

The word "ELISA" is written in a bold, yellow, sans-serif font with a black outline. It is positioned in the upper center of the slide. The letters are partially overlaid by several orange circles. A thin orange circle is behind the 'E', 'L', and 'I'. A solid orange circle is behind the 'S'. Another solid orange circle is to the right of the 'A'. Below the text, there are two more solid orange circles on the left and one thin orange circle on the right.

# ELISA

**Dra Morella Bouchard**  
**Instituto de Inmunología Clínica**  
**Universidad de Los Andes**

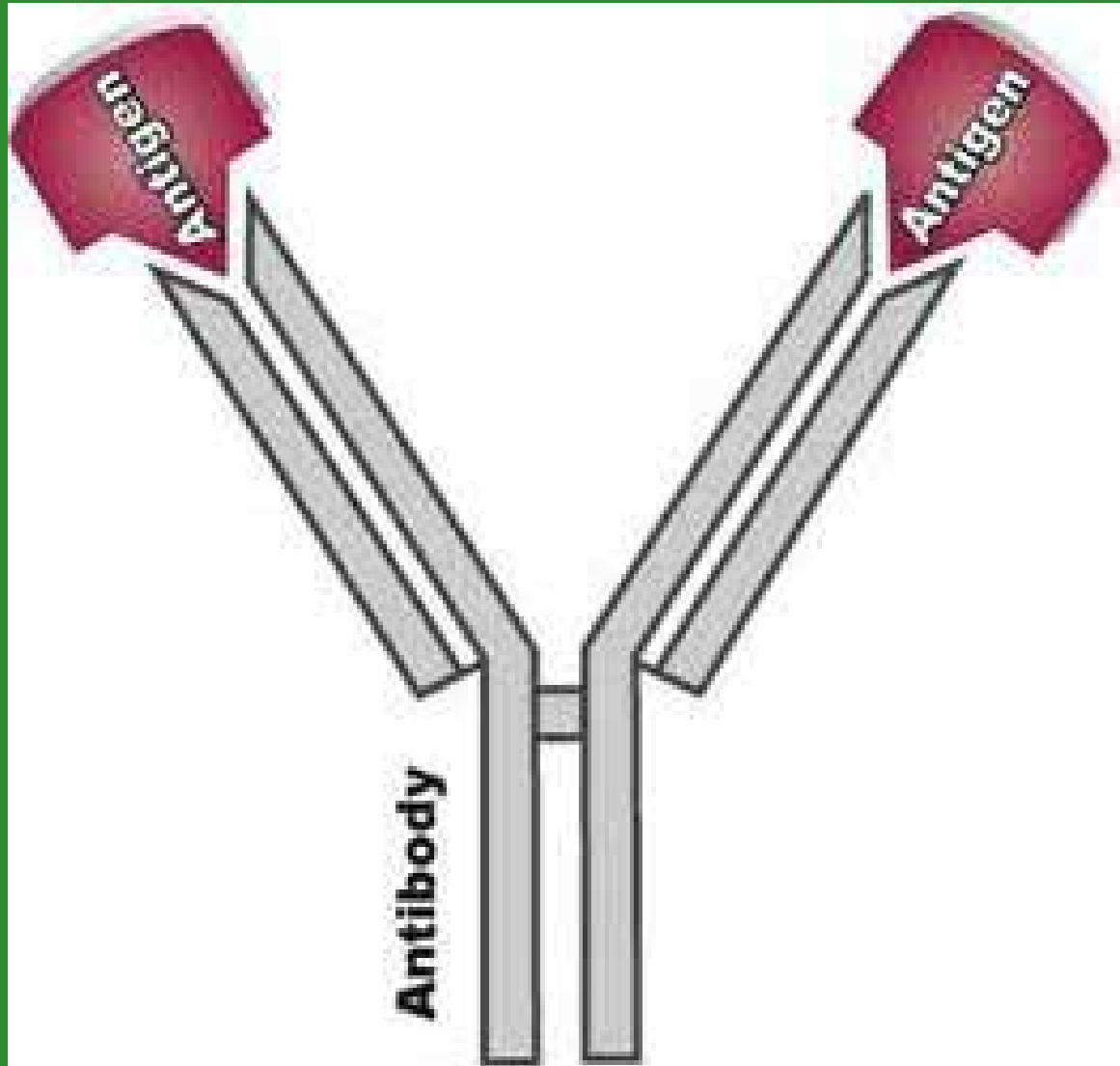
# ELISA



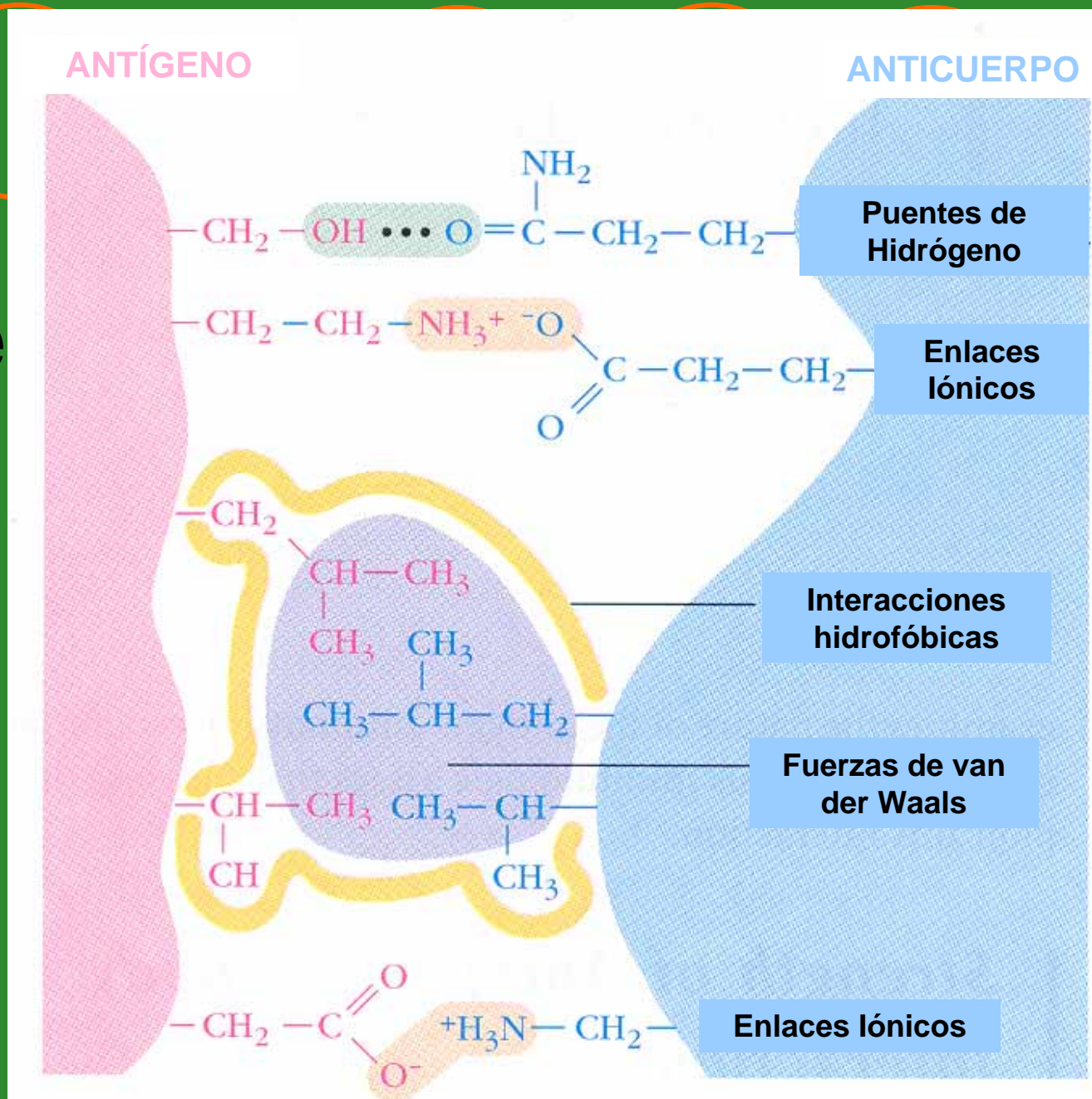
*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

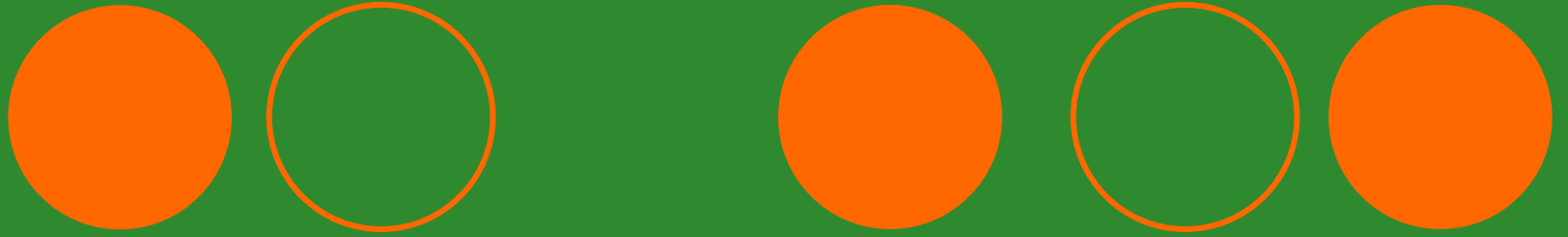
**Dra Morella Bouchard**  
**Instituto de Inmunología Clínica**  
**Universidad de Los Andes**

# Interacción Antígeno Anticuerpo



# Fuerzas que participan en la Interacción Antígeno Anticuerpo

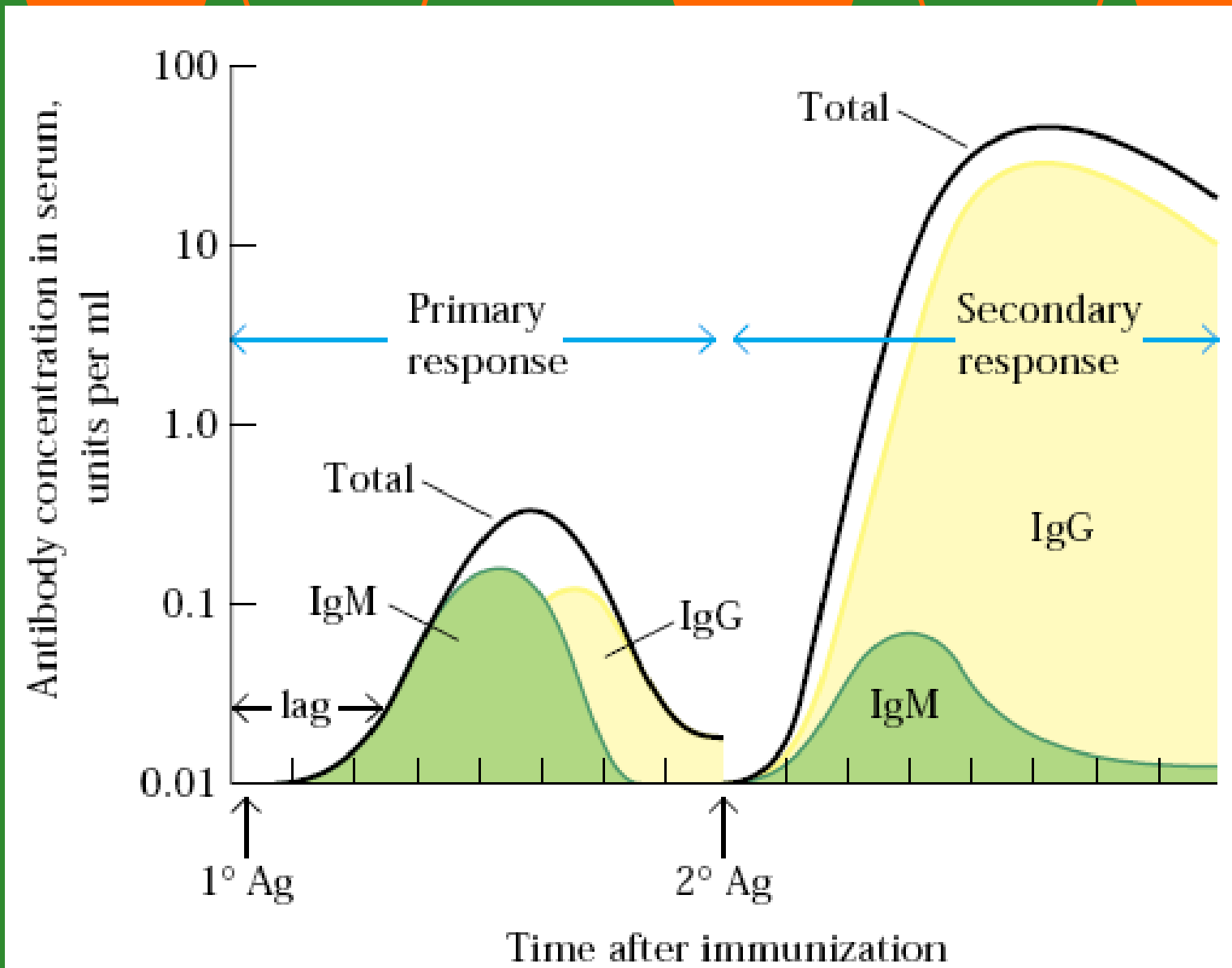




# Características del Ac relacionadas con el reconocimiento del Ag

- Especificidad
- Diversidad
- Afinidad y Avidéz

# RESPUESTA HUMORAL



# ELISA

- **Descrita por Engvall y Perlman en 1971**
- **Uno de los inmunorreactivos se absorbe a una fase sólida y el otro se marca con una enzima.**
- **La enzima reacciona con un sustrato formando un producto coloreado**



# Ventajas del ELISA

- Muy sensible
- Gran número de muestras procesadas simultáneamente.
- Resultados rápidos
- Utilización de reactivos menos tóxicos
- Menor costo
- Cuantificación de sustancias diversas:
  - hormonas
  - metabolitos
  - toxinas
  - fármacos
  - mediadores de inflamación
  - proteínas
  - citoquinas
  - agentes infecciosos, etc.



# Fundamento del ELISA

Ag o Ac  
fijado a  
una fase  
sólida

+

Ag o Ac  
en la  
muestra

+

Conjugado:  
Ac unido a  
ENZIMA

+

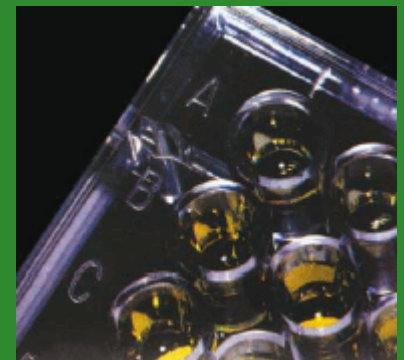
SUSTRATO



**CAMBIO  
DE  
COLOR**

# Componentes del ELISA

- FASE SÓLIDA
- Antígeno o Anticuerpo
- Conjugado: ENZIMA
- SUSTRATO



# SOPORTE SÓLIDO

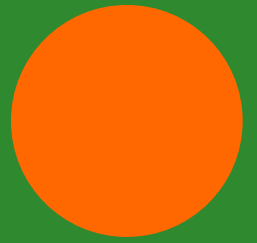
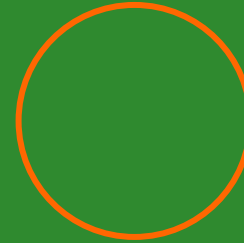
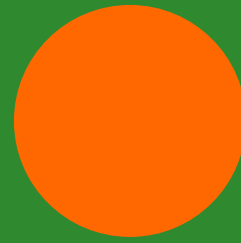
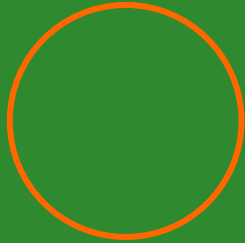


Material del Soporte	Formas disponibles	Unión
Nitrocelulosa	Membranas, Láminas	No covalente
Polivinilo	Placas, Láminas	Covalente
Poliestireno	Placas, Láminas, Perlas	Covalente
Látex, nylon, celulosa y sefarosa	Membranas, Láminas, Perlas	Covalente



# ANTÍGENO

- **Completo**
- **Extracto total**
- **Fracción Purificada**
- **Péptido sintético**
- **Proteína recombinante**



## ● Anticuerpos Policlonales

Heterogéneos

Reconocen epítopes diferentes del Ag

Producidos por numerosos clones de Linfocitos B

## ● Anticuerpos Monoclonales

Homogéneos

Especificidad única

Producidos por un único clon de Linfocitos B

# BLOQUEO

Buffer de bloqueo	Composición	Desventajas
Caseína	5% p/v leche sin grasa	Deteriora rápidamente. Enmascara algunos antígenos
Caseína/Tween20	5% p/v leche sin grasa, 0,2 %de Tween20	Deteriora rápidamente. Enmascara algunos antígenos
Tween 20	0,2 %de Tween	Podría generar algunos residuos
Gelatina	Gelatina 0.2% (2mg/ml)	
BSA	3% de BSA,	Relativamente costoso

# MUESTRA

- Suero

- Orina



- Saliva

- LCR

- Heces

- Otros





# ENZIMAS

- Peroxidasa
- Fosfatasa alcalina
- $\beta$ -galactosidasa
- Penicilinasa
- Ureasa
- Glucosa oxidasa





# SUSTRATOS

## Requerimientos del sustrato

- Solubles en agua
- Fácil de manipular
- No tóxicos, no mutagénicos
- Bajo costo

# Formación de colores por la acción enzimática sobre diferentes cromógenos

Fosfatasa Alcalina	$\rho$ -Nitrofenil Fosfato ( $\rho$ NPP)	Amarillo
	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato / nitro azul de tetrazolium (BCIP / NBT)	Púrpura
	Naftol AS-TR posfato / fast red RC	Rojo
Peroxidasa	2,2'-azino-bis (3-etilbenziazoline-6-ácido sulfónico)	Verde
	o-fenilendiamino (OPD)	Naranja
	3,3',5,5'-tetrametilbencidina base o Dihidrocloreuro (TMB)	Azul
	3,3'-Diaminobencidina (DAB)	Marrón
	3-amino-9-Etilcarbazole (AEC)	Rojo
	4-cloro-1-Naftol (4C1N)	Azul



# Lavados

**Utilizados para separar los componentes unidos de los libres**

**Generalmente:**

- **De 3 a 6 lavados por cada etapa**
- **Duración de 30 seg a 1 min c/u**
- **Se utiliza Buffer fosfato 0.01 a pH 7,2**

# Revelación de la actividad enzimática

- **Incorporación de ácidos o bases fuertes para detener la reacción**
- **La cantidad de producto enzimático formado se determina leyendo la densidad óptica (DO) con un espectrofotómetro**



# FASES DEL ELISA

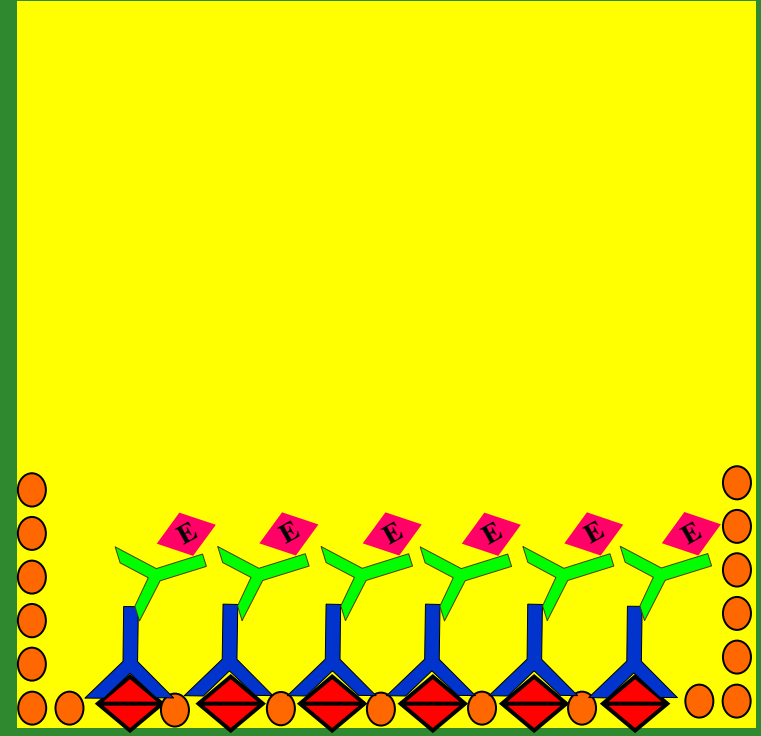
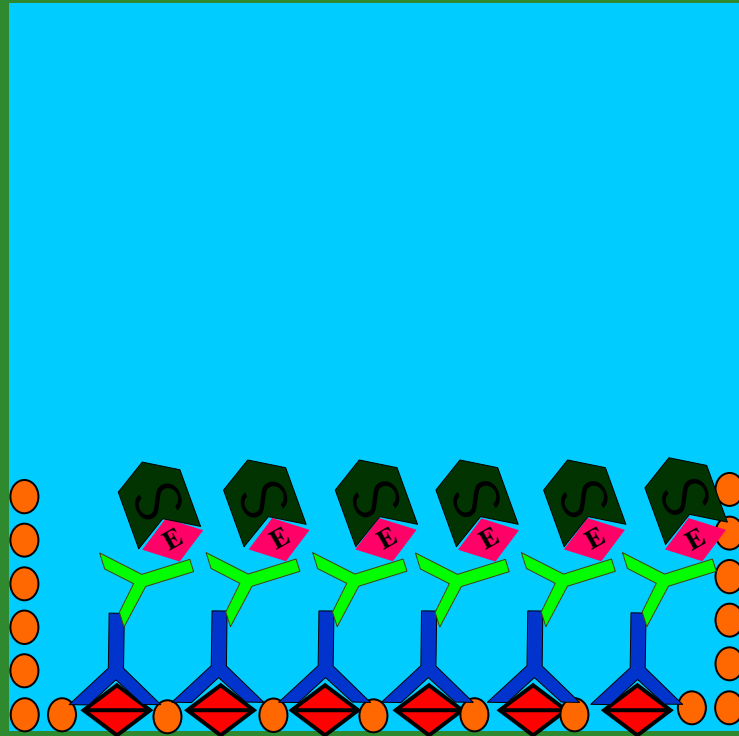
1. Titulación de la cantidad de Ag o Ac a utilizar para sensibilizar la placa.
2. Sensibilización
3. Lavado
4. Bloqueo
5. Lavado
6. Incubación de las placas con las muestras y controles positivos y negativos
7. Lavado
8. Incubación del conjugado
9. Lavado
10. Incubación del sustrato
11. Detenimiento de la reacción enzimática
12. Lectura de las placas



# TIPOS DE ELISA

- **DIRECTO**
- **INDIRECTO**
- **COMPETITIVO**
- **TIPO SANDWICH**
- **MÉTODO AVIDINA-BIOTINA**

# ELISA INDIRECTO



Antígeno

Buffer de bloqueo

Anticuerpo

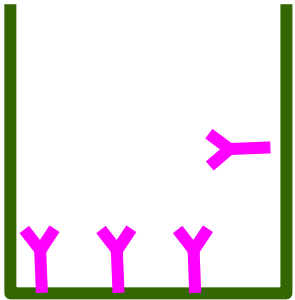


Conjugado Anticuerpo-Enzima



Sustrato

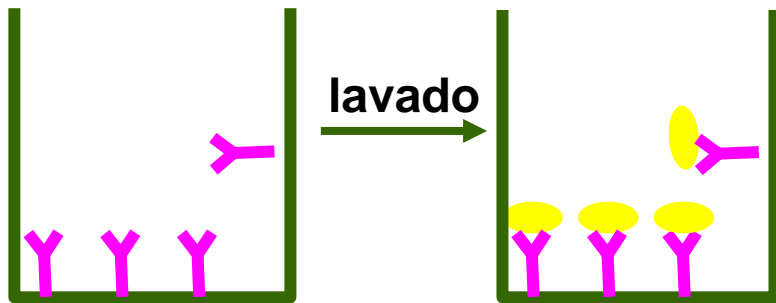
# ELISA SANDWICH



**Anticuerpo  
fijado al  
pozo**



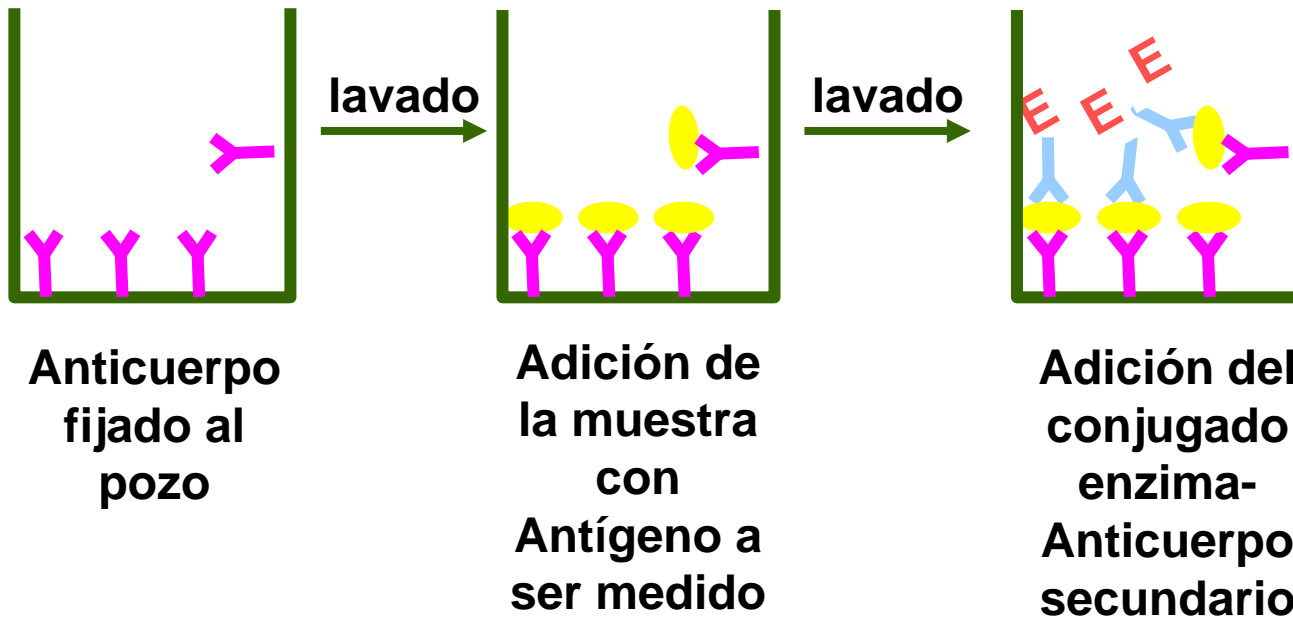
# ELISA SANDWICH



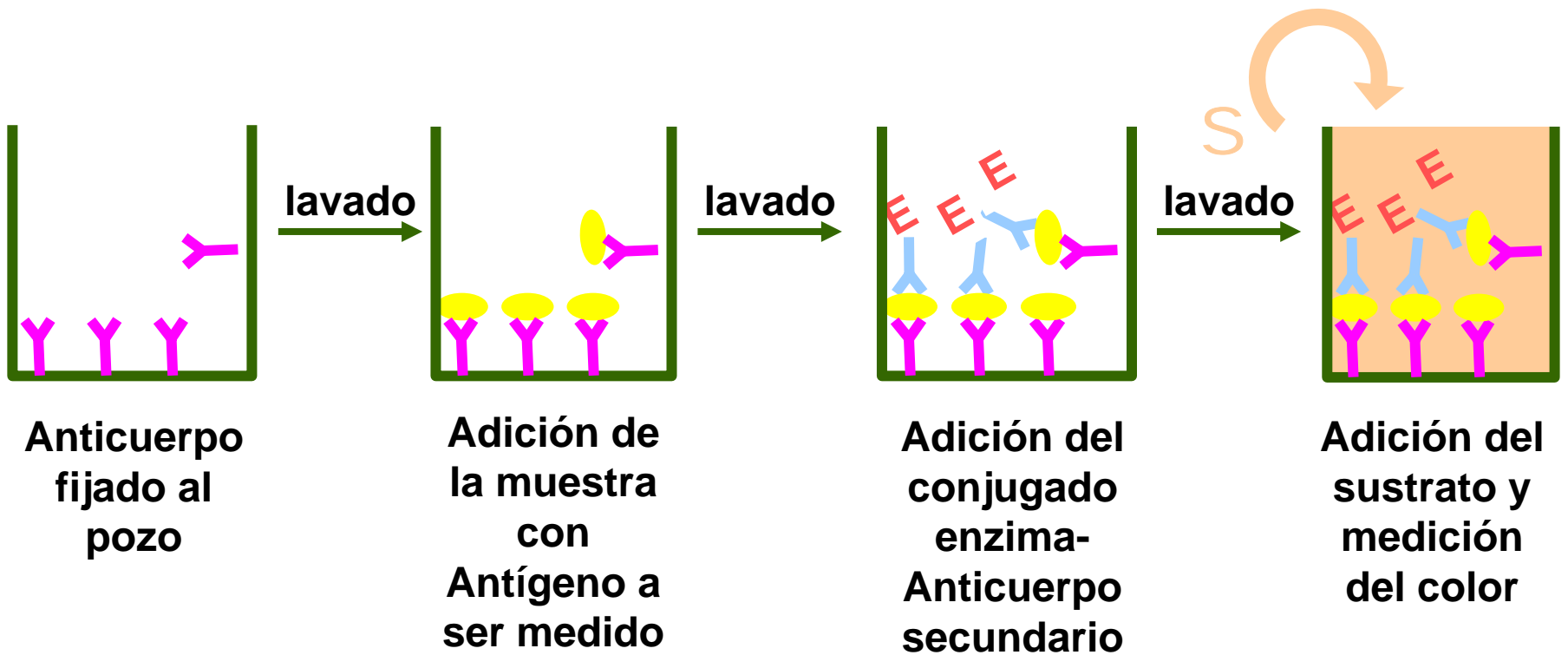
**Anticuerpo  
fijado al  
pozo**

**Adición de  
la muestra  
con  
Antígeno a  
ser medido**

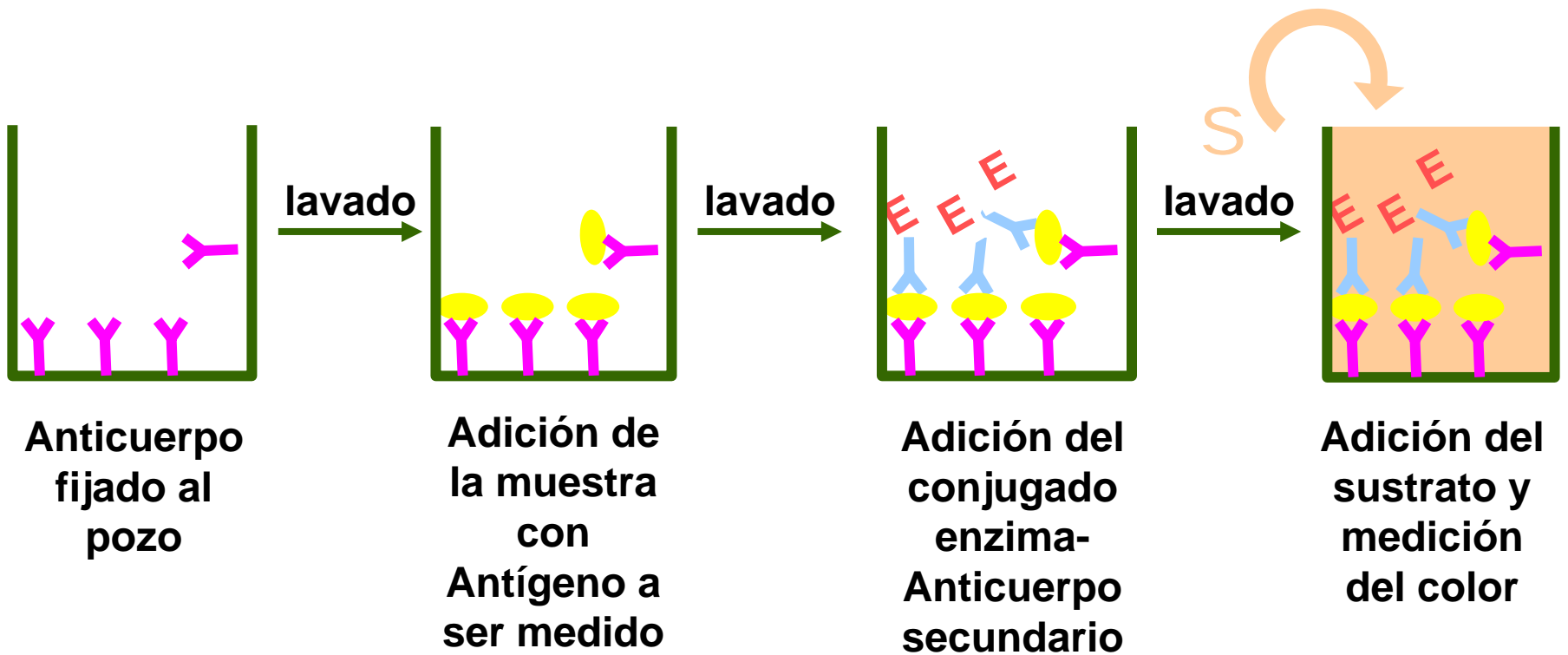
# ELISA SANDWICH



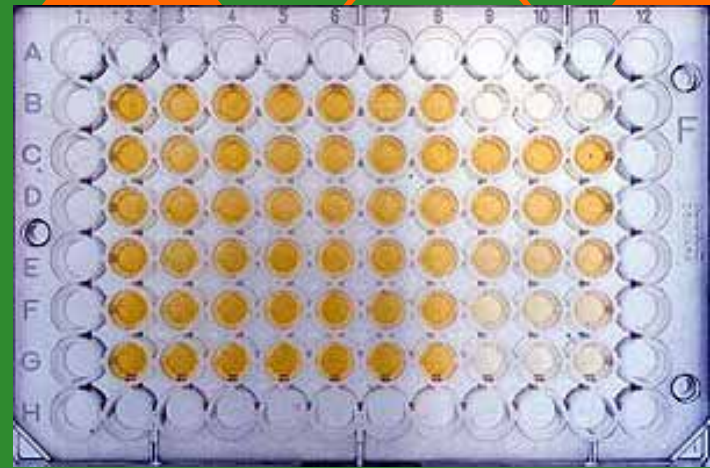
# ELISA SANDWICH



# ELISA SANDWICH



# INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS



# INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

**Incluir controles:**

- **Control del PBS (blanco)**
- **Control Negativo**
- **Control Positivo Bajo**
- **Control Positivo Alto**

Paciente

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10



1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

A

B

C

D

E

F

G

H

**B L A N C O S**

**Control  
negativo**

**Control  
positivo**

1/64

1/256

1/1024

1/4096

1/64

1/256

1/1024

1/4096

A

B

C

D

E

F

G

H

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

Paciente

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20



# REPORTE DE RESULTADOS

## REPORTE CUALITATIVO

- Positivo
- Negativo

## REPORTE CUANTITATIVO

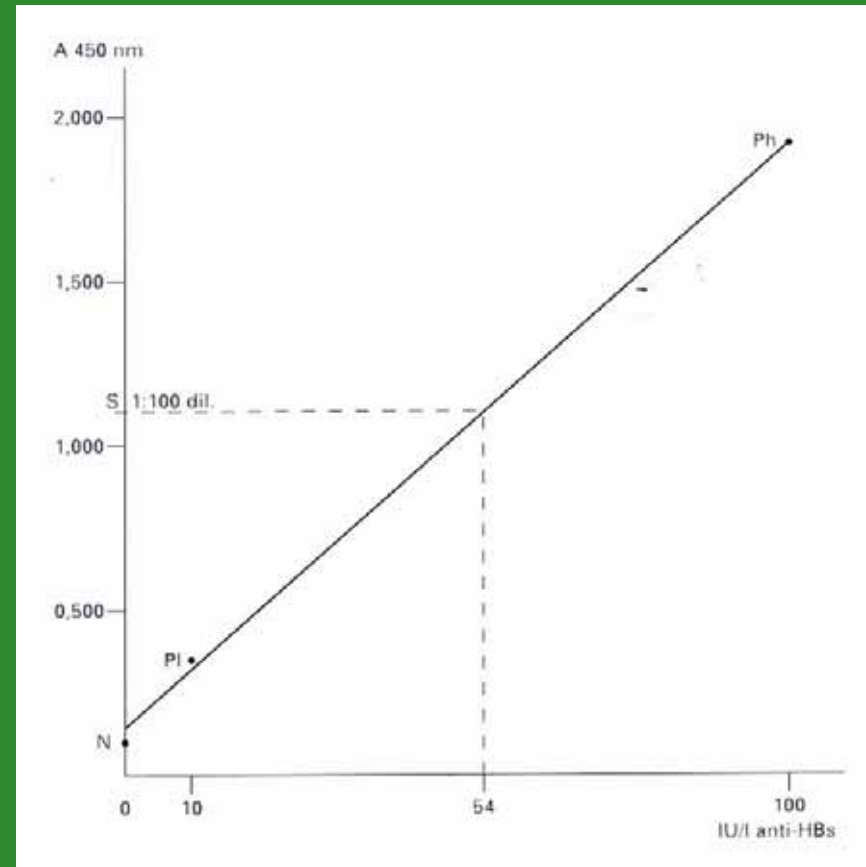
- ng o  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Unidades internacionales de ELISA (EIU)



# REPORTE DE RESULTADOS

## Pruebas cuantitativas:

- Empleo de controles negativos, positivos bajos y positivos altos para construir curva de calibración.



# REPORTE DE RESULTADOS

## Semicuantitativa

Valor  
mínimo =  
positivo

Promedio  
de los  
Controles  
Negativos

x

2 ó 3  
Desviaciones  
estándar

# PRUEBAS QUE SE REALIZAN CON LA TÉCNICA DE ELISA EN EL IDIC

- **ANTICUERPOS CONTRA AGENTES INFECCIOSOS**

Toxoplasma

Cisticerco

Amibas

CMV

Hepatitis A-B-C

Helicobacter pylori

Epstein Barr

Rubeola

HIV

- **ANTÍGENOS TUMORALES**

ACE

CA125

APS

AFP

- **AUTOANTICUERPOS**

ANA

FR

Anticuerpos antitiroideos

Anticardiolipinas

- **PROTEÍNAS PLASMÁTICAS**

PCR

GRACIAS

