

V. Las pruebas de Elisa

Elizabeth Guzmán-Vázquez*

Los ensayos inmunológicos son procedimientos en los cuales se utilizan anticuerpos como reactivos enlazantes "específicos". Y tienen aplicación universal para la determinación o cuantificación de fármacos terapéuticos y no terapéuticos, diversas sustancias biológicas, sustancias infecciosas o anticuerpos de respuesta del huésped en el suero, en la orina, en el líquido cefalorraquídeo en saliva y en cualquier líquido biológico donde se encuentre la sustancia a investigar.

El radioinmunoensayo desarrollada en 1959 por Yalow y Berson, es el precursor de los ensayos enmunoenzimáticos que fueron descritos originalmente en 1971 por Engvall y Perlmann, y Van Wemen y Schuurs, sin embargo el uso de material radioactivo ha limitado el uso del radioinmunoensayo, y a la vez a popularizado el empleo del inmunoensayo enzimático (EIA), del que hay dos técnicas principales: el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas y el ensayo inmunológico multiplicado por enzimas (EMIT).

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utiliza como sus siglas lo indican una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Existen diversas variaciones al método de ELISA para detectar y cuantificar ligandos de alto peso molecular (>30 000 daltons), el marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpos específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario. Casi todas las pruebas ELISA son ensayos en fase sólida en los cuales se adsorbe un antígeno o un anticuerpo sobre un soporte sólido. Algunos de los protocolos se basan en reacciones de enlace competitivo y otras en reacciones de enlace no competitivo, pero en todas las pruebas ELISA se requiere de un paso de separación para eliminar el conjugado enzimático libre antes de proceder a determinar la cantidad de conjugado enzimático enlazado. Para lo cual se añade sustrato enzimático y se mide la reacción catalítica entre la enzima y el sustrato. Por sus características catalíticas las enzimas son marcadores muy sensibles y versátiles. Una sola proteína enzimática puede transformar en algunos minutos gran número de moléculas de sustrato en una cantidad igualmente abundante de producto final, produciendo un cambio de color amplificado y que se detecta con facilidad. En el método ELISA de inhibición el cambio de color se reduce, porque la actividad enzimática se inhibe cuando el anticuerpo se enlaza al conjugado enzimático¹⁻³.

La prueba ELISA se basa en varias teorías: 1) El antígeno y anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica; 2) las enzimas tienen actividad específica alta y convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite detectar concentraciones muy bajas del ligando; 3) la actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento; y 4) las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se va a analizar.

Los anticuerpos utilizados en el método ELISA son de origen monoclonal o policlonal que se suministran como antisuero no fraccionado o fracciones de inmunoglobulina purificada, pueden ser solubles o estar inmóviles en un soporte sólido, son empleados como conjugados no marcados o enzimáticos y por último reaccionan con determinante antigénico específico de un antígeno o de un anticuerpo ligando-específico (anticuerpo primario) según el protocolo de análisis.

Los antígenos se purifican o se producen con tecnología recombinante, y al igual que los anticuerpos se utilizan como conjugados marcados o enzimáticos y son inmóviles o solubles, dependiendo del protocolo de análisis. Como se puede deducir los conjugados enzimáticos son antígenos o anticuerpos unidos en forma covalente a la enzima de elección. Así pues, el reactivo que se forma de la unión covalente entre enzima y antígeno o anticuerpo es el conjugado. Se conoce que es posible, también, marcar de forma no covalente anticuerpos o enzimas con biotina y agregar avidina. La avidina posee cuatro sitios de enlace para la biotina y no todos ellos participan en la interacción con el anticuerpo marcado con biotina. Los sitios de enlace libres funcionan como aceptores para la enzima marcada con biotina. Este procedimiento se acorta utilizando anticuerpo marcado con biotina y avidina marcada con enzima⁴⁻⁶.

Las combinaciones de enzima y sustrato que se emplean en los diversos métodos ELISA incluyen: 1) peroxidasa de rábano y su sustrato, peróxido de hidrógeno que en presencia de cromógeno o-fenilendiamina produce un producto color amarillo-naranja medible; 2) galactosidasa beta y su sustrato o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido que se transforma en un producto nitrofenolado amarillento medible; o 3) fosfatasa alcalina y

* Química fármaco-bióloga.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Banco de Sangre Instituto Nacional de Cancerología.
Laboratorio de Endocrinología Instituto Nacional de Pediatría.

su sustrato p-nitrofenilfosfato que también se transforma en nitrofenolato. Se utiliza ácido sulfúrico para inhibir la actividad enzimática y estabilizar el producto final de reacción que tiene color.

Ensayos de enlace competitivo

Los ELISA en fase sólida, no competitivos se utilizan para determinar antígenos, haptenos o anticuerpos. Aquí el ligando no marcado compite con un ligando conjugado con enzima por un número limitado de sitios de enlace con el anticuerpo inmovilizado, y siguiendo el protocolo se retira el ligando no reactante, para así poder relacionar inversamente la cantidad de producto que se forma con la concentración del ligando no marcado en la muestra problema.

Ensayos de enlace no competitivo

Son denominados también, técnicas del emparedado y son los métodos más utilizados para determinar antígenos que por lo menos tienen dos determinantes antigénicos, como fase sólida pueden ser utilizadas perlas de poliestireno en donde se absorbe un exceso de anticuerpos generalmente monoclonales, y se sigue el protocolo de trabajo retirando también como en los casos anteriores el exceso de antígeno presente no unido.

Técnicas de ensayo inmunológico por multiplicación enzimática

La técnicas de ensayo inmunológico por multiplicación enzimática (EMIT) es un análisis sin separación en el cual se emplea una enzima conjugada al hapteno de interés

como marcador en una reacción enzima-sustrato como sistema de detección. Este tipo de análisis lo describieron Rubenstein y colaboradores en 1972. Su principio es que se pueden determinar la cantidad de interacción entre el hapteno y el anticuerpo utilizando un marcador enzimático. Se basa en una reacción de enlace competitivo entre el hapteno de la muestra y el hapteno conjugado con la enzima en un número limitado de sitios de enlace con el anticuerpo. El enlace del anticuerpo al hapteno conjugado con la enzima produce inhibición de la actividad enzimática. Esta inhibición se debe a que el anticuerpo interfiere estéricamente con el enlace del sustrato al sitio catalítico de la enzima o el enlace del anticuerpo transforma la configuración de la enzima. La cantidad de hapteno en la muestra determina el número de sitios para anticuerpos disponibles para enlazar e inactivar el hapteno conjugado con la enzima. A medida que hay más hapteno hay menos anticuerpo disponible para inhibir la actividad enzimática, por lo que el cambio de color se observa directamente proporcional a la cantidad de hapteno presente en la muestra.

Referencias

1. The antiglobulin test. Technical manual. 12ª. Ed. AABB. cap. 11. US. 1996.
2. **Petz LD, Garratty G.** Antiglobulin sera, past, present and future. Transfusión 1978;18:257.
3. **Raichle TL, Paranto ME.** Compatibility testing. En: Hardening MD. Modern blood banking and transfusion practices. Philadelphia:FA Davis; 1994.p.256-75.
4. **Brecher ME.** Technical Manual AABB Press 14Th ed Bethesda, Maryland 2003.
5. **Watkins WM.** The ABO blood group system: historical background. Transfusion Medicine 2001;11:243-66.
6. **Chiaroni J.** Terminologie numerique des antigenes de groupes sanguins erythrocytaires. Transfus Clin Biol. 1998 ; 5: 366-71.