

CALIBRACIÓN DE LECTORES DE ELISA

(Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima)

Por María del Rosario González Olvera

En esta edición abordamos el tema de la metrología en lectores de ELISA, que son instrumentos ópticos de análisis cualitativo y u o cuantitativo utilizados en industria, laboratorios clínicos, laboratorios biotecnológicos, laboratorios de investigación y desarrollo, etc., su adecuada calibración marca un requisito importante en el desempeño del instrumento y en la calidad de la prueba que realizan.



INTRODUCCIÓN

Empezaremos por conocer el significado de la palabra ELISA que es un acrónimo de las siglas del nombre completo de la prueba en inglés: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, se traduce al español como “Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas” y es una técnica de laboratorio desarrollada en los años 70’s, la cual determina la presencia de **antígenos** en una muestra determinada.

Los antígenos son fragmentos de proteínas y para ser identificados la prueba ELISA requiere de otros dos componentes un **anticuerpo** (que se une al antígeno) y una **enzima** (que se activa y señala la unión al antígeno), la prueba se realiza sobre un sustrato **inmunoabsorbente**, para producir una reacción bioquímica inmovilizando al antígeno esto dará lugar a un desarrollo de coloración característica de la muestra que será cuantificada por el instrumento (lector de ELISA).

Apasionados por la Metrología

La Guía MetAs, es el boletín electrónico de difusión periódica de MetAs & Metrologos Asociados.

En *La Guía MetAs* se presentan: noticias de la metrología, artículos e información técnica; seleccionada por nuestros colaboradores, que deseamos compartir con Usted, colegas, usuarios, clientes, estudiantes, amigos y en fin, con todos aquellos interesados o relacionados con la metrología técnica e industrial.

Calle: Antonio Caso # 246 Colonia: Centro
49 000, Cd. Guzmán, Zapotlán El Grande, Jalisco, México.
Teléfono & Fax: 01 (341) 4 13 61 23 multi-línea
E-mail: laguiametas@metas.mx. Web: www.metas.com.mx

Servicios Metrológicos:

Laboratorio de Calibración:

Presión, Alto Vacío, Temperatura Contacto & Radiancia, Humedad, Eléctrica, Vibraciones, Masa, Densidad, Volumen y Óptica

Ingeniería:

Venta de Instrumentos, Desarrollo de Sistemas de Medición y Software, Reparación y Mantenimiento

Gestión Metrológica:

Subcontratación de Servicios, Outsourcing, Selección de Proveedores, Confirmación Metrológica

Consultoría:

Capacitación, Entrenamiento, Asesoría, Auditorías, Ensayos de Aptitud, Sistemas de Calidad

Existen diferentes tipos de pruebas de ELISA, sólo mencionaremos algunas de ellas:

ELISA directo: es la forma más básica de realizar la técnica, consiste en recoger una muestra a estudiar y ponerla en un pozo (un recipiente pequeño) en frente de una muestra igual pero contaminada con el germen a estudiar, y otra muestra en la que se sabe que no hay germen. Se aplica el anticuerpo con la enzima en los tres pozos y se compara la muestra a estudio con las otras dos.

ELISA indirecto: se realiza de forma similar al ELISA directo, pero en este caso se añade primero un anticuerpo sin enzima y después uno con enzima. De esa forma, la señal que emite el enzima es mucho más potente y la prueba es más sensible.

ELISA sándwich: en este caso en los pozos primero se añade un anticuerpo y después la muestra, para que los antígenos queden ya retenidos en el fondo del pozo. Después se añade el anticuerpo con la enzima. Es la forma más eficaz de realizar la prueba.

ELISPOT: se trata de un tipo de ELISA que permite conocer de forma cuantitativa el antígeno, incluso identifica el número concreto de células donde se encuentra.

La detección del complejo antígeno-anticuerpo que hace el lector de ELISA puede ser por métodos colorimétricos, en donde la reacción bioquímica producida por éste genera un color el cual absorbe cierta cantidad de luz del espectro Visible a cierta longitud de onda y es proporcional a la concentración del mismo complejo.

Una variación de los métodos colorimétricos son los métodos de detección por fluorescencia y luminiscencia donde la reacción bioquímica genera emisión de luz la cual indica concentración del analito analizado.

Los factores que más afectan a las pruebas de ELISA son el tiempo de reacción, la temperatura y la exposición a la luz.



Los factores que afectan a las pruebas de ELISA son el tiempo de reacción, la temperatura y la exposición a la luz.

METROLOGÍA EN LECTORES DE ELISA

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right)$$

El principio de medición es el mismo de los espectrofotómetros de Ultravioleta-Visible: cantidad de luz que transmite y u o absorbe la muestra a analizar:

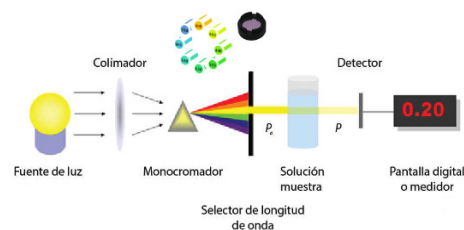
Donde: A = absorbancia y u o densidad óptica.

I = intensidad de luz absorbida

I_0 = intensidad de luz inicial

INSTRUMENTACIÓN

El Lector de ELISA es un espectrofotómetro especializado; a diferencia de los espectrofotómetros convencionales que permiten efectuar lecturas en un intervalo amplio de longitud de onda, éste dispone de filtros o rejillas de difracción que limitan la selección de longitud de onda a aquellas que se utilizan en la técnica ELISA, la cual generalmente se realiza con longitudes de onda comprendidas entre los 400 nm y los 750 nm . (Región Visible), muy pocos operan en la región Ultravioleta y pueden efectuar análisis desde los 340 nm a 700 nm.



El sistema óptico utiliza la fibra óptica para llevar la luz hasta los pozos de la microplaca, donde se encuentra la muestra bajo análisis, la luz que atraviesa la muestra tiene un diámetro que varía de 1 mm a 3 mm.

Un sistema de detección recibe la energía luminosa, proveniente de la muestra, la amplifica, determina la absorbancia y, a través de un sistema de lectura, la convierte en datos que permiten interpretar el resultado de la prueba.

Las muestras del ensayo de ELISA se colocan en microplacas rectangulares de poliestireno con diseño especial, las cuales disponen de un número definido de pozos o pocillos, generalmente de 96 en una configuración de 8 filas por 12 columnas.



El sistema óptico utiliza la fibra óptica para llevar la luz hasta los pozos de la microplaca

Actualmente existen diferentes modelos de Lectores de ELISA, desde los más sencillos de operación manual hasta los más sofisticados que ya cuentan con programas específicos para determinación de analitos con resultados inmediatos de concentración.

CALIBRACIÓN Y MATERIALES DE REFERENCIA

El objetivo de la calibración metrológica de un Lector de ELISA consiste en determinar el sesgo instrumental y su correspondiente incertidumbre; como ya se mencionó anteriormente que un Lector de ELISA es un espectrofotómetro especializado su calibración también similar, pues ocupa materiales de referencia ópticos certificados.



En el caso de los lectores de ELISA la escala que se calibra es la fotométrica, la

magnitud es la ABSORBANCIA y los materiales de referencia son filtros de densidad neutra.

La variante en los filtros de densidad neutra, es su diseño ya que para poder ser leídos por el Lector de ELISA son de forma circular y están montados en una placa metálica, de las mismas dimensiones que las microplacas donde realizan los ensayos de ELISA.

Los filtros de densidad neutra están certificados a diferentes longitudes de onda con el objeto de cubrir el mayor porcentaje de ensayos de ELISA que se realizan, típicamente estas son: 405 nm; 450 nm; 490 nm; 550 nm; 620 nm; 630 nm; 690 nm; y 750 nm.

TRAZABILIDAD

De acuerdo al Sistema Internacional de Unidades se tiene:

Magnitud: Absorbancia

Unidad : 1

Símbolo : α

La trazabilidad se tiene al Patrón Nacional de México mantenido por el CENAM, CNM-PNF-3 (Absorbancia, Transmitancia y Longitud de Onda)

Las fuentes de incertidumbre mínimas y básicas a considerar en la calibración de Lectores de ELISA son:

- Incertidumbre de los filtros de densidad neutra.
- Incertidumbre de la resolución en absorbancia del Lector.
- Incertidumbre de la repetibilidad.

Pueden considerarse otras fuentes de incertidumbre dependiendo de la profundidad del análisis como ruido fotométrico, deriva, estabilidad, linealidad, etc.

APLICACIÓN DEL LECTOR DE ELISA

Las pruebas o ensayos de ELISA son ampliamente utilizadas en muchas áreas ciencia y tecnología por ejemplo en el área médica-clínica fue la primera prueba de detección del VIH, y así progresivamente se utiliza en la determinación de otros virus, bacterias, hormonas, etc.

En la industria alimentaria se aplican para la detección de alérgenos en los

La prueba de
ELISA fue la
primera
prueba de
detección de
VIH

alimentos ó compuestos tóxicos, por ejemplo la determinación de clenbuterol que es un fármaco de uso restringido en la carne para consumo humano.

También en la industria agropecuaria este ensayo es muy útil para determinaciones de virus en patologías animales o en productos agrícolas.

CONCLUSIÓN

La prueba de ELISA se emplea para la detección de compuestos biológicos (antígenos-anticuerpos), esta técnica emplea un espectrofotómetro especializado llamado Lector de ELISA que mide la cantidad de luz absorbida por la muestra la cual se basa en un método colorimétrico que proporciona la concentración y u o presencia de los compuestos.

De acuerdo con la normatividad de certificación de las pruebas de ELISA, el lector debe ser calibrado conforme a las directrices metrológicas de nuestro país, cumpliendo con un programa de calibración de acuerdo al frecuencia y uso del instrumento, cabe mencionar la importancia de dar su mantenimiento preventivo antes de la calibración.

Las pruebas o ensayo de ELISA tienen gran aplicación en áreas que involucran la salud de los seres vivos, por lo que el conocimiento tanto de la técnica como del manejo del Lector es muy importante en la confiabilidad de los resultados.

Nuestro Laboratorio de Metrología Óptica ofrece el servicio de calibración de Lectores de ELISA aprobado técnicamente por el Centro Nacional de Metrología (CENAM) y acreditado por la Entidad Mexicana de Acreditación (ema).

REFERENCIAS

- J. Pezet Nava., J. F. Mendoza., & I. Hernández. (1998). El sistema Internacional de Unidades (SI). *Publicación Técnica CNM-MMM-PT-003*. Querétaro, Qro., México.
- R. González. (2004). *Calibración de Espectrofotómetros Ultravioleta-Visible*. Querétaro, Qro., México.
- A. Ruíz. (2002). CNM-MFO-OP-001. *Métodos y pruebas para la caracterización del espectrofotómetro de referencia del CENAM*. Querétaro, Qro, México.

Lector de ELISA mide la cantidad de luz absorbida por la muestra la cual se basa en un método colorimétrico