

***METODOLOGIA Y
CLASIFICACION
DEL ELISA EN LA
DETERMINACION
DE ANTIGENOS Y
ANTICUERPOS***

**DRA. IBETH NEYRA VERA
MEDICO PATOLOGO CLINICO - HNERM**

ANTECEDENTES HISTORICOS

- 1959 Yalow y Berson: RIA
- 1971 Engvall, Van Weeman y Avrameas: EIA cuantitativos
- El uso de material radiactivo limita el uso del radioinmunoensayo, y ha popularizado el empleo del EIA, siendo populares dos técnicas principales:
 - ▣ El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)
 - ▣ El ensayo inmunológico multiplicado por enzimas (EMIT)

ENZIMOINMUNOANALISIS

GENERALIDADES

- ▣ Cuantificación y detección de componentes de líquidos Biológicos en muy bajas concentraciones
- ▣ Gracias a los Ac. Monoclonales y sistemas de amplificación se tiene límites inferiores de detección comparado con otras metodologías como el RIA (además de otras ventajas)
- ▣ Usa enzima como marcador de la reacción inmunológica

ENZIMOINMUNOANALISIS

PRINCIPIO

- El analito (Ag, Ac) se hace reaccionar con su contrario (Ac o Ag) marcado con una enzima (conjugado)
- La concentración del complejo inmune formado y marcado con la enzima es directamente proporcional a la concentración del componente
- El complejo formado se mide por medición de la actividad enzimática, eliminándose previamente o no la enzima no asociada al complejo (EIA heterogéneo u homogéneo respectivamente) y añadiendo un sustrato



CLASIFICACION DE LOS EIA

- Homogéneos
- Heterogéneos

- Por el componente problema
 - Antígeno
 - Anticuerpo

- Por el componente marcado con enzima
 - Antígeno
 - Anticuerpo

- Competitivos
- No competitivos



CLASIFICACION DE LOS EIA

EIA HOMOGENEOS

- SEGÚN TECNICA DE UNION COMPETITIVA (clásicas)
 - EMIT
 - SLFIA
 - PGLIA
 - CLIA
 - EMMIA
 - CEDIA
 - ECIA

- SEGÚN TECNICA DE UNION NO COMPETITIVA (nuevas)
 - EEIA
 - EIA Homogéneo con Ac. Biespecífico
 - EIA Homogéneo con sustrato insoluble

CLASIFICACION DE LOS EIA

□ EIA HETEROGENEOS

▣ CARACTERÍSTICA FUNDAMENTAL

- Formación del complejo no afecta la actividad catalítica del conjugado
- Para cuantificar el complejo formado se separa del medio de reacción el conjugado no unido
- Se emplea habitualmente para permitir tal separación una fase sólida (ELISA)
- Múltiples variantes dependiendo de cual sea el componente Antígeno o anticuerpo (marcado) y cual el analito problema

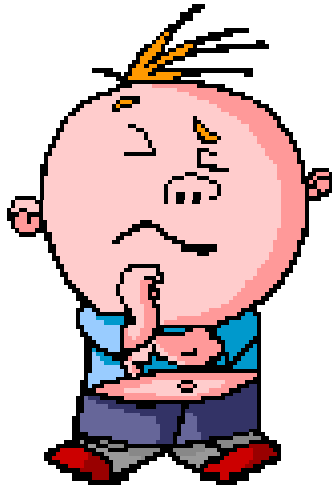
CLASIFICACION DE LOS EIA

EIA HETEROGENEOS

- ELISA COMPETITIVOS
 - ▣ Con antígeno marcado (AMETIA)
 - ▣ Con anticuerpo marcado (EIA de inhibición)

- ELISA NO COMPETITIVOS
 - ▣ ELISA tipo sandwich de antígeno
 - ▣ ELISA tipo sandwich de anticuerpo

DEFINICIÓN DE ELISA



□ Enzyme

□ Linked

□ ImmunoSorbent

□ Assay

DEFINICIÓN DE ELISA

- La técnica ELISA se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente

Equipo Básico



Lector de placas de 96 pocillos



Microplacas de poliestireno de 96 pocillos



Lavador de placas de 96 pocillos

Tipos de ELISA

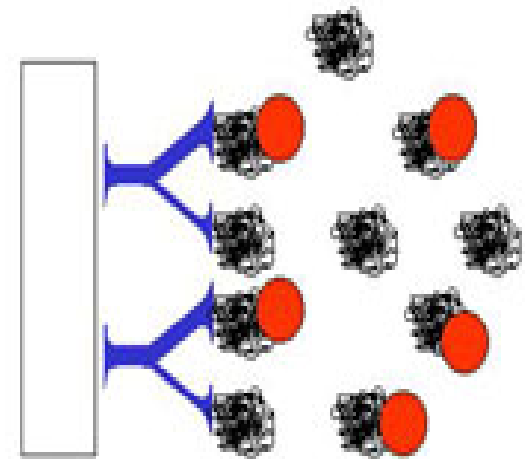
- Los métodos de ELISA dependiendo de la actividad enzimática se dividen en dos tipos:
 - ▣ Competitivos
 - ▣ No competitivos



Tipos de ELISA

□ ELISA COMPETITIVO:

En este método, el anticuerpo de la muestra va a competir con el conjugado por un número limitado de sitios de unión del antígeno. Habrá **ausencia de color en una muestra positiva** debido a que el sustrato no encontrará a la enzima porque el conjugado ha sido desplazado por el anticuerpo presente en la muestra.



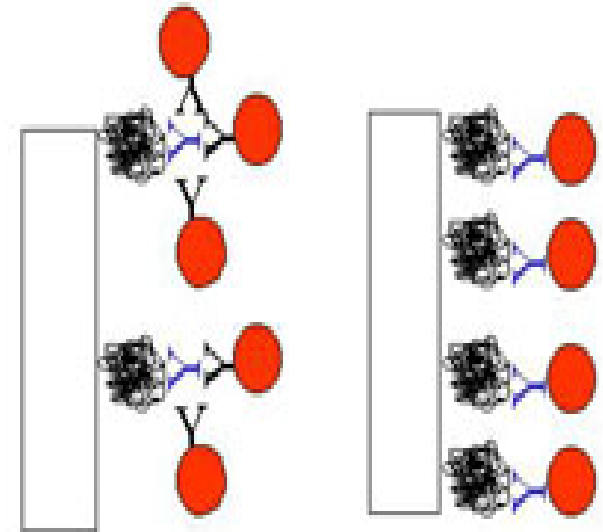
Empleando los pocillos recubiertos de anticuerpo

ELISA Competitivo de Antígeno

Tipos de ELISA

□ ELISA NO COMPETITIVO:

Consiste en enfrentar la muestra con el antígeno o anticuerpo que está en la **fase sólida**. Si una muestra es **positiva** se formará el complejo antígeno-anticuerpo y al agregar el **conjugado reaccionará** con el respectivo **sustrato** desarrollando color



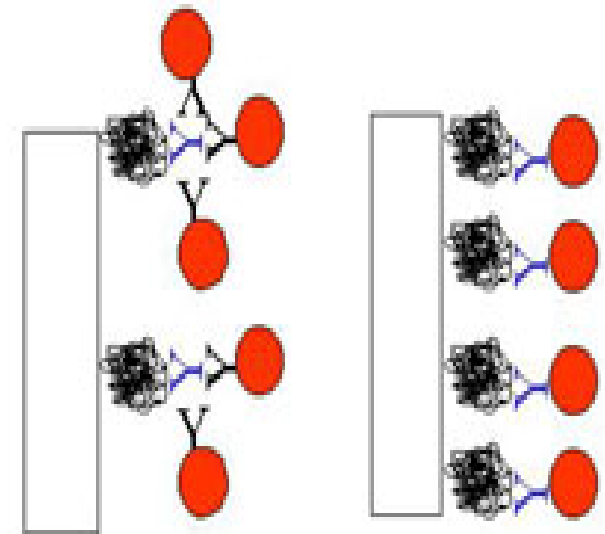
Empleando los pocillos
recubiertos de antígeno

ELISA Indirecto

ELISA directo

Tipos de ELISA

- Dentro de los no competitivos tenemos:
 - ▣ Los **directos** que detectan antígenos
 - ▣ Los **indirectos** que detectan anticuerpos.



Empleando los pocillos recubiertos de antígeno

ELISA Indirecto

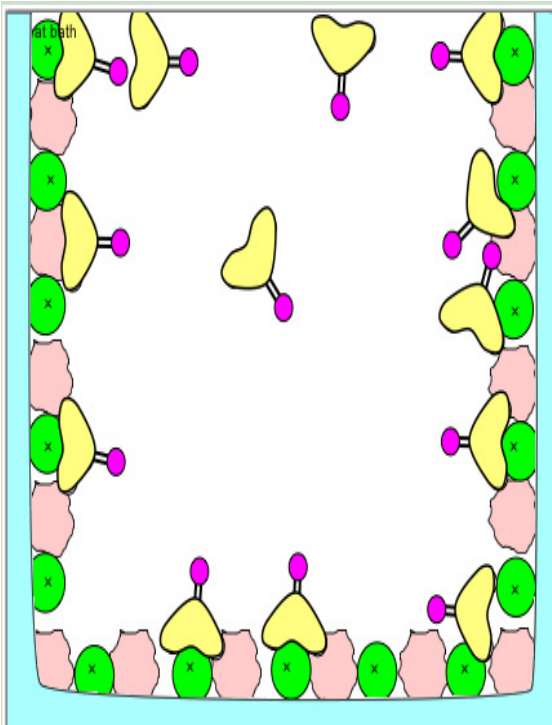
ELISA directo

Tipos de ELISA

Todos los tipos de ELISAs descritos se pueden resumir en dos grandes grupos:

- ELISAs para detectar antígenos: ELISAs sándwich.
- ELISAs para detectar anticuerpos: ELISAs indirectos.

Pasos generales de un ELISA

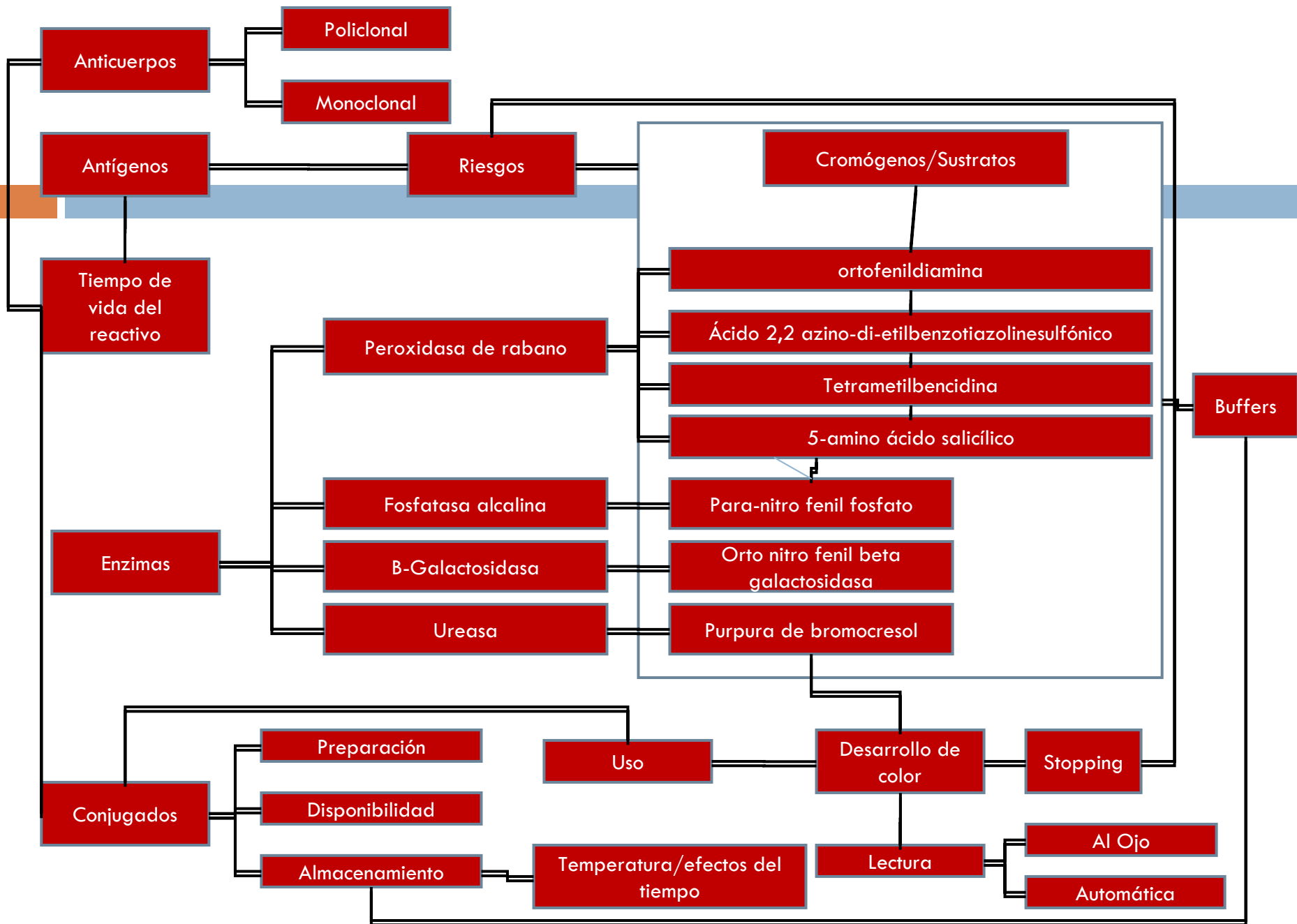


1. **Tapizado** del pocillo con el antígeno o anticuerpo
2. **Adición de la muestra problema** con la mezcla de antígenos o anticuerpos
3. **Unión del antígeno o anticuerpo** específico al anticuerpo o antígeno tapizado en el pocillo.
4. **Lavado** del pocillo para eliminar el exceso de anticuerpo o antígeno no unido

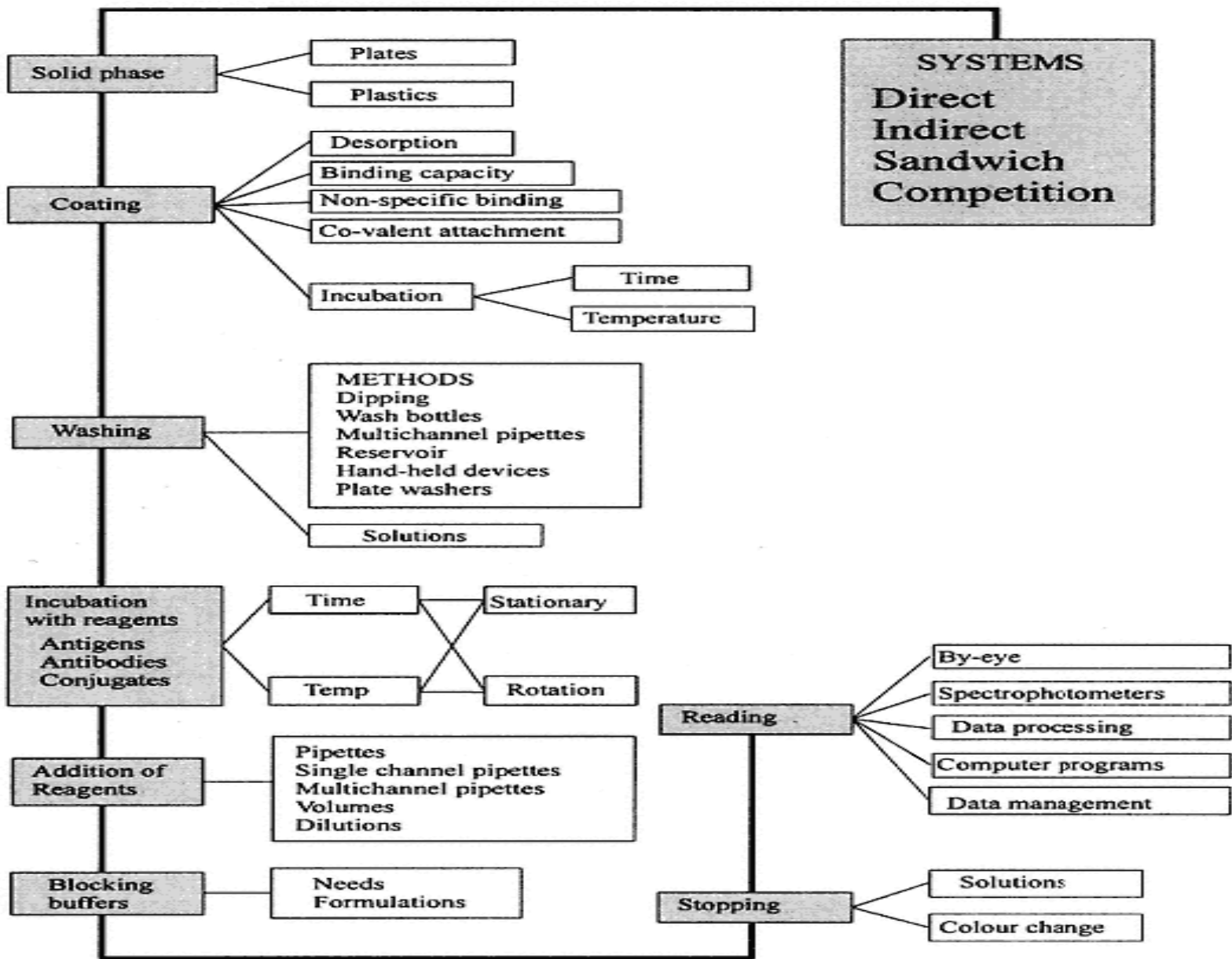
Pasos generales de un ELISA

5. **Adición del anticuerpo** secundario marcado con la enzima (conjugado)
6. **Unión del anticuerpo** secundario al antígeno o anticuerpo
7. **Lavado** del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida
8. **Adición del sustrato**
9. **Unión del sustrato a la enzima** (obtención del producto)
10. Desarrollo del **color**





Relaciones de los componentes del sistema ELISA



Etapas del ELISA. Las etapas varías de acuerdo al sistema utilizado

Ventajas del ELISA

1. Simplicidad

- Reactivos empleados en pequeños volúmenes.
- La separación de reactante libres y ligados es hecha por un simple procedimiento de lavado
- La adsorción pasiva de proteínas al plástico es fácil
- El equipo especializado es de fácil disponibilidad

2. Lectura

- El producto final coloreado puede ser leído a simple vista para evaluar como ha sido trabajado el test (evitando esperar los resultados como en el RIA)
- Espectrofotómetros multicanal cuantifican los resultados

3. Rapidez

- Los test pueden desarrollarse en pocas horas
- La lectura espectrofotométrica de los resultados es rápida (96 pocillos en 5 segundos)

Ventajas del ELISA

4. Sensibilidad

- Niveles de detección de 0.01 a 1.0 ug/ml
- Niveles ideales para la mayoría de diagnósticos

5. Reactivos

- Comercialmente disponibles
- Ofrecen diseños bastante flexibles

6. Costo

7. Aceptabilidad (Estandarizados)

8. Seguridad

- Reactivos no mutagénicos
- La eliminación de los desechos no es problemática

9. Disponibilidad

- Elisa puede ser desarrollado en cualquier lugar aun en laboratorios de baja complejidad

CARACTERISTICAS DE LAS ENZIMAS Y SUSTRATOS USADOS EN EIA

DE LAS ENZIMAS

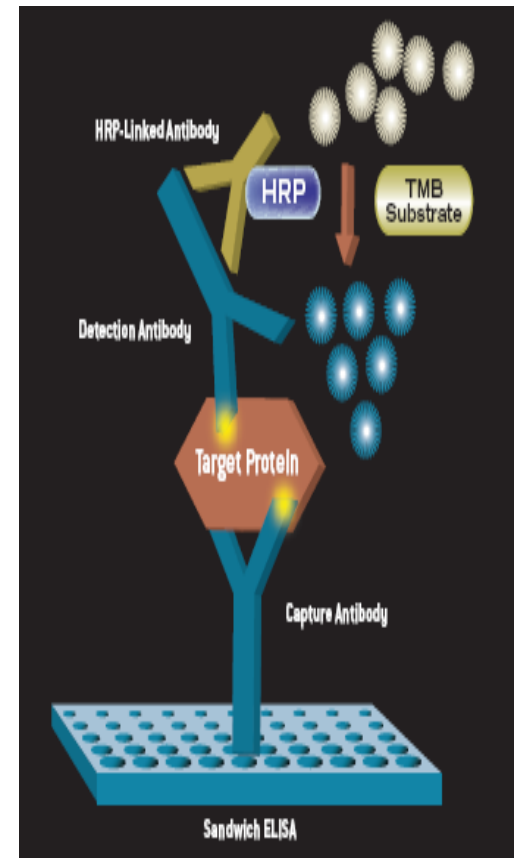
- ▣ Medición de actividad catalítica por: Espectrometría, fluorimetría, luminometría del producto formado
- ▣ Elevada actividad específica sea conjugada o no
- ▣ Soluble y pura a bajo costo y con calidad reproducible
- ▣ Alta estabilidad en almacenamiento y durante el procedimiento
- ▣ Tener grupos reactivos para unión covalente
- ▣ Métodos de marcaje simples



CARACTERISTICAS DE LAS ENZIMAS Y SUSTRATOS USADOS EN EIA

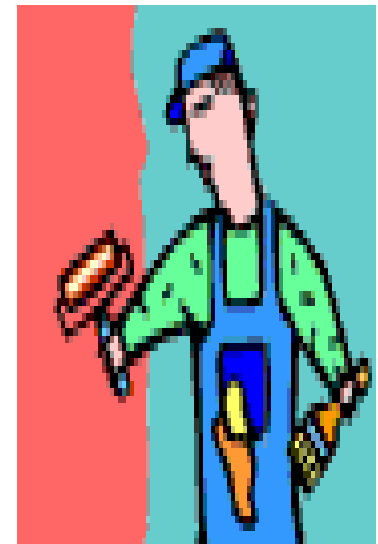
DE LAS ENZIMAS

- ▣ Sustrato no tóxico, barato, estable; así mismo un producto estable
- ▣ Alta actividad específica
- ▣ Sin actividad catalítica en el espécimen
- ▣ Ausencia de sustrato y producto en el espécimen en estudio
- ▣ Disponibilidad de inhibidores selectivos o Ac. que inhiben la enzima



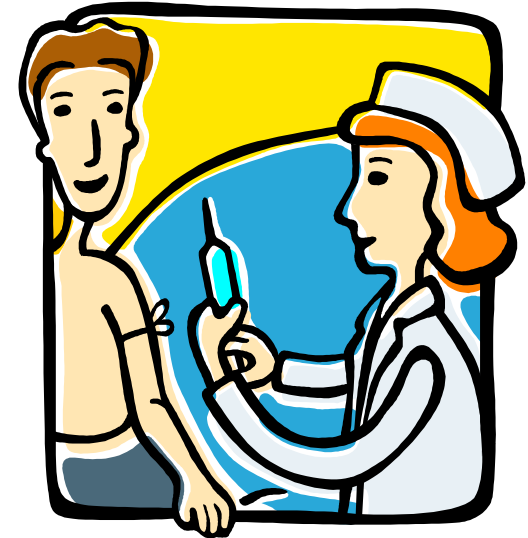
CARACTERÍSTICAS DE LAS ENZIMAS Y SUSTRATOS USADOS EN EIA

- DEL SUSTRATO CROMOGÉNICO
 - ▣ Solubles en agua, incoloros, inodoros, no mutagénicos, atóxicos
 - ▣ Coeficientes de absorción molar elevado con máximo de absorvancia 340-600 nm
 - ▣ Elevada constante de unión para la enzima (K_m baja)
 - ▣ Gran estabilidad en el almacenamiento (sustrato), y del producto al parar la reacción
 - ▣ Linealidad de medida en amplio intervalo
 - ▣ Ausencia de sustrato en el espécimen en especial en EIA homogéneo



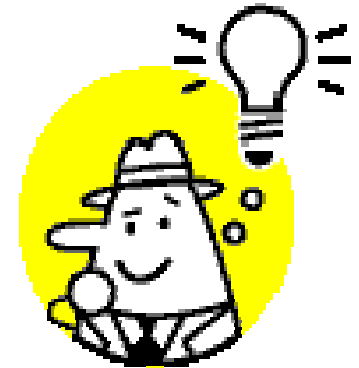
INTERFERENCIAS EN ELISA

- INTERFERENCIAS EXOGENAS (No del espécimen)
 - ▣ Preparación
 - ▣ Conservación
 - ▣ Recojo del espécimen



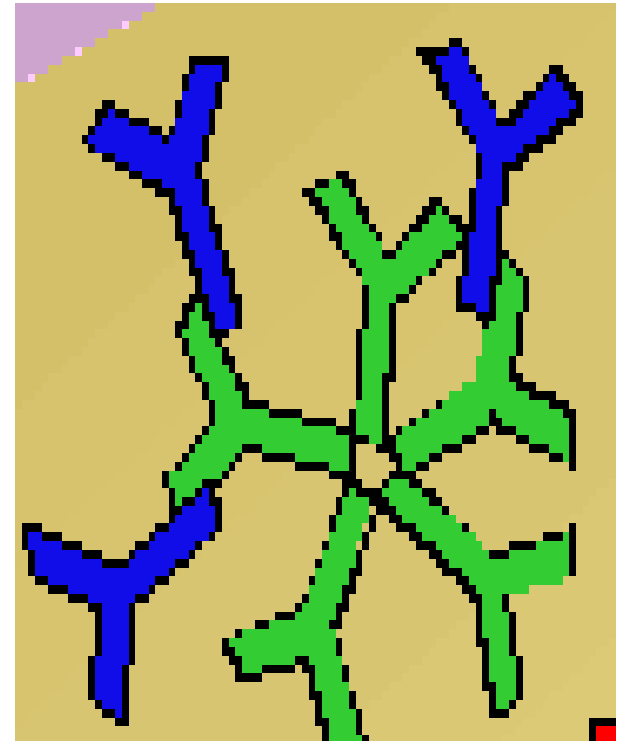
INTERFERENCIAS EN ELISA

- INTERFERENCIAS ENDOGENAS
(Del espécimen)
 - ▣ Hiperlipidemia
 - ▣ Anticuerpos heterófilos
 - ▣ HAMA
 - ▣ Factor Reumatoide
 - ▣ Competición entre anticuerpos
 - ▣ Reacción cruzada con antígenos endógenos

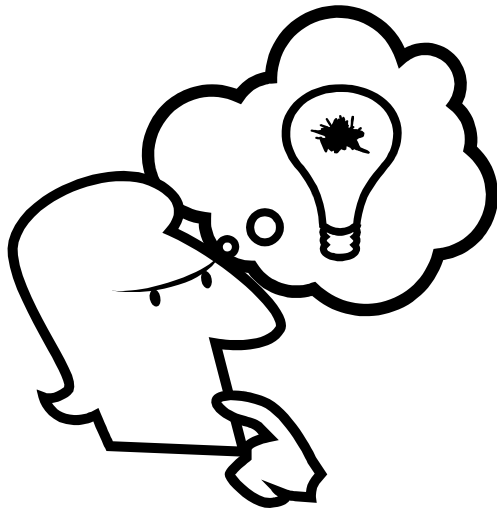


INTERFERENCIAS (Ac heterófilos)

- **Formas rudimentarias de anticuerpos tempranos**
- **Los Ac pueden haber evolucionado de Ac naturales primordiales**
- **Auto anticuerpos Ig M (FR)**
- **Más en neonatos**
- **Ac anti idiotipo**

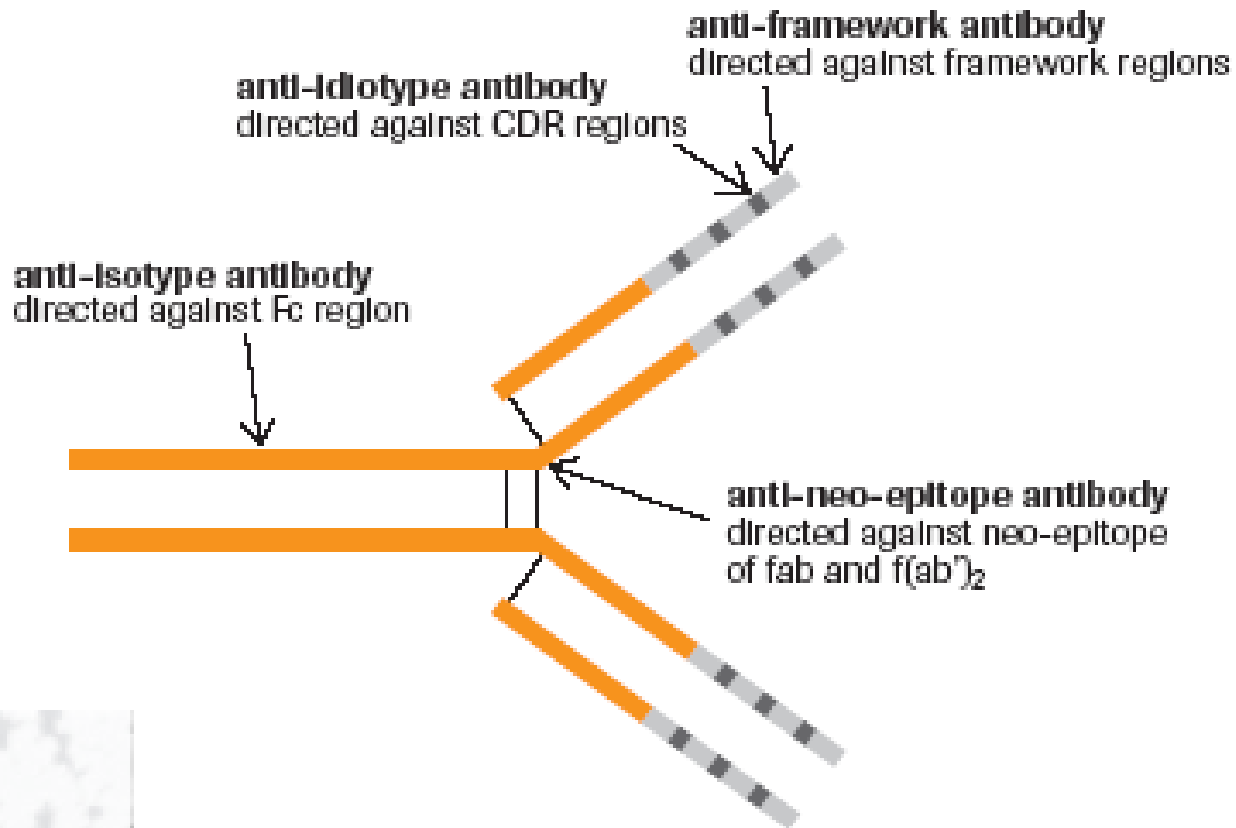


INTERFERENCIAS (Ac heterófilos)



- INTERFIEREN EN DOS LUGARES DEL INMUNOENSAYO IMPIDEN CAPTURA Y DETECCION DE ANTIGENOS
- DISTINGUIRLOS DE LOS ANTICUERPOS ANTI ANTIGENOS HAMA ANIMALES PRODUCIDOS POR SENSIBILIZACION PREVIA
- NATURALEZA Y AVIDEZ DEL ANTICUERPO IMPORTANTES EN LA IDENTIFICACION DE INTERFERENCIAS
- USO DE GLOBULINAS NO INMUNES PARA REMOVERLOS

ZONAS DE INTERFERENCIA



LOS ANTICUERPOS INTERFERENTES NO SON NECESARIAMENTE HETEROFILOS

ANTICUERPOS ANTI ANIMALES

- ▣ ALTA AFINIDAD Y ESPECIFICIDAD
- ▣ BIEN DEFINIDOS
- ▣ MONOANTIGENICOS
- ▣ SENSIBILIZACION PREVIA
 - VACUNAS
 - MASCOTAS
 - OCUPACIONAL
 - OTRAS (CRUZADA)
- ▣ DIFICILMENTE REMOVIBLES



ANTICUERPOS HETEROFILOS

- ▣ POCA AFINIDAD Y ESPECIFICIDAD
- ▣ POCO DEFINIDOS
- ▣ POLIANTIGENICOS
- ▣ NO HISTORIA DE SENSIBILIZACION
- ▣ FACILMENTE REMOVIBLES

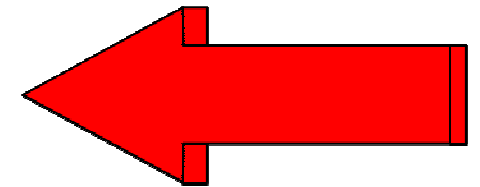
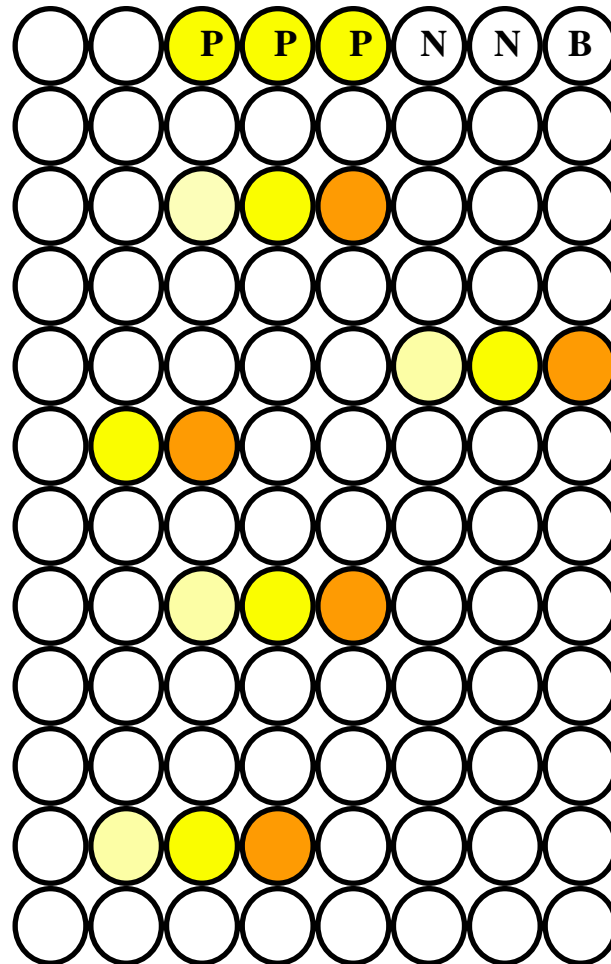
INTERFERENCIAS EN ELISA

- Interferencias propias de los ELISA
 - ▣ Presencia de enzima marcadora en la muestra o sustrato o producto
 - ▣ Lípidos, hemoglobina, bilirrubina (deben ser corregidos por el blanco)
 - ▣ Temperatura
 - ▣ Contaminaciones por arrastre en el momento del lavado
 - ▣ Otros

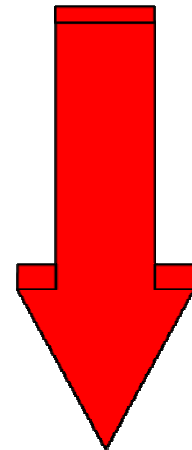
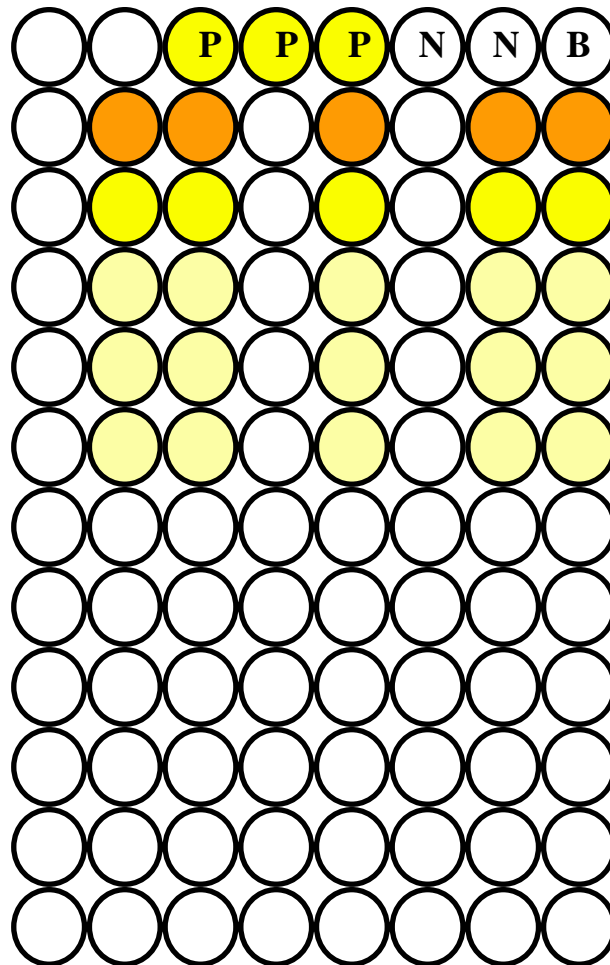


Contaminación cruzada

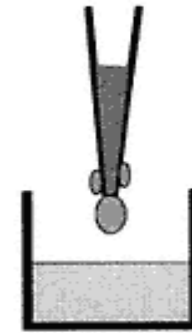
Carry Over



Contaminación de muestras por el lavador



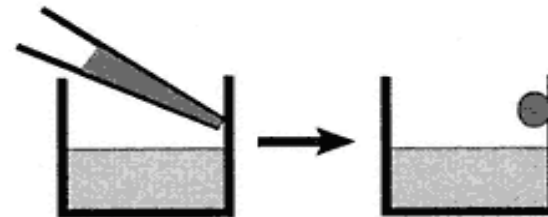
Avoid dripping from tips. When taking sample ensure that any excess liquid on outside of tip is conducted away by touching tip on side of container.



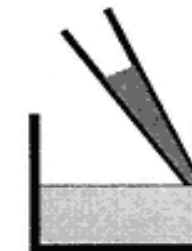
Do not press tips into wells; this bends the points of the tips and introduces error when expelling liquid by pipetting action.



Do not put tips in wells at the wrong angle; this can leave sample on side of wells.

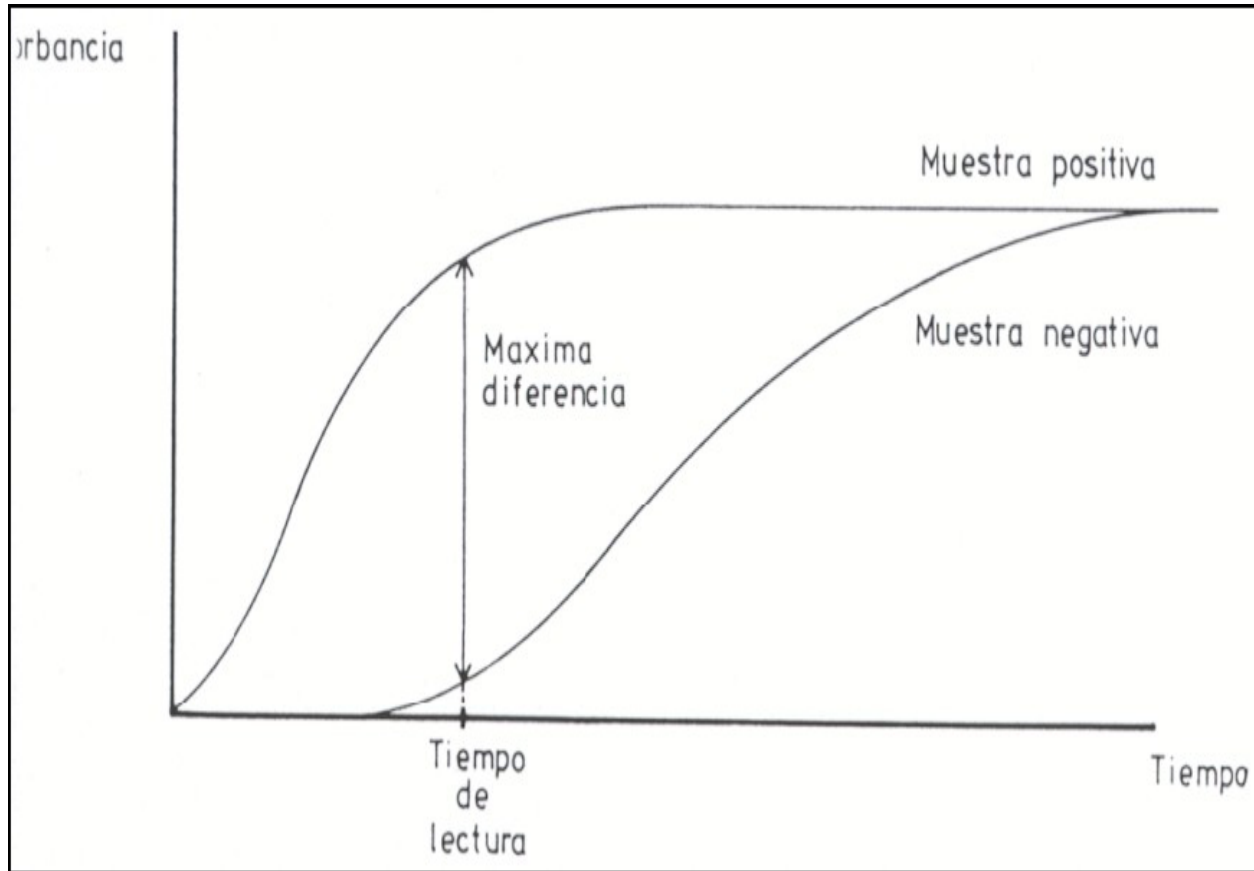


Make sure that tips touch sides of wells and liquid when adding sample, and when tip is leaving wells after expulsion of sample.



Influencia del dispensamiento de la muestra en los pocillos de ELISA

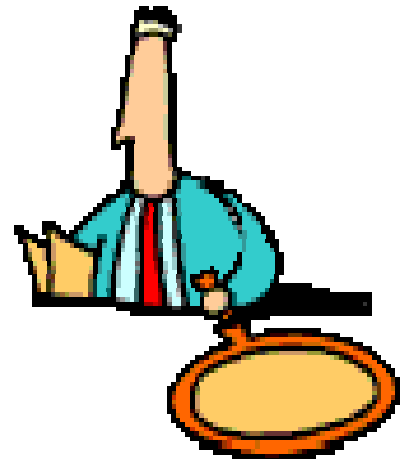
Finalmente, se debe optimizar el tiempo de incubación, realizándose lecturas seriadas hasta encontrar el óptimo, que será aquel en el que se encuentre mayor diferencia de color entre positivos y negativos de referencia. Las reacciones enzimáticas colorimétricas siguen curvas del tipo del que se muestra en la gráfica para muestras positivas y negativas, por lo que existe un tiempo de lectura para el cual la diferencia colorimétrica entre muestras positivas y negativas es máximo.



Variación de la absorción en función del tiempo para muestras positivas y negativas y tiempo óptimo de lectura o parada de la reacción.

Lectura e interpretación de los resultados

- La lectura de los resultados puede ser **valorada tanto visual como colorimétricamente**. A simple vista, pueden ser leídos ciertos ensayos rutinarios en los que no haga falta una cuantificación y no se presenten abundantes casos dudosos (*el ojo humano no es capaz de discernir una variación de 0,1 de densidad óptica*) ya que dicha lectura visual tendrá el inconveniente de la subjetividad y el de diagnosticar equivocadamente los casos límite. No obstante, evita la adquisición de aparatos relativamente costosos como son los lectores de microplacas.



Lectura e interpretación de los resultados

- Una de las grandes ventajas de la técnica ELISA es la posible **automatización de la lectura** y, por lo tanto, su objetividad. Dicha automatización se puede conseguir con un simple colorímetro o espectrofotómetro de cubeta o con sofisticados equipos de lectura automática de microplacas.
- Los **resultados finales de la lectura colorimétrica se reflejan numéricamente** mediante valores de absorbancia o densidad óptica que se obtendrán a la longitud de onda más adecuada para la coloración final alcanzada.

