Técnicas analíticas: ventajas y limitaciones

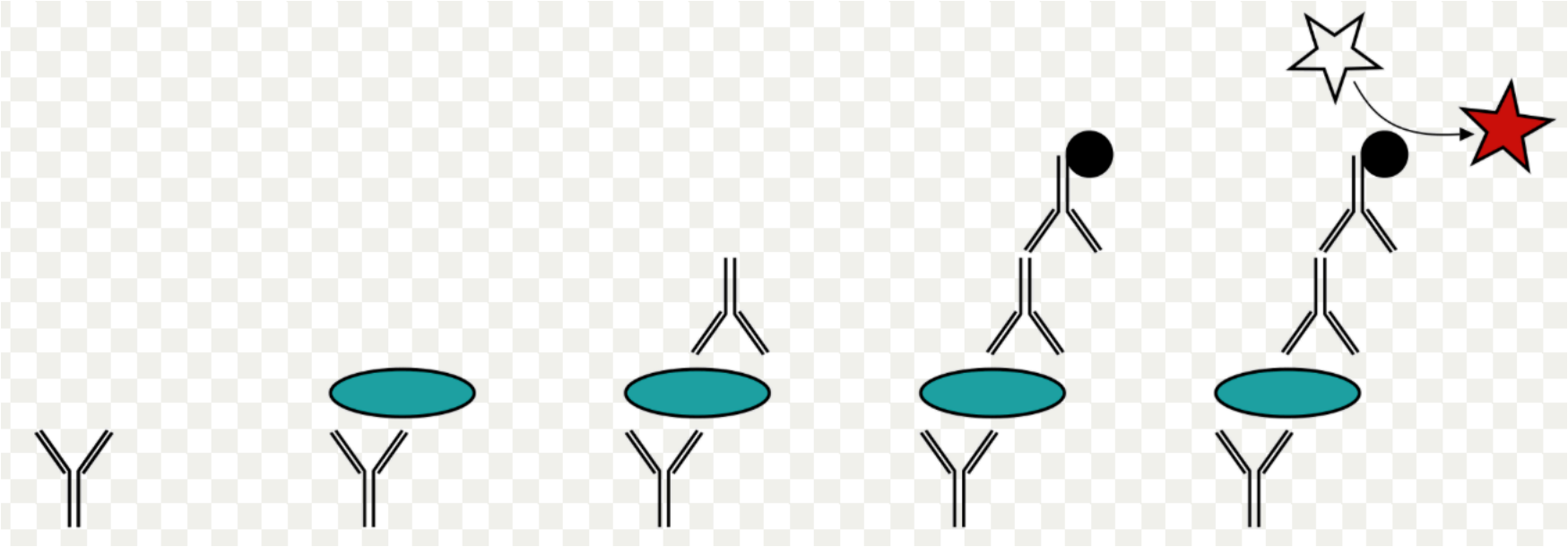
Dra. MD Bellés Medall

24 Abril 2015

- ✓ Fundamento del E.L.I.S.A
- ✓ Equipos comerciales: diferencias
- ✓ Inmunogenicidad:
  - ELISA puente y sus limitaciones
  - Disociación ácida
- ✓ Otras técnicas
- ✓ Interpretación resultados

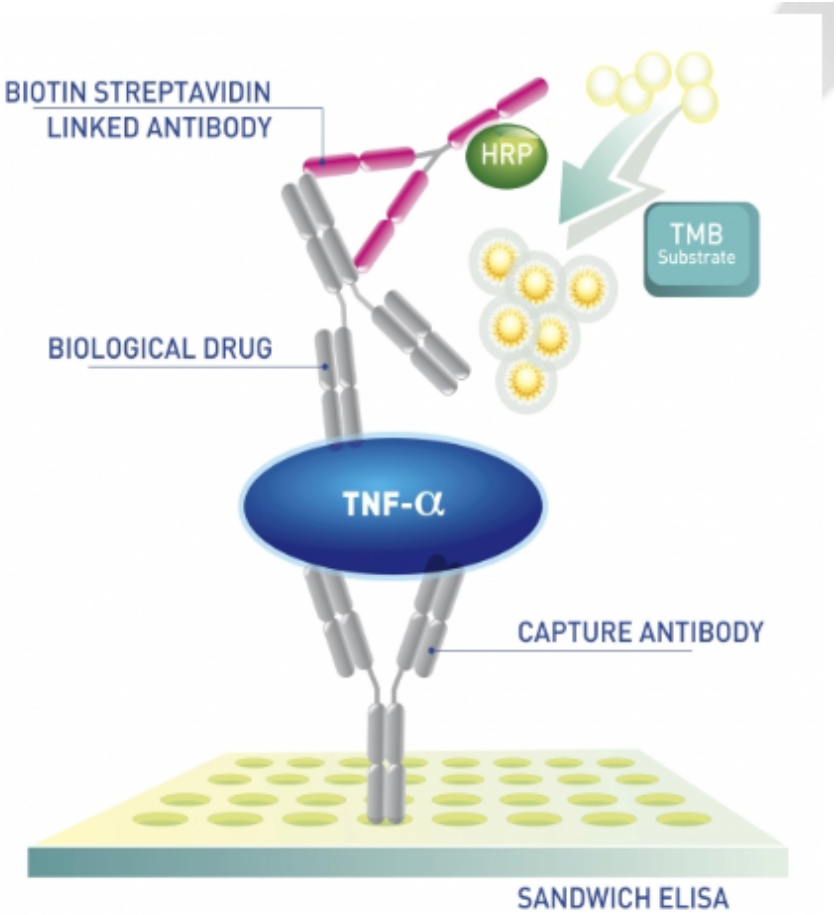
E.L.I.S.A.

(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)



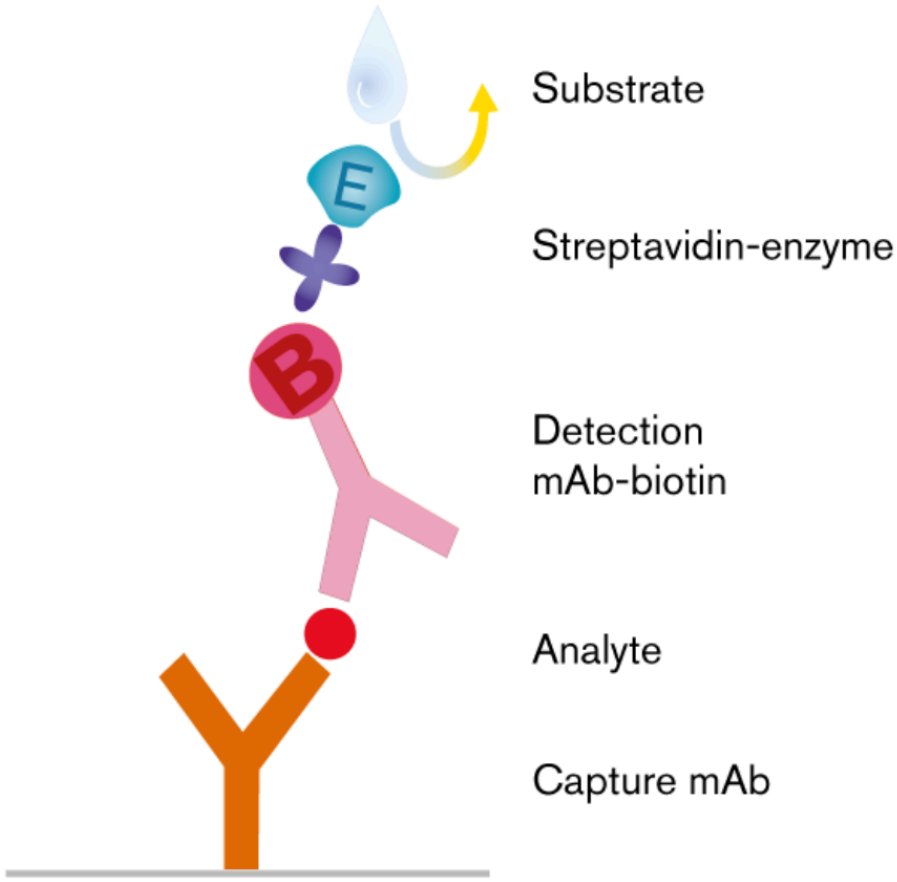
Equipos	Fabricante	Distribuidor
PROmonitor	PROTEOMIKA	GRIFOLS
LISA-TRACKER	Theradiag	Análisis y Genética

DAS
(Double Antibody Sandwich)



PROmonitor

HADAS
(Heterologous Assays-DAS)



LISA-TRACKER

PROmonitor LISA-TRACKER

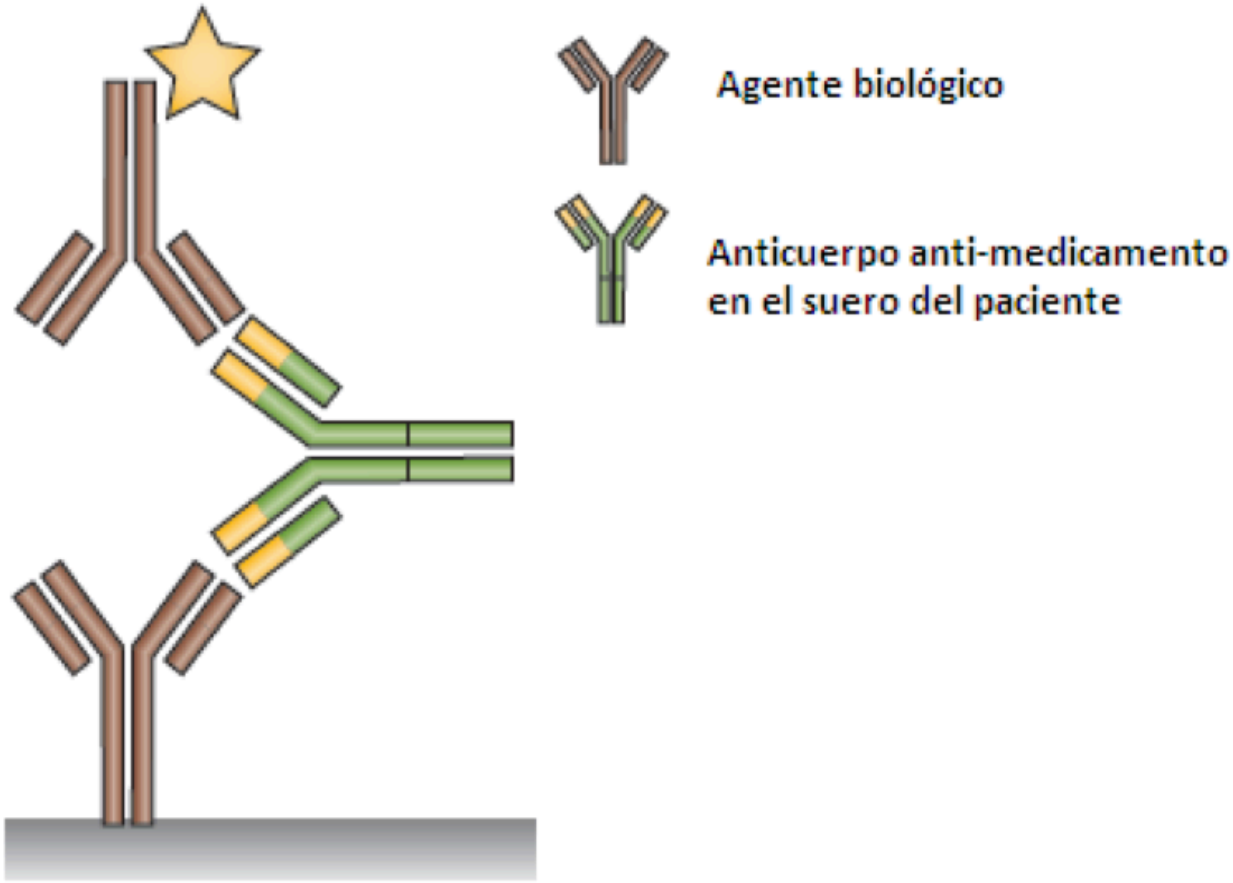
Conjugado	Ac-HRP	Ac biotinilado Estreptavidina-HRP
Sustrato	TMB	TMB
CP	+	+
CN	+	-
Calibración	6 ptos (0,024-12 mcg/ml)	5 ptos (0,1-8 mcg/ml)
Nº muestras/placa	40	42
Diluciones	1:10; 1:200	1:101

	PROmonitor	LISA-TRACKER
Infliximab-AAI	X	X
Adalimumab-AAA	X	X
Etanercept-AAE	X	X
Rituximab-AAR	X	X
Golimumab-AAG	X	X
Certolizumab-AAC	En desarrollo	X
Tocilizumab-AAT	En desarrollo	X
Ustekinumab-AAU	En desarrollo	En desarrollo
Bevacizumab-AAB	-	X
Trastuzumab-AAT	-	En desarrollo
Vedolizumab-AAV	-	En desarrollo

- Automatizado
- Sencillo y rápido (3,5-4h)
- Nº muestras/sesión = 40-42
- Cuantificación del fármaco libre
- Espacio (80x150cm, 1,9m^3)

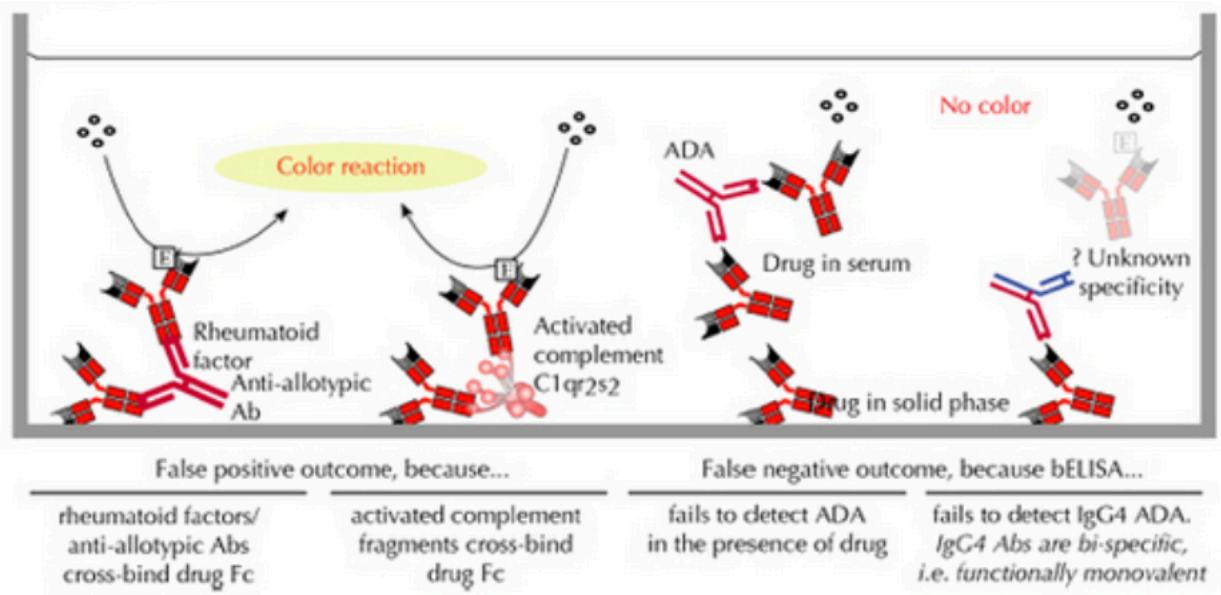
- Amplificación de la señal
- ↓ especificidad
- Pérdida de reactividad (humedad, Tª, luz)
- Curva calibración/sesión
- Ausencia patrón estándar

Inmunogenicidad: ELISA puente



ELISA puente

- ✓ Ac negativos: datos "no-concluyentes"
- ✓ Baja especificidad:
  - No detecta IgG_4
  - Falsos positivos: FR, complemento activado



Rheumatol Int
DOI 10.1007/s00296-014-3032-0

ORIGINAL ARTICLE

Practical application of acid dissociation in monitoring patients treated with adalimumab

Francisca Llinares-Tello · José Rosas-Gómez de Salazar · José Miguel Senabre-Gallego · Gregorio Santos-Soler · Carlos Santos-Ramírez · Esteban Salas-Heredia · Xavier Barber-Vallés · Juan Molina-García · AIRE-MB Group

Received: 17 January 2014 / Accepted: 23 April 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

20 µl suero + 100 ml ácido acético 300 mM (pH=3)
↓ 15 min , Tª amb
+ 31 µl Tris base sol (neutralizar)
↓ 5 min, agitar
+ 49 µl sol buffer (dil 1:10)

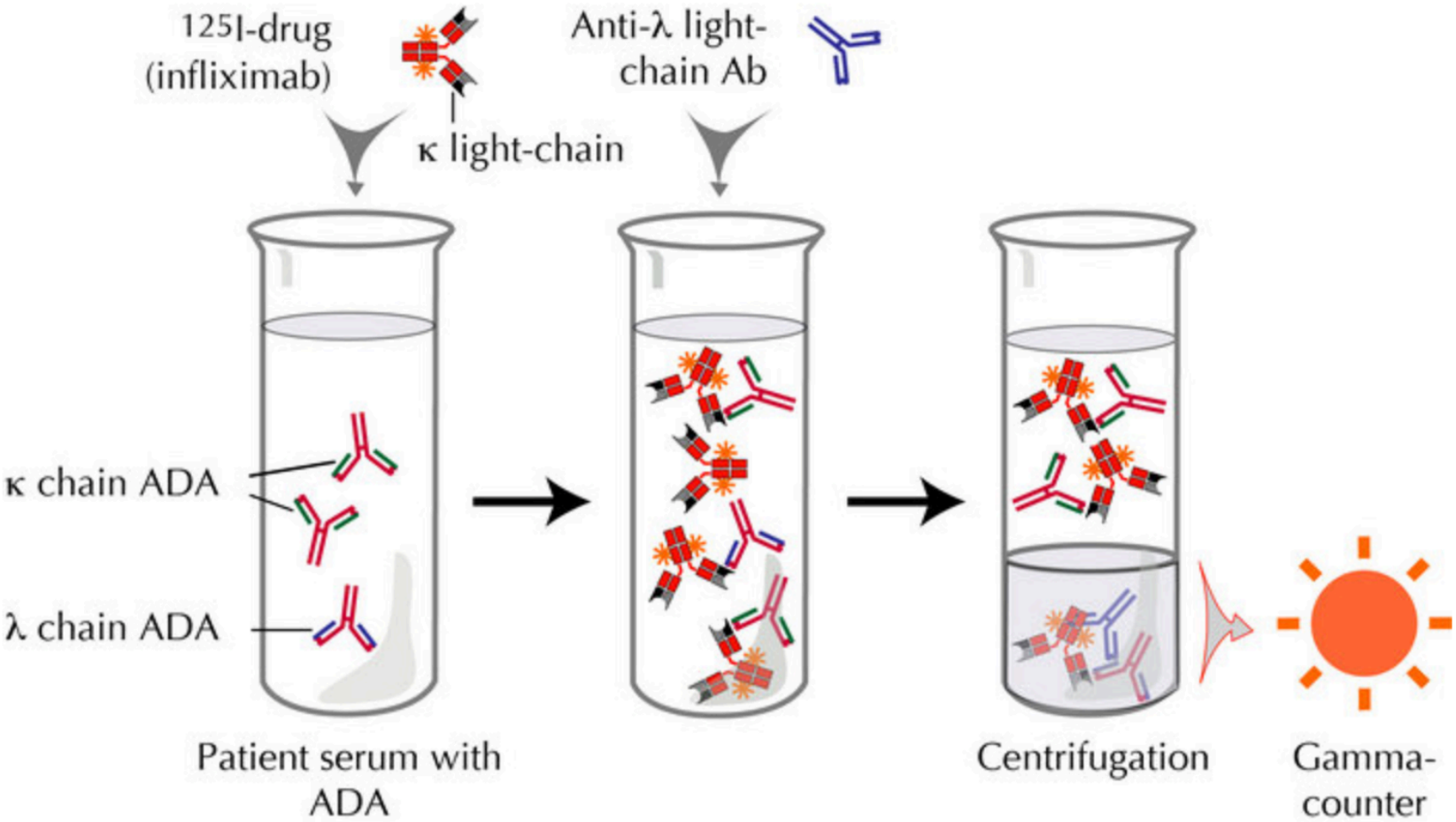
Disociación ácida

- ✓ Estrategia para detectar precozmente inmunogenicidad
- ✓ Pre-tratamiento de la muestra
- ✓ Técnica cualitativa
- ✓ No se detecta IgG_4
- ✓ % recuperación AAF ↓:
  - Desnaturalización de los AAF tras acidificación
  - AAF baja afinidad pérdida por lavados
  - Parcial formación de inmunocomplejos tras neutralización.

Otras técnicas

- ✓ RIA
- ✓ HMSA
- ✓ Gen reportero

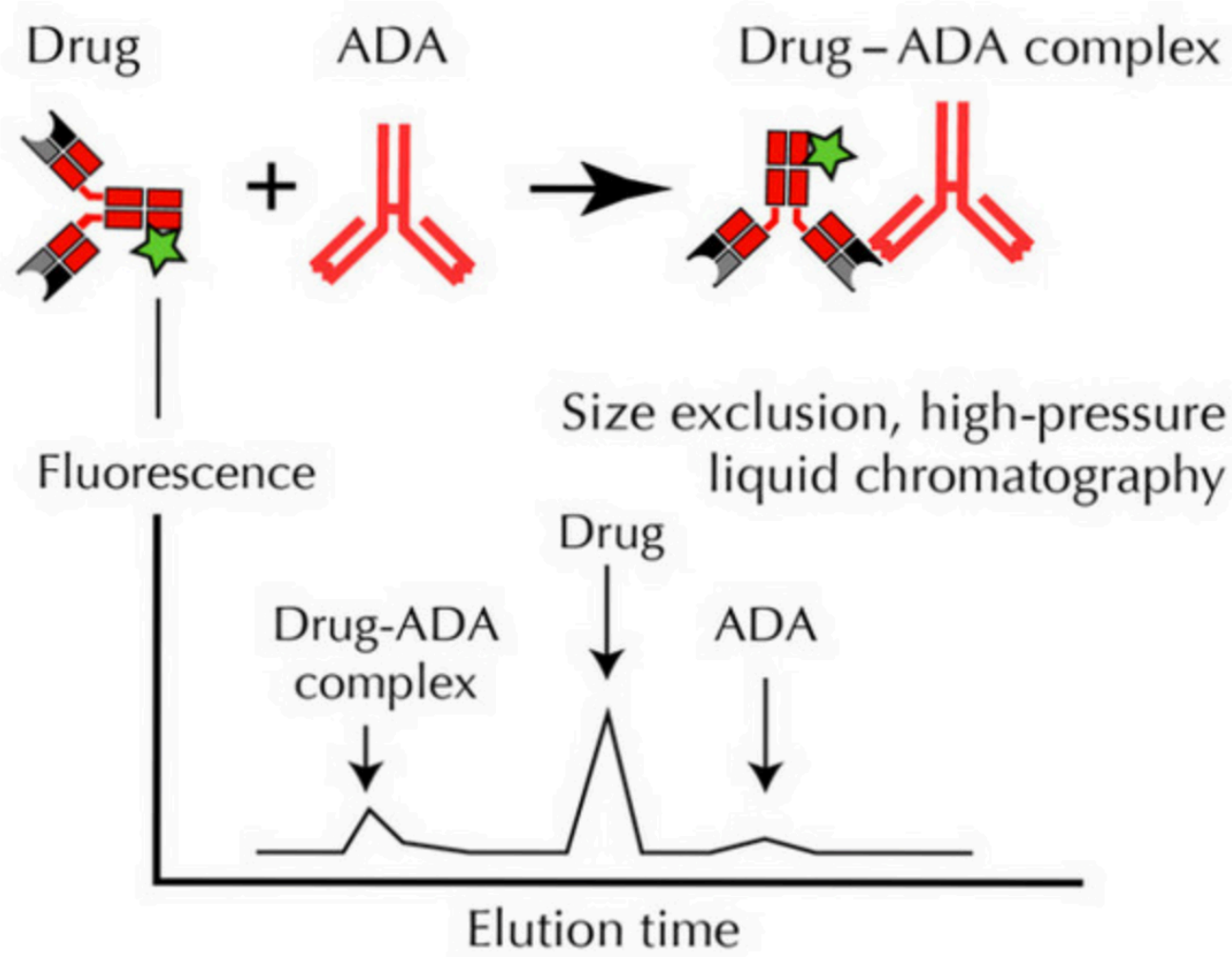
Radioimmunoassay (RIA) for ADA



- ↑Especificidad
- ↑Sensibilidad

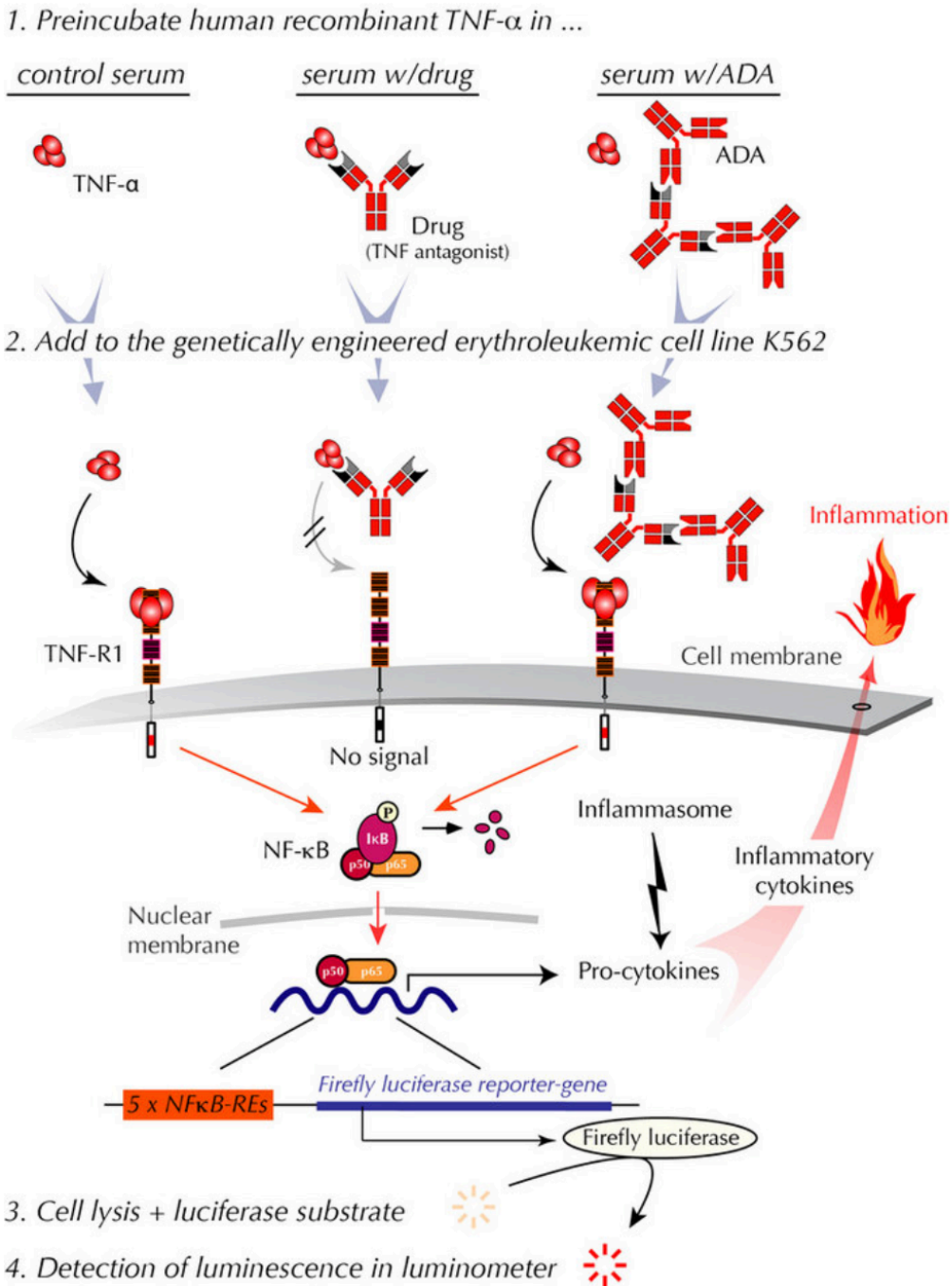
- Complejidad
- Caro
- ↑tiempo incubación

Homogeneous mobility-shift assay (HMSA) for ADA



- ↑↑Especificidad
- ↑↑Sensibilidad
- Investigación
- Fraccionamiento immunocomplejos

Reporter-gene assay (RGA) for ADA

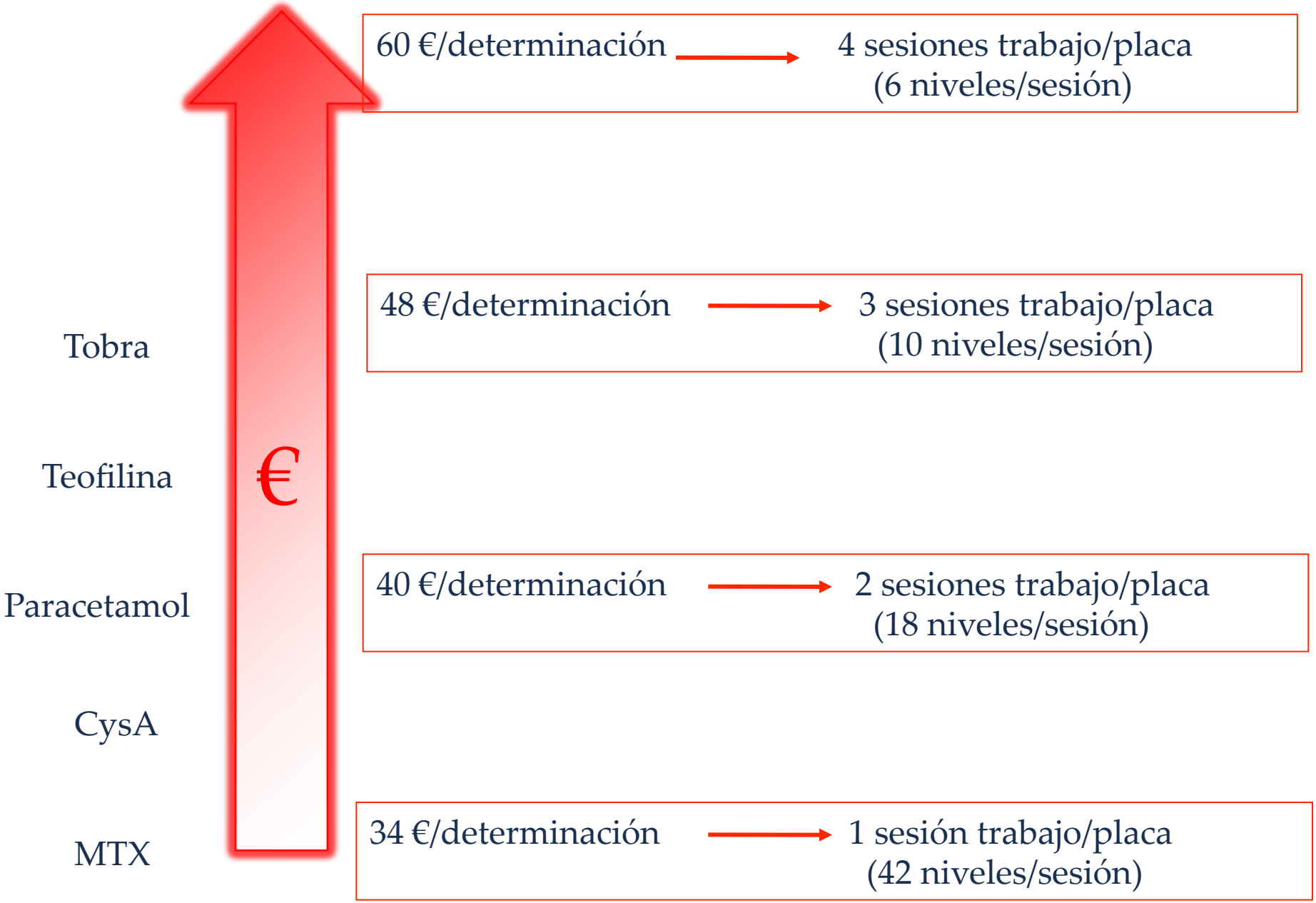


- Actividad biológica
- Universal
- Rápido

- Cultivo celular
- No disponible en Europa

Interpretación resultados

- ✓ No ‘‘gold standard’’
- ✓ Variabilidad y diferencias sistemáticas entre técnicas
- ✓ ELISA puente:
  - Técnica cualitativa
  - Unidades no estandarizadas para AAF (ng/ml; AU/ml)
- ✓ Determinación de anti-TNF y AAF en el mismo laboratorio
- ✓ Titulaciones bajas AAF: seguimiento farmacocinético
  - Falso positivo
  - Ac “transitorios”
  - Fracaso secundario por inmunogenicidad


60 €/determinación
4 sesiones trabajo/placa
(6 niveles/sesión)
48 €/determinación
3 sesiones trabajo/placa
(10 niveles/sesión)
40 €/determinación
2 sesiones trabajo/placa
(18 niveles/sesión)
34 €/determinación
1 sesión trabajo/placa
(42 niveles/sesión)
Tobra
Teofilina
Paracetamol
CysA
MTX
€

Coordinación entre Unidades FCC

- ✓Determinación AAF: tiempo de respuesta *vs* eficiencia
- ✓Definir patrones estándar
- ✓Establecer intervalos terapéuticos/patología