión, la regresión por MC ponderados y la transformación logarítmica de los datos resultaron equivalentes en la gestión de la heterocedasticidad. Por lo tanto, es válido priorizar la transformación para imprimir así más velocidad al procesamiento de datos de ELISA comerciales.

**Palabras clave:** ELISA; Validación; Calibración; Inmunoensayos; Regresión no lineal; Varianza

*Clinical relevance of diagnosis, analysis and compensation of heterogenous variance in commercial ELISAs*

### Abstract

Compensation of nonuniform variance in immunoassay calibration poses a challenge for biochemists that validate quantitative tests. Its positive impact on calibration curve coefficient estimation implies an improvement in both adjustment and accuracy of the results that support clinical decision-making in autoimmunity. Two alternatives serving this purpose have been described in the literature: weighed least-squares (WLS) regression and experimental data transformation. Although transformation has the advantage of being less effort-demanding, equivalence among these two approaches has not been yet

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)



COLABIOCLI



CUBRA



FABA

verified in the case of commercial ELISAs. The objective of this work is to diagnose heteroscedasticity and to verify whether the transformation procedure is equivalent to WLS regression in the clinical realm. An ELISA has been performed for semiquantitative assessment of serum IgG anti- $\beta$ -2-glycoprotein I Ab. Diagnostic of heteroscedasticity was achieved by graphical analysis of residual plots from non-weighted regression. Anti- $\beta$ -2-glycoprotein I Ab assay presented a characteristic fan-like shape in residual plots, thus confirming the presence of heteroscedastic variance. In order to verify the equivalence among WLS and data transformation, both change in graphical profile of residuals and back-fitted concentrations were part of the evaluation criterion. To sum up, it has been found that WLS regression and logarithmic transformation of data were equivalent regarding the management of heteroscedasticity. Consequently, prioritising transformation to increase agility in data processing of commercial ELISAs is a valid procedure.

**Keywords:** ELISA; Validation; Calibration; Immunoassay; Non-linear regression; Variances

## Relevância clínica do diagnóstico, análise e compensação da variância heterogênea em ELISAs comerciais

### Resumo

A compensação da variância não uniforme em imunoenaios coloca um desafio para o bioquímico que valida testes semiquantitativos. Seu impacto positivo na estimativa dos coeficientes da curva de calibração resulta em uma melhora no ajuste e na exatidão na apresentação dos resultados, os quais sustentam a tomada de decisões clínicas em autoimunidade. Duas alternativas foram descritas na literatura: a regressão por mínimos quadrados ponderados (MQP) e a transformação dos dados experimentais. A vantagem da transformação está no fato de ser menos trabalhosa, embora, para que ela fosse priorizada, deveria ser demonstrada a equivalência entre as duas abordagens em ELISAs comerciais. O objetivo do presente trabalho é diagnosticar a heterocedasticidade e verificar se o procedimento de transformação é equivalente à regressão por MQP no contexto clínico. Foi realizado o ELISA para determinação semiquantitativa de anticorpos IgG anti- $\beta$ -2-glicoproteína I em soro. A heterocedasticidade foi diagnosticada por meio da análise gráfica dos resíduos do ajuste: sua representação revelou um padrão em "leque", confirmando a heterogeneidade da variância. Para verificar a equivalência, foram adotados como critérios a alteração no perfil gráfico dos resíduos e o cálculo inverso das concentrações de calibrador. Conclui-se que a regressão por MQP e a transformação logarítmica dos dados mostraram-se equivalentes na gestão da heterocedasticidade. Portanto, é válido priorizar a transformação, a fim de acelerar o processamento dos dados de ELISAs comerciais.

**Palavras-chave:** ELISA; Validação; Calibração; Imunoenaios; Regressão não linear; Variância

## Introducción

Una variedad de técnicas inmunoquímicas está en pleno uso en la actualidad, con aplicación en campos tan diversos como el monitoreo de drogas terapéuticas, autoinmunidad e infectología. En contraste con los ensayos cuantitativos de la química clínica, para brindar una estimación semicuantitativa del analito, los inmunoenayos se valen de una señal analítica que depende del punto final de una reacción antígeno (Ag)-anticuerpo (Ac). A causa de esto se los inscribe para su estudio en la órbita de los ensayos de unión de ligando (EUL), en los cuales todo factor que incida sobre dicha interacción tendrá repercusión en la magnitud medida (1) (2). El profesional bioquímico que ejecuta estas técnicas inmunoquímicas, ya sea manuales o semiautomatizadas, se enfrenta cotidianamente al problema de

definir el mejor ajuste para los datos de calibración. Se sabe que la distribución de los datos experimentales en inmunoenayos presenta un patrón sigmoideo (3) (4) descrito por el modelo logístico de 4 parámetros (4PL): especificar la curva estándar de un ELISA según este modelo implica hallar sus coeficientes o parámetros, los cuales se pueden estimar por medio de una regresión no lineal aplicando el método de mínimos cuadrados (MC) ordinarios. En este procedimiento estadístico se busca minimizar la suma de cuadrados de los residuos ( $Y_{\text{observada}} - Y_{\text{prevista}}$ ) o, puesto en términos de la representación gráfica, que la distancia vertical de la respuesta experimental a la curva de regresión sea la menor posible. En primera instancia, no se demanda esfuerzo de cálculo al profesional dado que el algoritmo que permite esta acción está incorporado al *software* de estadística. Sin embargo, el examen minucioso de

los residuos del ajuste revelaría en muchos casos un aspecto que, aunque habitualmente relegado en la etapa de procesamiento de datos, viola uno de los supuestos sobre los que reposa el análisis: el fenómeno de heterocedasticidad o varianza no uniforme de la respuesta. En efecto, conforme aumentan las concentraciones del calibrador, la dispersión en la respuesta es cada vez mayor, lo que invalida la aplicación del ajuste por MC ordinarios. Dado que la heterocedasticidad es más bien el resultado del equilibrio de interacción a partir del cual se obtiene la señal y no de la calidad de los reactivos o el instrumental empleados (5), no existe recurso o artificio técnico que permita al bioquímico deshacerse de esta restricción al análisis de regresión por MC ordinarios. Es conocido que un ajuste incorrecto de la curva estándar incrementa potencialmente el error sistemático y representa una pérdida de exactitud. Ante este escenario, la búsqueda de estrategias para atenuar su impacto en el informe de resultados se torna una necesidad. En contraste con la modesta atención de que han sido objeto en el ámbito de las técnicas en fase sólida aplicadas a la clínica, la heterocedasticidad y la modelización de la varianza se estudiaron de forma exhaustiva en RIA (6). Como resultado de estos trabajos, se recomiendan dos abordajes para su compensación: el ajuste de MC ponderados con previa estimación de la estructura de la varianza o bien la técnica de transformación de los datos de la respuesta (7).

En el método de regresión por MC ponderados se empieza por postular que los cambios de la varianza pueden pronosticarse de manera sistemática a partir de otra variable. En su modelización exponencial más empleada, la varianza ( $\sigma^2$ ) es proporcional a una potencia de la respuesta o señal ( $Y$ ) (8).

$$\sigma_y^2 = a_0 Y^\theta \tag{Ec. 1}$$

$a_0$  = constante

Está implícito en la expresión precedente que el parámetro de potencia  $\theta$  (*theta*) puede estimarse por técnicas de regresión. Una vez conocido el valor de  $\theta$  se construye entonces la función de ponderación que asignará distintos "pesos" a los puntos de calibración de acuerdo con su varianza. El ajuste 4PL por MC ponderados constituye así un recurso apto para la compensación de la heterocedasticidad en virtud de que ayuda a establecer una suerte de jerarquía entre los datos experimentales: la curva estándar se encontrará más "suelta" en los puntos de mayor dispersión y más "ajustada" a los puntos de menor dispersión. Este "pesaje" resulta entonces proporcional a la variabilidad de la respuesta en el rango de concentración de trabajo. Una vez especificada la forma de la varianza se estiman los parámetros del modelo de regresión 4 PL por regresión iterativa del método de MC ponderados (9).

Una alternativa consiste en transformar los datos mediante una función que induzca uniformidad en la varianza para satisfacer así los supuestos del modelo de regresión por MC ordinarios. Con los datos ya transformados se pueden estimar los parámetros de la curva de calibración ajustando el modelo 4PL sin ponderación. Si bien algunas posturas recomiendan un cambio de modelo debido al aspecto que adquiere la nueva distribución de datos en el *scatterplot* (10), transformar la respuesta no implica necesariamente el abandono de este ajuste (7).

Textos consagrados al análisis de los EUL destacan que existe una correspondencia entre las diversas funciones de transformación propuestas (logarítmica, recíproca, raíz cuadrada) según el valor que asume  $\theta$  bajo el modelo de la varianza como potencia de la media (1). De cumplirse esto también para ELISA comerciales, sería válido usar el valor  $\theta$  como índice para seleccionar la función de transformación adecuada en lugar de aplicar los MC ponderados en la compensación de la heterocedasticidad. Pero si se pretende priorizar la transformación para ganar agilidad en el procesamiento de datos es requisito que las dos propuestas sean equivalentes en cuanto al objetivo de uniformar la varianza. En este trabajo se trata de verificar esta equivalencia para confirmar así si es lícito extrapolarla al dominio de los inmunoensayos comerciales en fase sólida (ELISA) usando herramientas accesibles al bioquímico en ejercicio.

Puesto que el volumen creciente de trabajo en el laboratorio clínico y los exigentes tiempos de respuesta imponen una gestión eficiente de recursos, resulta de interés determinar si la transformación arroja resultados comparables a la regresión por MC ponderados en la compensación de la heterocedasticidad durante la calibración del ELISA. En este contexto desafiante y de alta demanda, constituye sin duda una ventaja competitiva para el bioquímico contar con una función de transformación que imprima más velocidad a la calibración (10) al volver automáticamente homocedástica la relación respuesta-concentración. Así, se presentan métodos gráficos y analíticos para diagnosticar heterocedasticidad en los datos de calibración. A continuación, se la compensará por MC ponderados y transformación de la respuesta y se estudiará la equivalencia entre los dos abordajes. Para esto, se tratará en primer lugar de verificar sobre la base del análisis de residuos si se cumple la correspondencia citada entre la función de transformación seleccionada y la regresión por MC ponderados en el caso de inmunoensayos comerciales. En segundo lugar, se determinará la bondad de ajuste de los dos abordajes por el cálculo inverso de las concentraciones de calibrador (3) (11).

En resumen, este trabajo verifica la equivalencia entre la transformación de datos y la regresión por MC ponderados en la gestión de la heterocedasticidad de ELISA comerciales. Ya libre de su influencia sobre el ajuste de la curva estándar, se puede asumir que el pro-

cedimiento analítico experimenta mejora en la exactitud. Es objetivo, además, que estas herramientas sirvan para estimular la reflexión en el profesional a cargo del procesamiento y supervisión de datos derivados de inmunoensayos. Ampliar el repertorio de técnicas estadísticas al servicio de una calibración eficiente es parte no menor del compromiso de más vasto alcance que el profesional asume de forma continua: garantizar la calidad de las prestaciones del laboratorio clínico. En este marco, indudablemente forma parte de una etapa crítica el ajuste del modelo para la curva estándar, de cuya elección dependerá en lo inmediato el informe de resultados y su evaluación preliminar por el personal médico. Jerarquizar esta instancia del trabajo bioquímico es fundamental, habida cuenta de que, más allá de la pericia individual en la ejecución de técnicas manuales o la voluntad de una organización de plegarse a los cambios tecnológicos, una calibración deficiente podría malograr un trabajo que pretende ser exponente de altos estándares.

## Materiales y Métodos

### Ensayo de ELISA

Se llevó a cabo el ensayo de ELISA para determinación semicuantitativa de los Ac IgG anti- $\beta$ -2-glicoproteína I en suero según las recomendaciones del fabricante (Orgentec Diagnostika, Mainz, GE). En este *kit* comercial la curva estándar se define a partir de seis niveles del calibrador (suero de EN Harris, Louisville y material de referencia específico para IgG IRP 97/656) comprendidos en el rango de 0-100 U/mL con un punto de corte en 8 U/mL (0; 6,3; 12,5; 25; 50; 100 U/mL). Se utilizaron seis replicados de la curva de calibración. En todos los casos la variable dependiente se refiere a la densidad óptica (DO) medida a 450 nm ( $DO_{450nm}$ ). Todos los ensayos se llevaron a cabo de manera semiautomatizada en el equipo ALISEI (Radim Diagnostics, Freiburg, GE). Para el análisis estadístico se utilizó el *software* GraphPad Prism v8.0.1 (GraphPad Software, Inc.).

### Diagnóstico de heterocedasticidad

La representación de residuos es un pilar básico en el análisis de regresión. Por lo tanto, para reconocer la falta de uniformidad en la varianza se analizaron los residuos del ajuste de la curva de calibración obtenida por MC ordinarios. En este método se trata de minimizar la suma de cuadrados:

$$\sum_{i=1}^J (y_i - y_{prevista})^2 \quad (\text{Ec. 2})$$

$y_i$  = valor de respuesta obtenido experimentalmente.

$y_{prevista}$  = valor de respuesta pronosticado por el modelo.

Teniendo en cuenta la subjetividad del análisis gráfico, se apeló a una variedad de trazados para aumentar el grado de certeza de las conclusiones:

1. residuos *vs.* DO prevista,
2. residuos *vs.* log (concentración),
3. residuos absolutos *vs.* DO prevista,
4. cuadrado de los residuos *vs.* DO prevista,
5. log (residuos absolutos) *vs.* DO prevista y
6. raíz cúbica del cuadrado de los residuos *vs.* DO prevista.

Para diagnosticar la heterogeneidad de la varianza se dio preferencia al trazado de los residuos del ajuste por MC ordinarios (residuos *vs.* DO predicha). Si la dispersión de los residuos no es uniforme en torno al 0 y presenta un patrón reconocible, se puede pensar que la varianza es heterocedástica y, por lo tanto, la aplicación del ajuste no ponderado se ve invalidada. En el resto de las representaciones de los residuos también se recurrió a la inspección visual en busca de patrones (en “embudo”, en “abanico”) que confirmen el diagnóstico. Como complemento a este criterio subjetivo se aplicó la prueba de correlación de Spearman según lo recomendado por Carroll y Ruppert (7).

En resumen, en las representaciones 3-, 4-, 5- y 6- de la enumeración precedente se efectuaron transformaciones de los residuos con el objetivo de mejorar el reconocimiento de la estructura de la varianza por medio del análisis gráfico.

### Regresión por mínimos cuadrados ponderados

Una vez detectada la heterocedasticidad en la respuesta por medio de alguno de los gráficos mencionados, se procedió a hacer la ponderación de los datos. Para ello, se “pesó” la contribución de cada punto experimental al ajuste de la curva estándar operando con el recíproco de la varianza prevista en cada uno de esos puntos. Es requisito entonces hacer explícita la función que la describe.

### Modelización de la varianza y determinación del parámetro $\theta$

En este trabajo se parte de la premisa que el análisis de la estructura de la varianza desarrollado para radioinmunoanálisis (RIA) puede extrapolarse al dominio del ELISA comercial (3). En línea con esta propuesta, la varianza ( $\sigma^2$ ) se expresa como función de una potencia de la media de la respuesta ( $\bar{Y}$ ) prevista según (4):

$$\sigma_{\bar{Y}}^2 = a_0 \bar{Y}^\theta \quad (\text{Ec. 3})$$

$a_0$  = constante

$\theta$  = parámetro estructural de la varianza

$\bar{Y}$  = media de la respuesta prevista por el modelo 4PL

Donde una transformación logarítmica del modelo conduce a la expresión:

$$\log(\sigma_Y^2) = \log(a_0) + \theta \log(\bar{Y}) \tag{Ec. 4}$$

que revela ahora la posibilidad de hallar el parámetro por una técnica gráfica, si se considera que éste es numéricamente igual a la pendiente de la recta de regresión  $\log(\sigma_Y^2)$  vs.  $\log(\bar{Y})$  ajustada por MC ordinarios. Se puede aplicar la regresión lineal no ponderada en este caso ya que se sabe que el logaritmo de la varianza muestral se distribuye normalmente e induce uniformidad en la dispersión (12).

Sobre la base de que la función que describe el cambio de  $Y$  (DO) con el predictor (nivel de calibrador) es el modelo 4PL, ahora se puede hacer la ponderación de los datos experimentales para minimizar la suma de cuadrados. La contribución de cada punto de la curva se “pesa” según la función de ponderación (5):

$$\frac{1}{Y^\theta} \tag{Ec. 5}$$

Los *softwares* estadísticos le asignan al parámetro  $\theta$  valores predeterminados de 1 o 2; no obstante, se recomienda estimar su valor por el procedimiento gráfico citado, ya que en ciertas aplicaciones de los ensayos de unión de ligando  $\theta$  puede tomar valores  $<1$  (3) (12). Una vez conocido el valor de  $\theta$ , se hace la ponderación de los datos y se estiman los coeficientes de modelo 4PL por el procedimiento de regresión por MC ponderados:

$$Y = D + \frac{(A - D)}{\left(1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B\right)} \tag{Ec. 6}$$

En esta expresión del modelo logístico de cuatro parámetros  $A$  es la asíntota inferior,  $D$  es la asíntota superior,  $C$  es el punto de inflexión (también denominado IC50) y  $B$  es la pendiente de Hill o primera derivada. El proceso se puede iterar actualizando en cada oportunidad los “pesos” hasta que se alcancen los valores de convergencia de dichos parámetros (1).

Dado que es más habitual trabajar con el desvío estándar ( $\sigma$ ), se podría hallar el parámetro  $\theta$  a partir de una técnica gráfica equivalente propuesta por Rodbard (6), teniendo en cuenta que, por definición, el desvío estándar es la raíz cuadrada de la varianza:

$$\sigma = \sqrt{\sigma^2} \tag{Ec. 7}$$

$$\sigma = \sqrt{a_0 \bar{Y}^\theta} \tag{Ec. 8}$$

$$\sigma = \sqrt{a_0 \bar{Y}^\theta} = a_0^{\frac{1}{2}} \bar{Y}^{\frac{\theta}{2}} = k \bar{Y}^{\frac{\theta}{2}} \tag{Ec. 9}$$

$k$  = constante

La última expresión es válida bajo el modelo de la varianza como potencia de la media. La transformación logarítmica una vez más simplifica, como en (Ec. 4), la estimación de  $\theta$ :

$$\log(\sigma) = \log(k) + \frac{\theta}{2} \log(\bar{Y}) \tag{Ec. 10}$$

Donde ahora la pendiente de la recta de regresión ajustada por MC ordinarios es numéricamente igual a  $\theta/2$ .

Por lo tanto, corresponde llevar a cabo la ponderación de los datos según la función:

$$\frac{1}{Y^{\frac{\theta}{2}}} = \frac{1}{Y^\theta} \tag{Ec. 11}$$

Esta expresión termina siendo idéntica a Ec. 5. De aquí procede la recomendación (3) (13) de multiplicar por 2 la pendiente de la recta  $\log(\sigma)$  vs.  $\log(Y)$  en la función de ponderación: representar la transformación logarítmica del desvío estándar implica que la pendiente de la recta de regresión será igual a  $\theta/2$ . El procedimiento se puede simplificar incluso más si se omite el cálculo del desvío estándar para estimarlo directamente a partir de los residuos absolutos del ajuste (7), en cuyo caso la pendiente de la recta de regresión  $\log(\text{residuos absolutos})$  vs.  $\log(\text{DO prevista})$ , también arroja como valor de la pendiente una estimación de  $\theta/2$ .

En este trabajo se operó con los trazados correspondientes a la Ec. (4), Ec. (10) y a la representación de  $\log(\text{residuos absolutos})$  vs.  $\log(\text{respuesta } Y \text{ media})$  para comprobar la equivalencia de los tres abordajes en la determinación del valor del parámetro  $\theta$  y unificar así criterios que se presentan de forma dispersa en la literatura. Los tres trazados convergen en el mismo valor de  $\theta$ .

Cabe aclarar que si bien se emplearon hasta aquí los símbolos correspondientes a varianza poblacional ( $\sigma_Y^2$ ) y desvío estándar poblacional ( $\sigma_Y$ ), se opera en la sección Resultados con valores muestrales representativos de la población ( $s^2$  y  $s$  respectivamente).

### Función de transformación

Se ha señalado que existe una correspondencia entre la función de transformación seleccionada y la función de ponderación en la regresión por MC (1) según el valor que asuma el parámetro estructural de la varianza  $\theta$ . Una vez estimada  $\theta$  por medio del análisis gráfico, se seleccionó la función de transformación adecuada según lo estipulado por la Tabla I y se determinó si existía equivalencia entre el procedimiento de transformación y el ajuste por MC ponderados. Se tomó como criterio de evaluación el cambio en el perfil gráfico de los residuos (para el análisis de heterocedasticidad) y el cálculo inverso de las concentraciones de calibrador (para el análisis de la bondad de ajuste) (Tabla I).

Tabla I. Correspondencia entre la función de ponderación y funciones de transformación

Relación entre $\sigma$ y la respuesta Y	Pendiente	Función de ponderación	Transformación que estabiliza la varianza
$\sigma_y \propto Y^2$	2	$1/Y^4$	Recíproco
$\sigma_y \propto Y$	1	$1/Y^2$	Log
$\sigma_y \propto Y^{0.5}$	0,5	$1/Y$	Raíz cuadrada
$\sigma_y$ constante	0	1	Ninguna

Equivalencia postulada entre la función a utilizar en la regresión por CM ponderados y la transformación que compensa la heterogeneidad de la varianza para ensayos de unión de ligando (2).

## Evaluación de la bondad del ajuste

Se utilizó el procedimiento de cálculo inverso de las concentraciones de los calibradores o *back-calculated concentrations* (2), en el cual se trata a los calibradores como muestras incógnitas, interpolando en la curva estándar su DO. La exactitud del ajuste dependerá del error relativo (ER%) de cada calibrador.

$$ER\% = \frac{(x_0 - x_{nom})}{\bar{x}_{nom}} 100\% \quad (\text{Ec. 12})$$

$x_0$  = concentración del calibrador obtenida por interpolación en la curva estándar.

$x_{nom}$  = concentración nominal del calibrador declarada por el fabricante.

Y la precisión del ajuste dependerá del coeficiente de variación (CV%).

$$CV\% = \frac{S}{\bar{x}} 100\% \quad (\text{Ec. 13})$$

Un ajuste se considera apropiado si puede mantener la exactitud y la precisión en valores comprendidos entre  $ER\% = \pm 20\%$  y  $CV\% = \pm 20\%$ .

La superioridad de un ajuste con respecto a otro se define según el número de calibradores, interpolados como muestras incógnitas, que presenten concentraciones halladas por cálculo inverso comprendidas entre esos niveles de precisión y exactitud (3) (11) (14).

Cabe destacar que, pese a que la propuesta de variantes para la representación de residuos busca reducir la incertidumbre en la detección visual de heterocedasticidad, su interpretación no deja de poner en juego un alto grado de subjetividad por parte del operador. Asimismo, la valoración del nivel de heterocedasticidad y su compensación reposan una vez más en una estimación de la tasa de incremento de la dispersión y en el análisis gráfico. Otra limitación metodológica radica en que no se propone una prueba estadística para confirmar el valor

de convergencia de  $\theta$  en la etapa de modelización de la varianza.

Bajo una visión más formal, la inspección visual de una tendencia podría resultar evidencia insuficiente para juzgar si la heterogeneidad de la varianza amerita un trabajo de compensación.

## Consideraciones éticas

El presente trabajo y sus resultados se rigieron por el código ético de la OMS (Declaración de Helsinki) (<http://wma.net/s/ethicsunit/helsinki.htm>). No se incluyeron pacientes ni modelos animales en el diseño del estudio.

## Resultados

Se trabajó con seis replicados de los calibradores del *kit* para determinación semicuantitativa de los Ac IgG anti- $\beta$ -2-glicoproteína I en suero. La curva estándar se ajustó con el modelo 4PL por MC ordinarios (Fig. 1).

Los residuos del ajuste están representados según las alternativas ya expuestas en Materiales y Métodos (Fig. 2), en las que se destaca un perfil en “embudo” o “abanico” que revela una variabilidad creciente conforme aumenta el nivel de la respuesta (Fig. 2A) o el predictor (Fig. 2B). El trabajo con los residuos absolutos (Fig. 2C) puede ayudar a identificar heterogeneidad de la varianza en los casos en que la inspección visual del trazado no sea concluyente por pronunciada falta de simetría (4). Este análisis gráfico se complementó con el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman. Al operar con el cuadrado de los residuos (Fig. 2D) la distribución de puntos mostró nuevamente valores positivos y dispersión no uniforme, si bien se aumenta el riesgo potencial de generar puntos aberrantes u *outliers* que complican el análisis de regresión. Esta transformación resulta eficaz en caso de que se hallase diferencia en los patrones de dispersión de residuos positivos y negativos, pero a expensas de generar puntos que se van de escala si es grande su valor absoluto. Por otro lado, por la distribución sesgada a que da lugar (*Chi* cuadrado,  $\chi^2$ ), el cuadrado de los residuos puede afectar la tendencia original de la variable. Mientras que la transformación logarítmica (Fig. 2E) es un recurso útil para compensar las cuestiones de escalado, la raíz cúbica del cuadrado de los residuos, o transformación de Wilson-Hilferty, (Fig. 2F) compensa el sesgo a la derecha al normalizar la distribución de la variable. En resumen, por obra de ambas transformaciones se facilita la valoración gráfica de la estructura de la varianza. Tanto la Fig. 2E como la 2F constituyen entonces transformaciones de los residuos cuyo trazado ayuda

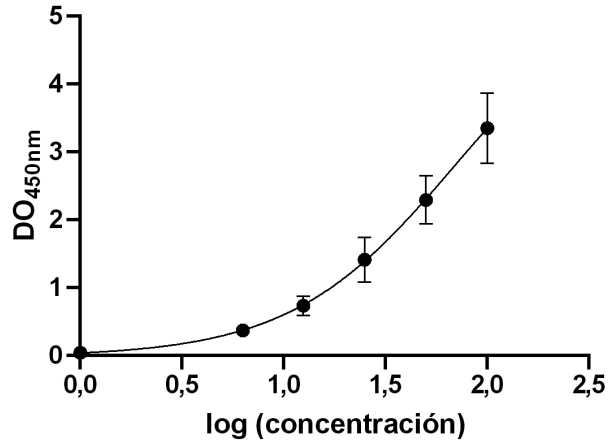


Figura 1. Curva de calibración del ensayo comercial para determinación de anticuerpos anti-β-2-glicoproteína I conforme a las recomendaciones del fabricante. Se ajustó el modelo 4PL por el método de mínimos cuadrados (MC) ordinarios. DO<sub>450 nm</sub>: densidad óptica medida a 450 nm. Se representa en cada punto el desvío estándar como medida de dispersión.

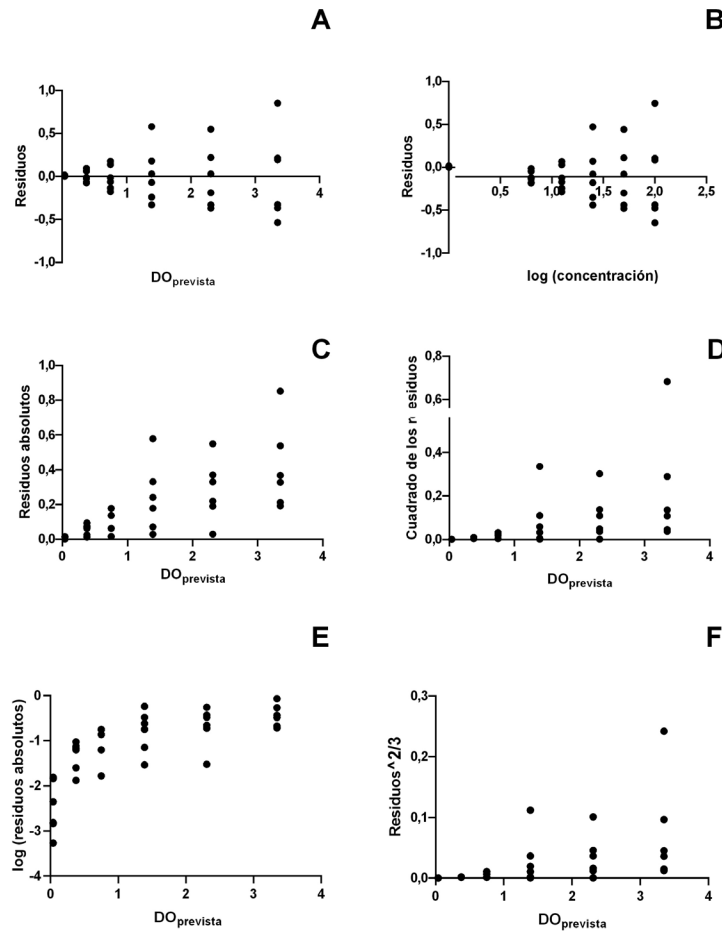


Figura 2. Variantes de la representación de residuos para mejorar la sensibilidad en la detección de la heterocedasticidad.

En todos los casos se verifica el patrón en “embudo” o “abanico”.

A. Trazado de residuos del ajuste 4PL por MC ordinarios vs. variable de respuesta. B. Trazado de residuos del ajuste 4PL por MC ordinarios vs. variable predictora. C. Trazado de los residuos absolutos del ajuste 4PL por MC ordinarios vs. variable de respuesta. El fin es corregir la asimetría del perfil para aumentar la sensibilidad en la valoración de la heterocedasticidad. D. Trazado del cuadrado de los residuos del ajuste 4PL por MC ordinarios vs. variable de respuesta. El fin es corregir la asimetría del perfil para aumentar la sensibilidad en la valoración de la heterocedasticidad. E. Trazado del logaritmo decimal de los residuos del ajuste 4PL por MC ordinarios vs. variable de respuesta. Esta transformación mitiga los problemas derivados de los puntos fuera de escala del trazado 2D. F. Trazado de la raíz cúbica del cuadrado de los residuos del ajuste 4PL por MC ordinarios vs. variable de respuesta. Esta transformación normaliza la distribución sesgada del trazado 2D, facilitando el reconocimiento de la heterocedasticidad.

a dejar claro que se está en presencia de una varianza heterocedástica.

Una alternativa descrita en la literatura propone determinar gráficamente la presencia de heterocedasticidad por trazado del desvío estándar *vs.* variable predictora, para luego examinar si el patrón de dispersión es o no uniforme (5) (Fig. 3). En cambio, en el presente trabajo se priorizó la operación con los residuos o con una transformación de éstos.

Por lo tanto, a partir de la representación de los residuos y sus variantes en la Fig. 2, seguida del examen visual de las tendencias, se concluyó que es necesario buscar un método para compensar la heterocedasticidad del ensayo, ya que el Estatrón de dispersión de la variable dependiente no era uniforme en ninguno de los gráficos analizados, ya sea que aumentase la variable predictora o bien la variable independiente.

Todos los trazados de la Fig. 2 sirvieron al propósito de dar una idea de la estructura de la varianza. Frente a la cuestión acerca de cuándo es relevante efectuar la compensación de la heterocedasticidad, se ha propuesto el trazado de una curva suavizada o *smooth* (Fig. 4) de residuos *vs.* DO prevista para evaluar la tasa o factor de cambio del desvío estándar en el rango de trabajo. Existe consenso en que un valor umbral  $\geq 3$  justifica estimar los parámetros 4PL haciendo la ponderación de los datos (7). En el caso examinado aquí el factor resultó de 14,2 (0,369/0,026), lo cual representa un grado no despreciable de heterocedasticidad.

Se ha planteado en la introducción la posibilidad de hacer la regresión por MC ponderados, para lo cual se postula que la varianza sigue el modelo de potencia de la media (Ec. 3). En este modelo, el parámetro  $\theta$  se puede estimar por la representación de Rodbard (6) y construir así la función de ponderación. Especificar

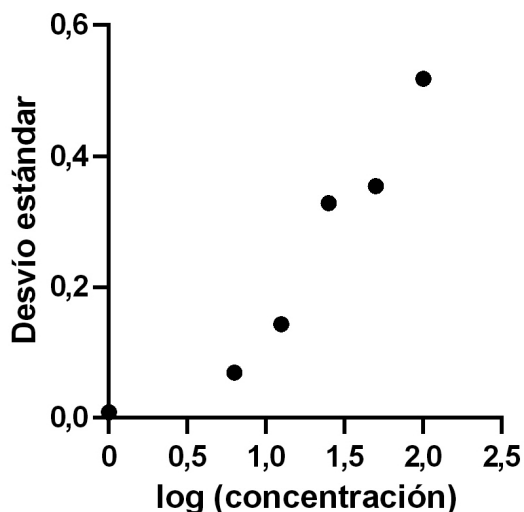


Figura 3. Valoración gráfica de la heterocedasticidad. La dispersión aumenta con el nivel de variable predictora.

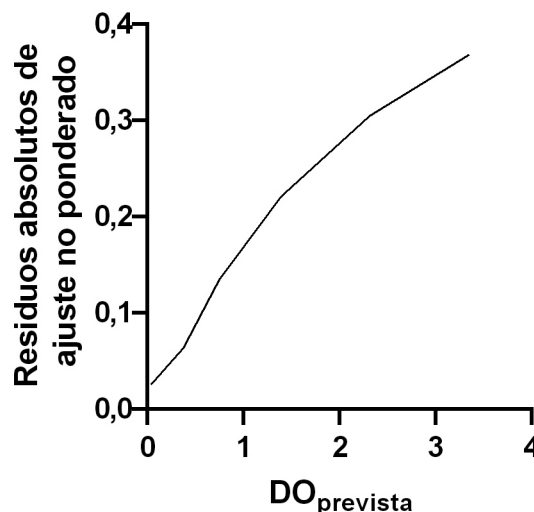


Figura 4. Curva suavizada o *smooth* de los residuos absolutos *vs.* variable de respuesta. La tasa de incremento de la varianza se puede evaluar como 14,2 (0,369/0,026) que es mayor al umbral definido arbitrariamente en 3

el parámetro  $\theta$  por esta técnica gráfica presenta ventajas sobre la adopción del valor empírico propuesto por los paquetes estadísticos, donde usualmente es sub o sobreestimado. Al ajustar ahora el modelo 4PL, la heterocedasticidad se compensa haciendo la ponderación de cada una de las observaciones por el recíproco de la varianza ( $1/Y^\theta$ ) en ese punto experimental.

El ajuste lineal (6) por MC ordinarios (Fig. 5) de la representación del desvío estándar  $s$  expresado en la Ec. (14) tuvo como pendiente un valor de 0,9623 (IC 95%=0,8357-1,089).

$$\log (s)=\log (k)+\theta / 2 \log \left(D O_{\text {prevista }}\right) \quad (\text { Ec. } 14)$$

Se ha señalado en la literatura que es posible estimar el desvío estándar a través de los residuos absolutos del ajuste no ponderado (7); para comprobar que es válida esa afirmación se ajustó una recta a la representación de  $\log$  (residuos absolutos) *vs.*  $\log$  ( $D O_{\text {prevista }}$ ), cuya pendiente tomó el valor de 1,040 (IC 95%=0,8247-1,255). (Fig. 6). Se aclaró previamente que en estas dos representaciones la pendiente corresponde a  $\theta / 2$ , por lo que se puede concluir que en el caso analizado el parámetro toma un valor de aproximadamente 2. Operando directamente con la varianza muestral  $s^2$ , (Fig. 7) la recta de regresión (12)

$$\log \left(s^2\right) \text { vs. } \log \left(D O_{\text {prevista }}\right) \quad (\text { Ec. } 15)$$

que sigue la expresión

$$\log \left(s^2\right)=\log \left(a_0\right)+\theta \log \left(D O_{\text {prevista }}\right) \quad (\text { Ec. } 16)$$

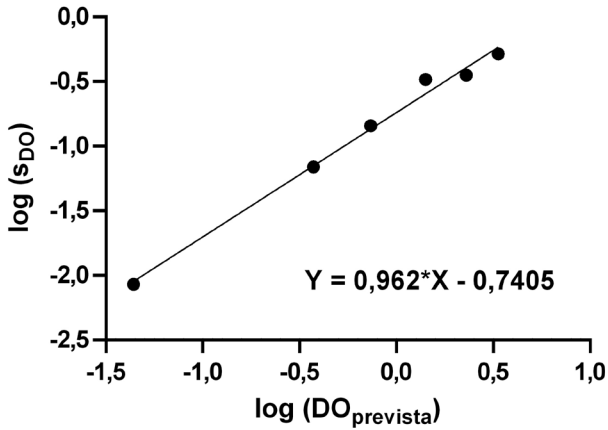


Figura 5. Modelización de la varianza. Modelo de Rodbard. La pendiente de la recta de regresión es igual a  $\theta/2$ . Con ese factor se puede efectuar la regresión por MC ponderados

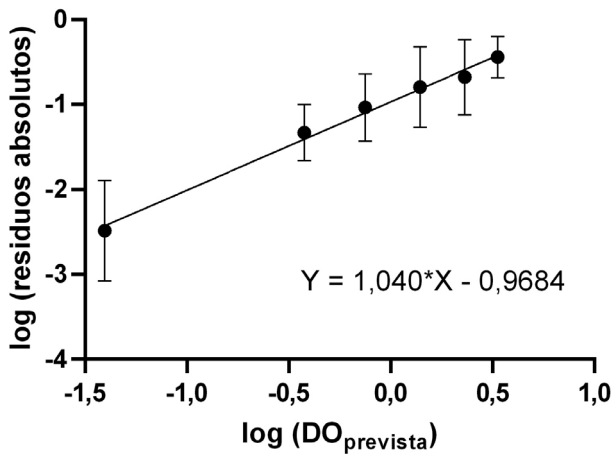


Figura 6. Modelización de la varianza. El valor absoluto de los residuos del ajuste por MC ordinarios estima el valor del desvío estándar. La pendiente de la recta de regresión es igual a  $\theta/2$ . Con este factor se puede efectuar la regresión por MC ponderados

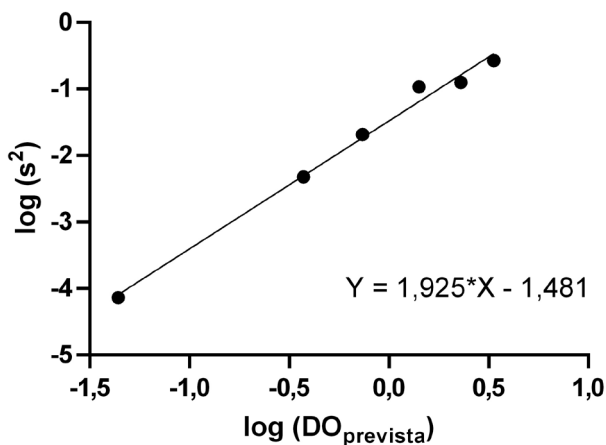


Figura 7. Modelización de la varianza. Modelo de Levasseur. Operando con log (varianza muestral), la pendiente de la regresión es igual a  $\theta$ . Con este factor se puede efectuar la regresión por MC ponderados

mostró una pendiente de 1,925 (IC 95%=1,671-2,178) (Fig. 7), que coincide con la estimación del parámetro  $\theta \sim 2$ . El valor de  $\theta$  sugiere que se está frente a un modelo de coeficiente de variación constante (1). En resumen, a partir de cualquiera de las tres estimaciones gráficas que se desprenden de las Ec. (14), la Ec. (16) y el trazado de log (residuos absolutos) vs. log (DO<sub>prevista</sub>), el parámetro estructural  $\theta$  converge en un valor de aproximadamente 2, por lo que se puede asumir la equivalencia de los tres enfoques en la modelización de la varianza para los ensayos de ELISA.

Para obtener los coeficientes del modelo 4PL en el procedimiento de regresión no lineal por MC ponderados, se toma entonces la función de ponderación

$$1/Y^\theta = 1/Y^2 \quad (\text{Ec. 17})$$

de manera de minimizar la suma de cuadrados (Fig. 8). Al estimar los parámetros del modelo (Tabla II), el cambio es más importante en el error estándar que en su valor absoluto. El perfil de los residuos se modifica como consecuencia de la ponderación; su distribución es ahora más uniforme conforme cambia la DO prevista o la variable predictora (Fig. 9A y Fig. 9B respectivamente). Para destacar estos cambios, se ajustó una curva *smooth* o suavizada a los residuos absolutos del ajuste 4PL con y sin ponderación de los datos (Fig. 10).

De acuerdo con lo expresado por la Tabla I, si el parámetro  $\theta=2$ , aplicar la función de ponderación  $1/Y^2$  seguida del ajuste de la curva estándar por MC ponderados sería equivalente a efectuar una transformación logarítmica de la respuesta (7) (1) para luego ajustar la curva estándar por MC ordinarios. Algunos profesionales pueden encontrar más ágil el procesamiento de datos de calibración empleando este último enfoque ya que la función de transformación automáticamente vuelve homocedástica a la varianza (10). El trazado con la variable Y transformada

Tabla II. Coeficientes del modelo 4PL estimados por regresión por MC ordinarios y MC ponderados ( $1/Y^2$ )

	MC ordinarios	MC ordinarios	MC ponderados	MC ponderados
Parámetros 4PL	Media	Error estándar	Media	Error estándar
D	5,588	1,949	5,368	1,568
A	-0,018	0,1547	-0,008	0,019
Log (IC50)	1,836	0,2812	1,804	0,222
Pendiente de Hill	1,081	0,2988	1,115	0,154

Coefficientes del modelo logístico de 4 parámetros estimados por regresión no lineal. Se presentan sus valores y el error estándar del ajuste por MC ordinarios y MC ponderados. A es la asíntota inferior, D es la asíntota superior, IC50 es el punto de inflexión y la pendiente de Hill corresponde a la pendiente de la curva en su punto medio.

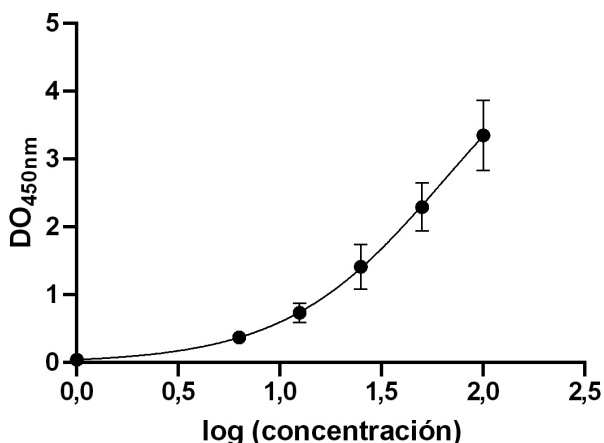


Figura 8. Curva de calibración del ensayo comercial para determinación de anticuerpos anti-β-2-glicoproteína I conforme a las recomendaciones del fabricante. Se ajustó el modelo 4PL por el método de mínimos cuadrados (MC) ponderados.  $DO_{450\text{ nm}}$ : densidad óptica medida a 450 nm. Se representa en cada punto el desvío estándar como medida de dispersión

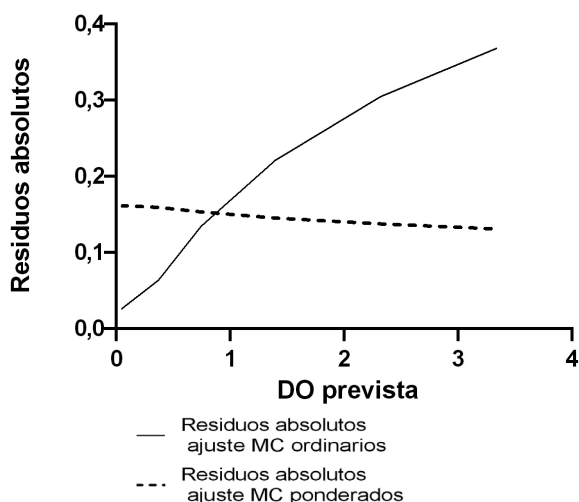


Figura 10. Curva suavizada o smooth. El ajuste 4PL por MC ponderados extingue los efectos de la heterocedasticidad sobre el perfil de residuos

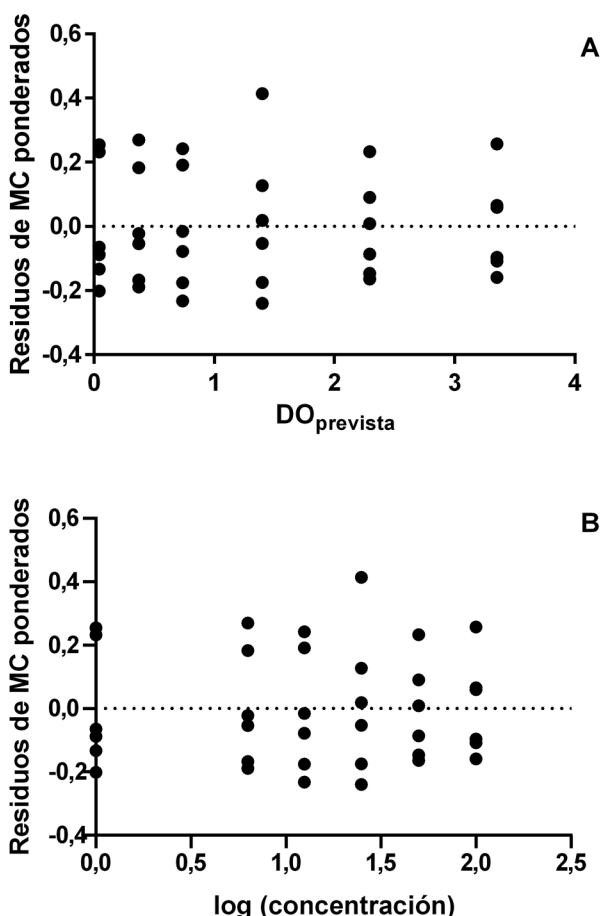


Figura 9. Residuos del ajuste 4PL por el método de MC ponderados. Ya sea que aumente la variable de respuesta (A) o predictor (B), se disipa el patrón en “embudo”

según  $\log(\text{DO})$  vs.  $\log(\text{concentración})$  se muestra en la Fig. 11. El modelo 4PL (Fig. 11B) se reveló superior al ajuste lineal en términos de exactitud y precisión cuando se hizo el cálculo inverso de los niveles de calibrador para evaluar la bondad de ajuste (no se muestra), pese a lo sugerido por el aparente cambio en la distribución de los datos experimentales (Fig. 11A) (10). Como en el caso de la regresión por MC ponderados, la transformación de los datos disipa el patrón en embudo de los residuos del ajuste por MC ordinarios para pasar a presentar frente al examen visual una distribución más uniforme en torno al 0 (Fig. 12A y Fig. 12B). La curva suavizada de los residuos absolutos vs. variable predictora pone nuevamente de relieve estos cambios (Fig. 13). Se puede concluir, según la inspección visual de los residuos, que el procedimiento de transformación es equivalente a la regresión por MC ponderados cuando se trata de compensar la heterocedasticidad en la calibración de los ELISA comerciales. Es requisito para seleccionar la función de transformación adecuada de la Tabla I definir el valor del parámetro estructural de la varianza por medio de alguna de las técnicas gráficas mencionadas.

Finalmente, se representa en la Fig. 14A y 14B el perfil de exactitud y precisión del ensayo de ELISA respectivamente, construido a partir del cálculo inverso de las concentraciones del calibrador según se ajuste la curva estándar por 4PL MC ordinarios, 4PL MC ponderados o la transformación logarítmica de la respuesta seguida de 4PL MC ordinarios. Los cambios en la varianza tienen más impacto sobre los IC95% (intervalos de confianza 95%) de los coeficientes de regresión que sobre su valor absoluto; la tendencia para los datos es prácticamente la misma con cualquiera de los tres abordajes. Los resultados de la Tabla II confirman la mejora en los IC95% de los coeficientes del modelo 4PL.

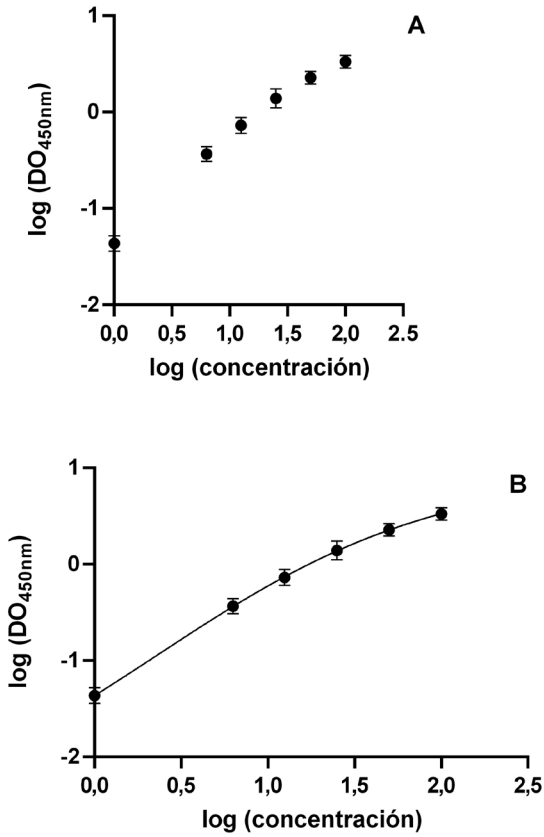


Figura 11. Compensación de la heterocedasticidad por transformación logarítmica de la respuesta. A. Distribución de los datos experimentales. B. Ajuste por el modelo no lineal 4PL. Se representa en cada punto el desvío estándar como medida de dispersión

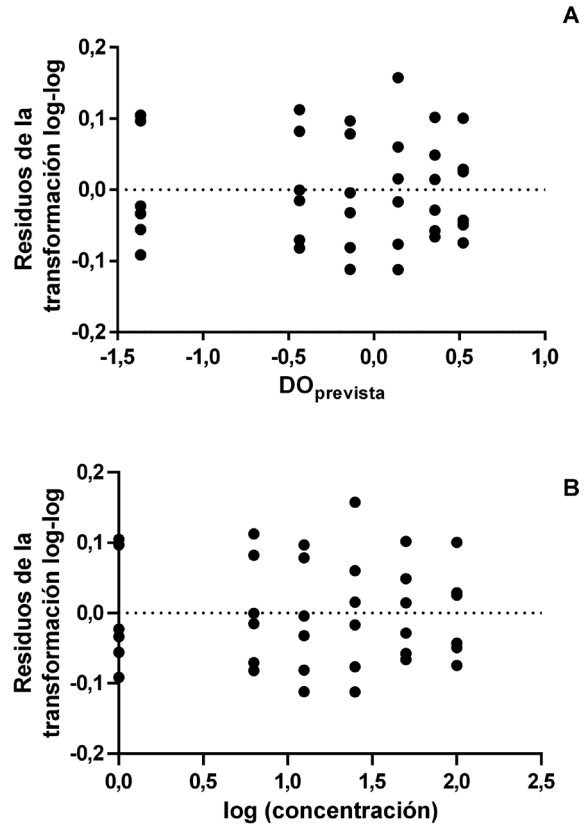


Figura 12. Compensación de la heterocedasticidad por transformación logarítmica de la respuesta. Ya sea que aumente la variable de respuesta (A) o predictora (B), se disipa el patrón en embudo de los residuos del ajuste por MC ordinarios

En resumen, cuando se trata de compensar la heterocedasticidad en ELISA, operar con la transformación logarítmica de la respuesta equivale a efectuar la regresión por MC ponderados tomando como parámetro  $\theta=2$  en la función de ponderación. Esta equivalencia implica además que los principios del análisis para modelizar la varianza desarrollados para RIA pueden extrapolarse al ámbito del ELISA de uso clínico sin importar la procedencia del *kit* en cuestión, siempre que el ajuste de la curva de calibración se lleve a cabo por el modelo de regresión no lineal 4PL. Se verifica así que es válido transformar los datos experimentales en la gestión de la heterocedasticidad de ELISA comerciales.

No se han analizado en este trabajo los ajustes lineales, en parte debido a que están escasamente representados en inmunoensayos comerciales. Existe la posibilidad de que se esté empleando en ciertos casos el trazado de la porción central de la curva estándar 4PL (se discute más adelante), de tendencia aproximadamente lineal. Por lo tanto, se sugiere constatar siempre cuál modelo se propone para la calibración del ensayo, información que está habitualmente disponible en el inserto suministrado por el fabricante del *kit*.

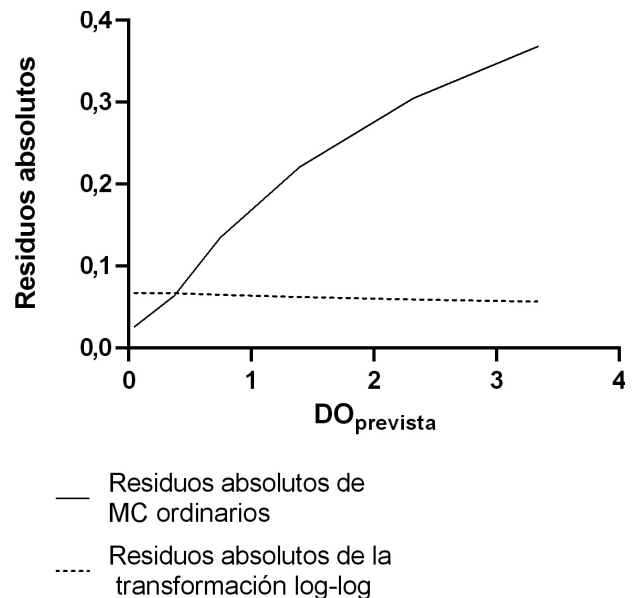


Figura 13. Curva suavizada o smooth. La transformación logarítmica de la respuesta extingue los efectos de la heterocedasticidad sobre el perfil de residuos

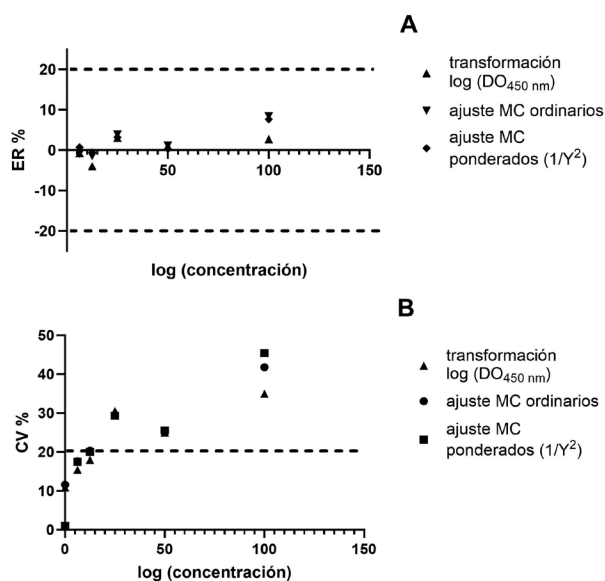


Figura 14. Bondad de ajuste. Perfil de exactitud (14A) y precisión (14B) construido a partir del cálculo inverso de las concentraciones de calibrador según se ajuste la curva estándar por 4PL MC ordinarios, 4PL MC ponderados o la transformación logarítmica de la respuesta seguida de 4PL MC ordinarios. ER%: error relativo porcentual. CV%: coeficiente de variación porcentual

## Discusión y Conclusiones

En este trabajo se analizan dos alternativas para compensar la falta de homogeneidad en la varianza de ELISA comerciales. La aplicación de estas técnicas estadísticas tiene por objetivo mejorar la estimación de los coeficientes del modelo 4PL en el ajuste de la curva estándar. Dado que el ELISA se inscribe en el marco de los EUL, se trata de verificar en este trabajo si procedimientos ya consolidados en RIA son aptos para compensar la heterocedasticidad durante la calibración de un *kit* de ELISA comercial. Cabe señalar que, si bien los estudios en la literatura apuntan mayoritariamente a plataformas en las que está implicada una etapa de separación de fases, la bibliografía referida al tema escasea cuando se analizan los inmunoensayos en fase sólida de uso clínico (14).

En particular, se verifica en este estudio la equivalencia entre la regresión por MC ponderados y la transformación de los datos experimentales en la gestión de la heterocedasticidad; en el primer enfoque se formula una hipótesis acerca de la función que describe la varianza para luego estimar la influencia de cada punto experimental en el ajuste del modelo 4PL. Así, la función de ponderación compensa el incremento de la dispersión en cada nivel de respuesta y minimiza la suma de cuadrados ponderada. Conocer la estructura de la varianza es importante para obtener pondera-

ciones apropiadas de cada punto de la curva estándar cuando se utilizan los métodos de ajuste por MC (6). Como alternativa, se lleva a cabo una transformación de la respuesta que induce varianza homocedástica y distribución normal del error aleatorio, para luego ajustar el modelo 4PL por MC ordinarios. Se trata de establecer en este trabajo si, como se ha sugerido previamente (1), hay correspondencia entre los dos abordajes para el caso de ELISA comerciales y si, como consecuencia de esto, es válido priorizar la transformación (12) a fin de agilizar el procesamiento de los datos de calibración. En este sentido, la representación de residuos y el cálculo inverso de las concentraciones de calibrador constituyen pilares para el criterio de comparación de los dos abordajes al analizar la compensación de la heterocedasticidad y la bondad de ajuste, respectivamente.

El interés que suscita en la literatura la calibración de los EUL da testimonio no solo de la trascendencia clínica que éstos han adquirido con los años, sino también del interés creciente de la industria farmacéutica en mejorar la cuantificación de biomarcadores disueltos en matrices complejas (15). En efecto, es esencial contar con inmunoensayos confiables para la determinación de drogas o sus metabolitos en líquidos biológicos cuando se persigue como fin analítico dar soporte a estudios de farmacocinética; establecer si el nivel plasmático de un fármaco está dentro del rango terapéutico (16) sirve al doble propósito de individualizar la posología y prevenir un perjuicio potencial al paciente. Esto justifica que la validación de los EUL haya sido objeto de una revisión pormenorizada por parte de agencias del exterior. Sujeta como está a lineamientos sin carácter regulatorio (15), la validación de los inmunoensayos garantiza que sus resultados puedan aplicarse a la interpretación de estudios de farmacocinética o toxicología. Por otro lado, ciertas recomendaciones de esa documentación se hicieron extensivas a métodos del laboratorio clínico. Por ejemplo, para definir los parámetros de la función de regresión 4PL en EUL se sugiere contar como mínimo con 6 niveles de calibrador (15). Otro elemento distintivo para tener en cuenta es la evaluación de la bondad del ajuste, en la que el cálculo inverso de las concentraciones de calibrador o *back-fitted* eclipsa al coeficiente de correlación  $R^2$ . Se asume además que el material usado como referencia tiene un comportamiento representativo del analito a medir (14) (17). Finalmente, para estimar la estructura de la varianza se debería contar con un buen número de replicados de cada nivel de calibrador –por lo menos 3– para no perder eficiencia estadística, sobre todo considerando que la función que la describe bien podría tener una forma polinómica en lugar de exponencial (18) (19). Aunque en ciertos ensayos aumentar el número de replicados puede ser oneroso, no se encontró en el presente caso esta limitación.

Cada laboratorio clínico es responsable de definir los criterios para el diseño, preparación, aceptación y edición de las curvas de calibración de los EUL (14). Es práctica habitual estimar los parámetros de la función de regresión mediante el método de MC ordinarios. Aunque de esta manera se elude la tarea de hacer suposiciones acerca de la estructura de la varianza, ignorar deliberadamente su forma implica asumir que el modelo de trabajo es homocedástico y que la función de ponderación tiene un valor constante (13). Sin embargo, el análisis de residuos revelaría en la mayoría de los casos la inexactitud de ambas propuestas, tanto más cuanto que se reconoce a la heterocedasticidad como fenómeno ubicuo en ensayos dependientes de una reacción Ag-Ac (6) (7). Además de dar cuenta de la variabilidad de la respuesta no atribuida al cambio en la variable predictora, los residuos se pueden utilizar junto a las concentraciones *back-fitted* como una medida de la bondad del ajuste. No se trata en este trabajo de hacer el despliegue de todas las variantes de representación sobre las que reposa el análisis de residuos, sino de presentar los trazados más útiles (Fig. 2) para demostrar gráficamente la heterocedasticidad. La prueba de Spearman puede ayudar a disipar la ambigüedad asociada en ocasiones a la evaluación visual. Por otro lado, extraer conclusiones del análisis gráfico es un procedimiento válido en el ámbito del control estadístico de la calidad: el examen del patrón de dispersión en el contexto de protocolos de verificación de química clínica es elemento suficiente para probar la linealidad de un método (20).

En este trabajo se verifica la correspondencia entre las funciones de transformación y la regresión por MC ponderados cuando se trata de estabilizar la varianza heterogénea de ELISA comerciales. El parámetro estructural  $\theta$  empleado en su descripción (Ec. 1) sirvió como herramienta para orientar la selección de la función de transformación de entre las listadas en la Tabla I. Para estimar fue necesario postular un modelo exponencial para la varianza, donde tanto el método de Harvey (7) –regresión de log (residuos absolutos de un ajuste no ponderado) *vs.* log (DO prevista)–, el método de Rodbard (6) –regresión de log (SD) *vs.* log (media de la variable predictora)– como el método de Levasseur (12) –regresión de log (varianza) *vs.* log (media de la variable predictora)– convergen en un valor de aproximadamente 2. Al tratar de atenuar la heterocedasticidad en inmunoensayos comerciales, se verificó que la transformación logarítmica era equivalente a la regresión por MC usando como función de ponderación  $1/Y^2$  ( $\theta$  es igual a 2), lo que confirmó que los hallazgos de la Tabla I pueden extenderse al ámbito clínico. Esta metodología de transformación es fácil de aplicar, induce varianza constante y no invalida el modelo de regresión con el que se estaba trabajando (7). Aunque la dispersión de los datos en el *scatterplot* de la Figura 11 sugie-

re el ajuste de un modelo lineal (3) (10), conservar el modelo 4PL después de la transformación logarítmica mejora la precisión y exactitud. Es un hecho conocido que aplicar un algoritmo que fuerce la linealidad de los datos de calibración puede bajar el rendimiento de la curva estándar; pese a que el coeficiente de correlación  $R^2$  se acerque a la unidad, las inconsistencias en el ajuste podrían no quedar expuestas (1) a no ser que se evalúe la bondad de ajuste mediante cálculo inverso. Las propuestas para hacer uso de “sectores” de interés restringidos dentro del modelo 4PL tal como se describe en el método de truncado y regresión lineal en la parte media de la curva estándar, no pasan de ser sobresimplificaciones que añaden más incertidumbre al procedimiento de interpolación (3). Si se desea ajustar un modelo lineal a los datos es legítimo aplicar la transformación logit a la respuesta (Y) y trabajar con el modelo logit-log (21).

En el caso de que no se lleve a cabo el ajuste por MC ponderados es posible que la estimación de los coeficientes de la curva no revele muchas diferencias en sus valores absolutos (Tabla II), pero los IC 95% luego de ajustar por MC ordinarios pueden resultar inaceptablemente altos. Por lo tanto, la ponderación resulta en una curva similar a la obtenida por el ajuste por MC ordinarios, acompañada de una menor incertidumbre en la estimación de los parámetros (12). A su vez, el ajuste ponderado resulta más robusto en el sentido de que se consigue minimizar el efecto de puntos aberrantes (3).

Es menester destacar en este punto que el análisis de heterocedasticidad efectuado no está exento de ciertas limitaciones: por un lado, no se ha ensayado más que una línea comercial de reactivos. Puede plantearse la posibilidad de que, al contar con datos de calibración de *kits* de múltiples fuentes de manufactura, el análisis gráfico resulte insuficiente como recurso para valorar la heterogeneidad de la varianza, y se revele la necesidad de recurrir a *tests* estadísticos para formalizar las conclusiones. Siguiendo esta línea de razonamiento, el mismo diseño del estudio exigiría trabajar con un número mayor de replicados que los que aquí se presentan. No obstante, al ser la heterocedasticidad y la no-linealidad de la curva estándar características intrínsecas del ELISA indirecto por estar ligadas a la naturaleza de la interacción Ag-Ac es poco probable, por lo tanto, encontrarse con resultados disímiles. Ensayar distintas líneas comerciales podría permanecer como perspectiva para determinar hasta qué punto la especificidad de la reacción Ag-Ac repercute en parámetros estadísticos en la etapa de calibración.

Frente a estos resultados, el desarrollo de herramientas informáticas que faciliten la integración con la práctica asistencial se perfila como perspectiva ineludible. Conociendo la dispar formación bioquímica en materia de estadística, sería deseable que la intervención

del profesional del diagnóstico se oriente al ingreso de datos y su correcta interpretación. Aunque el análisis gráfico tenga la ventaja de resultar intuitivo, el procesamiento implicado en su diseño demanda un esfuerzo tal que los errores u omisiones podrían verse multiplicados, atentando contra el objetivo de extender la aplicación del análisis de la varianza a los laboratorios clínicos.

Los recursos que la literatura y los paquetes estadísticos ponen a nuestra disposición nos interpelan con respecto a la precisión y exactitud de los resultados que se reportan al equipo de salud. Conociendo el impacto innegable de nuestro trabajo en las decisiones clínicas, el compromiso con la prestación de un servicio de excelencia debe ser un ejercicio continuo para el profesional sanitario. Aparece así un concepto elusivo en su definición, aunque omnipresente como objetivo, referido con frecuencia al nivel de automatización y actualización tecnológica del laboratorio clínico: la confiabilidad de los resultados. Pero bajo una visión más integral, un factor decisivo para alcanzar ese objetivo es también la formación del recurso humano a cuyo cargo está la tarea operativa. A través del estudio del paralelismo (22), la heterocedasticidad (5) y la bondad de ajuste (11) se propicia aquí una visión crítica de la validación de los inmunoensayos de uso clínico que enriquece la mirada del profesional comprometido con la formación continua en Inmunología. En este trabajo se abordó puntualmente la gestión de la heterocedasticidad en ELISA comerciales, con la esperanza de hacer un aporte a la mejora en el procesamiento de datos que se integre a las plataformas de trabajo y respalde de manera más sólida la toma de decisiones clínicas en autoinmunidad.

### Fuentes de financiación

El presente trabajo fue realizado sin haberse recibido una financiación específica.

### Conflictos de intereses

El autor del artículo declara no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

### Agradecimientos

El autor agradece a María Carolina Machado por su trabajo en la traducción del resumen al portugués.

### Correspondencia

Dr. VÍCTOR M. CÁRDENAS DELGADO  
Correo electrónico: vimanuel\_cd@yahoo.com.ar

## Referencias bibliográficas

1. Findlay JW. Some important considerations for validation of ligand-binding assays. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009 Aug; 877 (23): 2191-7.
2. Findlay JW, Dillard RF. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. *AAPS J* 2007 Jun; 9 (2): 260-7.
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. Rodbard D. Statistical quality control and routine data processing for radioimmunoassays and immunoradiometric assays. *Clin Chem* 1974 Oct; 20 (10): 1255-70.
5. Xiang Y, Donley J, Seletskaya E, Shingare S, Kamerud J, Gorovits B. A simple approach to determine a curve fitting model with a correct weighting function for calibration curves in quantitative ligand binding assays. *AAPS J* 2018 Mar; 20 (3): 45.
6. Rodbard D, Lenox RH, Wray HL, Ramseth D. Statistical characterization of the random errors in the radioimmunoassay dose-response variable. *Clin Chem* 1976 Mar; 22 (3): 350-8.
7. Carroll RJ, Ruppert D. Transformation and weighting in regression. 1st ed. London (UK): Chapman and Hall/CRC; 1988.
8. Rodbard D, Lenox RH, Wray HL, Ramseth D. Statistical characterization of the random errors in the radioimmunoassay dose-response variable. *Clin Chem* 1976 Mar; 22 (3): 350-8.
9. Finney DJ, Phillips P. The form and estimation of a variance function, with particular reference to radioimmunoassay. *J R Stat Soc C-Appl* 1977 Nov; 26 (3): 312-20.
10. Quantics Biostatistics (UK). Insights on Statistical Issues for Bioassay. 2nd ed. Edinburgh (UK): Quantics Biostatistics; 2023.
11. Cárdenas Delgado VM, Nuñez M, Nuñez Taquia GG. Validación de inmunoensayos en fase sólida. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2018 Sep; 52 (3): 339-45.
12. Levasseur LM, Faessel H, Slocum HK, Greco WR. Implications for clinical pharmacodynamic studies of the statistical characterization of an *in vitro* antiproliferation assay. *J Pharmacokinet Biopharm* 1998 Dec; 26 (6): 717-33.
13. Knaub J. Heteroscedasticity and homoscedasticity. En: Salkind N, editor. *Encyclopedia of measurement and statistics*. 1st ed. Thousand Oaks (CA): SAGE Publications Inc; 2007. p. 431-2.
14. Azadeh M, Gorovits B, Kamerud J, MacMannis S, Sa-favi A, Sailstad J, *et al.* Calibration curves in quantitative ligand binding assays: recommendations and best practices for preparation, design, and editing of calibration curves. *AAPS J* 2017 Dec; 20 (1): 22.
15. Food and Drug Administration (US). Bioanalytical

- method validation guidance for industry. Silver Spring (Maryland): U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration; 2018.
16. Brewer E, Bollin E. Introduction to calibration curves in bioanalysis. *Bioanalysis* 2009 Oct; 1 (7): 1201-8.
  17. Lee JW. Method validation and application of protein biomarkers: basic similarities and differences from biotherapeutics. *Bioanalysis* 2009 Nov; 1 (8): 1461-74.
  18. Raab GM, Thompson R, McKenzie I. Variance function estimation for immunoassays. *Comput Programs Biomed* 1980 Dec; 12 (2-3): 111-20.
  19. Raab GM. Estimation of a variance function, with application to immunoassay. *J R Stat Soc C-Appl* 1981 March; 30 (1): 32-40.
  20. Guglielmone R, de Elías R, Kiener O, Collino C, Barzón S. Verificación de métodos en un laboratorio acreditado y planificación del control de calidad interno. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2011 Jun; 45 (2): 335-47.
  21. Rodbard D, Frazier GR. Statistical analysis of radioligand assay data. *Methods Enzymol* 1975 Sep; 37: 3-22.
  22. Cárdenas Delgado VM, Nuñez M. Paralelismo en inmunoensayos: dos abordajes aplicados a la determinación de anticuerpos anti-péptido deaminado de gliadina. *Bioquímica y Patología Clínica* 2021 Abr; 85 (2): 19-26.

**Recibido: 4 de diciembre de 2024**

**Aceptado: 24 de marzo de 2025**