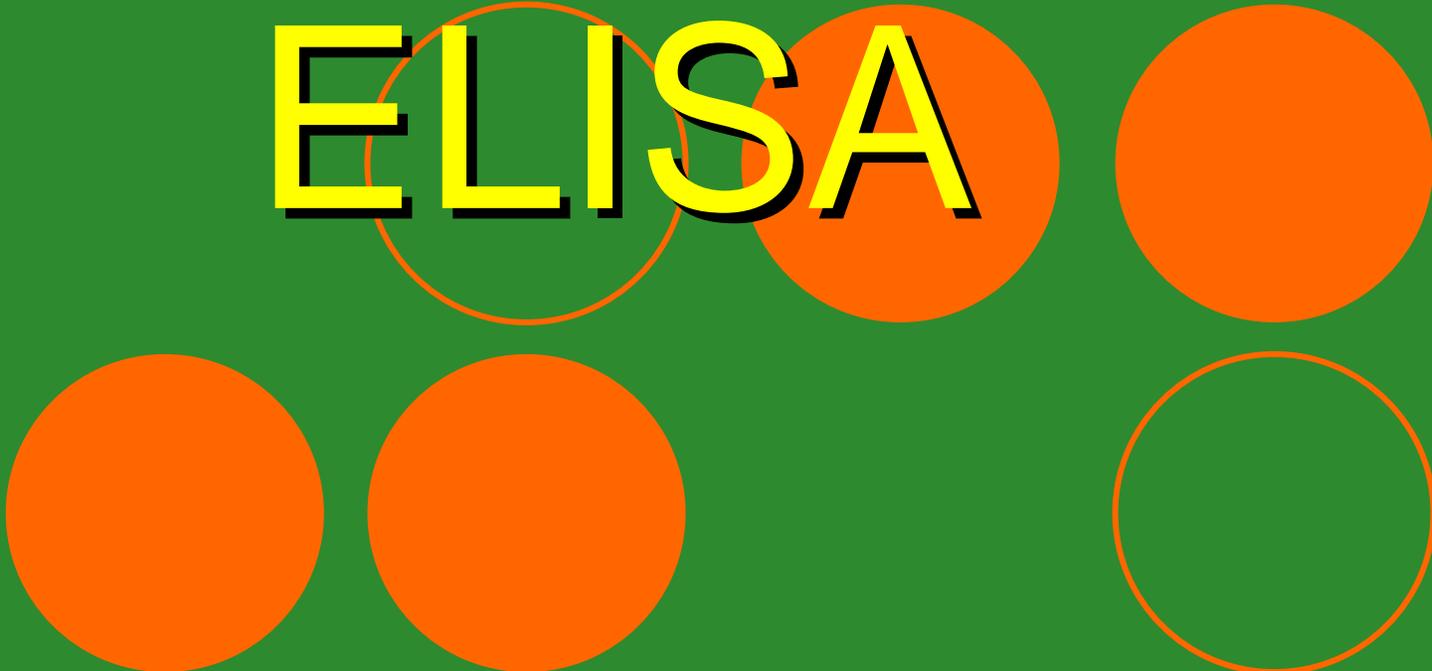


ELISA

The word "ELISA" is written in a bold, yellow, sans-serif font with a black outline. The letters are positioned over a series of orange circles. The 'E' is on a thin orange circle, 'L' is on a thin orange circle, 'I' is on a thin orange circle, 'S' is on a thin orange circle, and 'A' is on a solid orange circle. To the right of the 'A' is another solid orange circle. Below the top row of circles are two more solid orange circles on the left and a thin orange circle on the right.

Dra Morella Bouchard
Instituto de Inmunología Clínica
Universidad de Los Andes

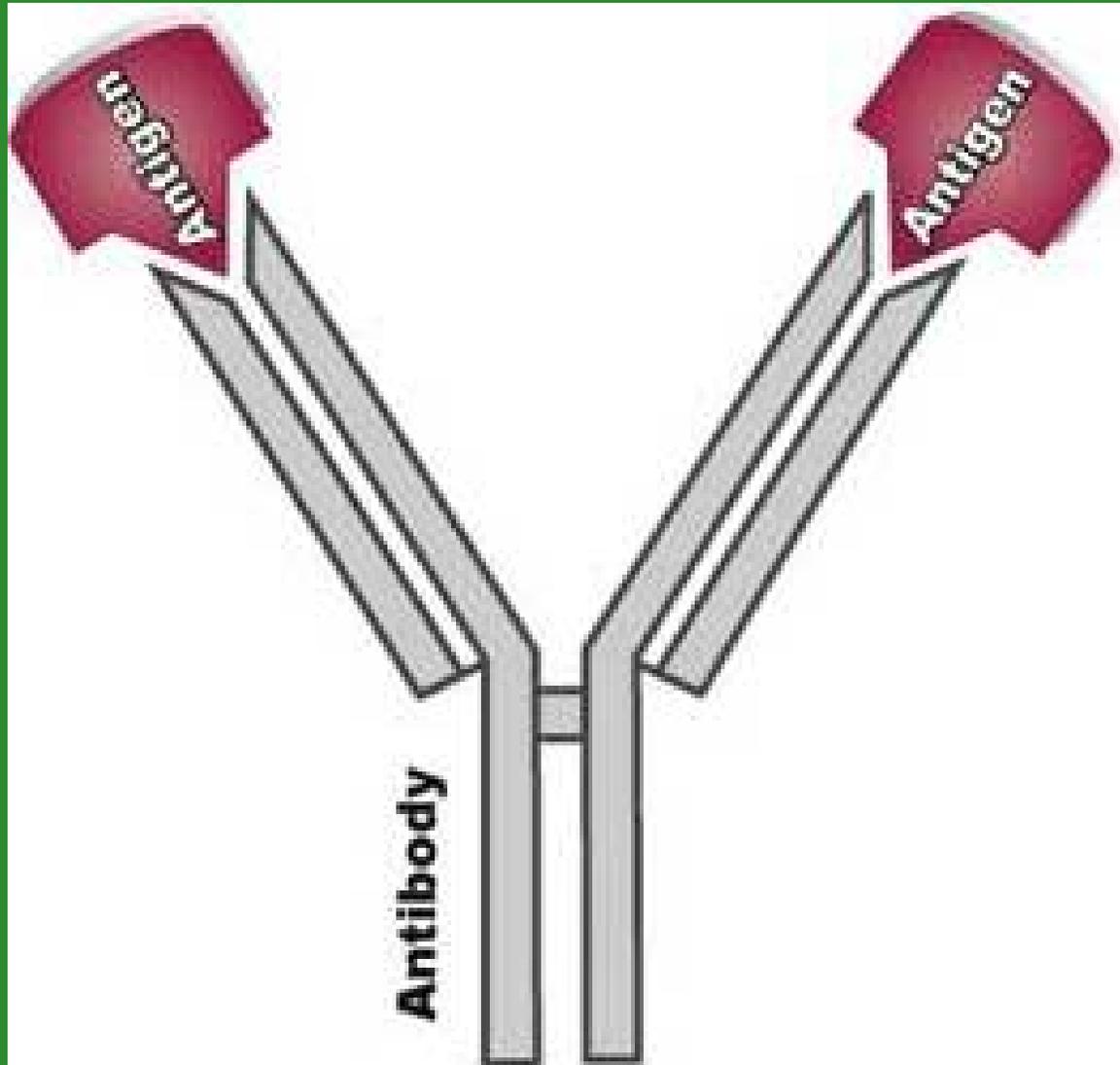
ELISA



Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

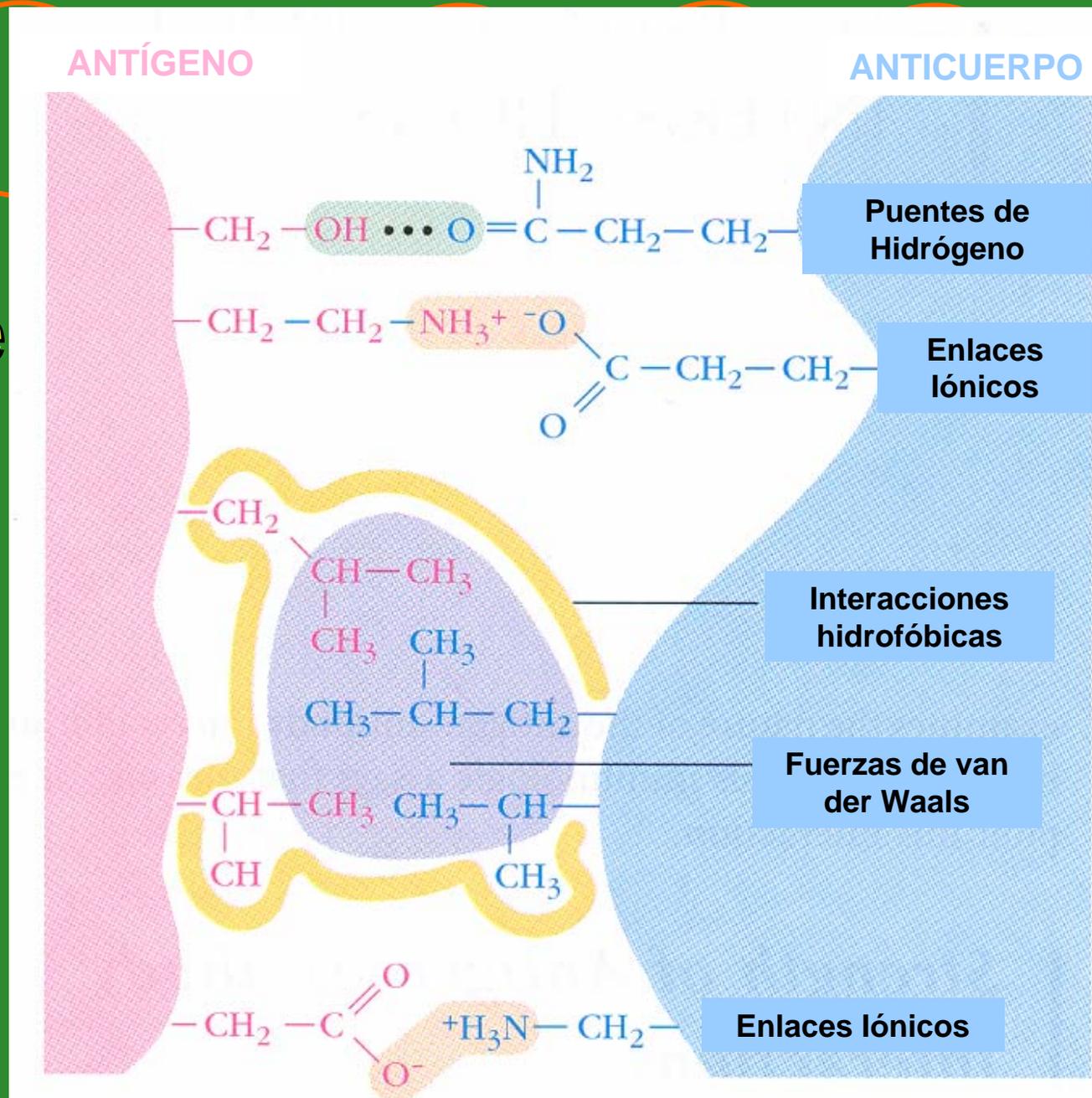
**Dra Morella Bouchard
Instituto de Inmunología Clínica
Universidad de Los Andes**

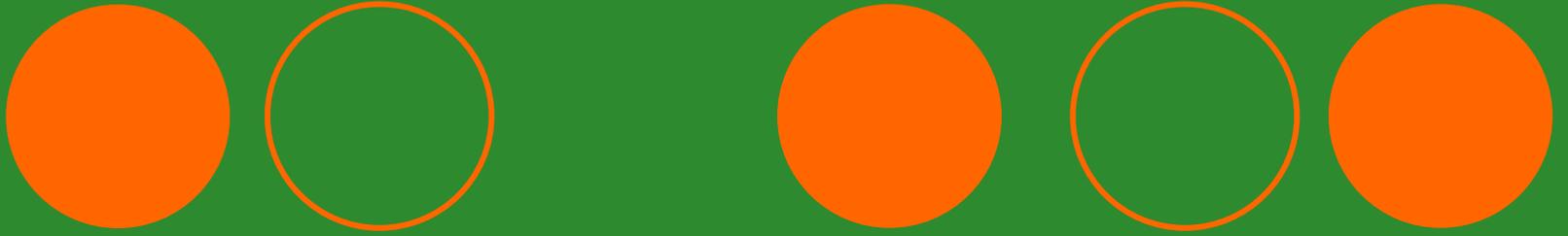
Interacción Antígeno Anticuerpo



ENLACES NO COVALENTES

Fuerzas que participan en la Interacción Antígeno Anticuerpo

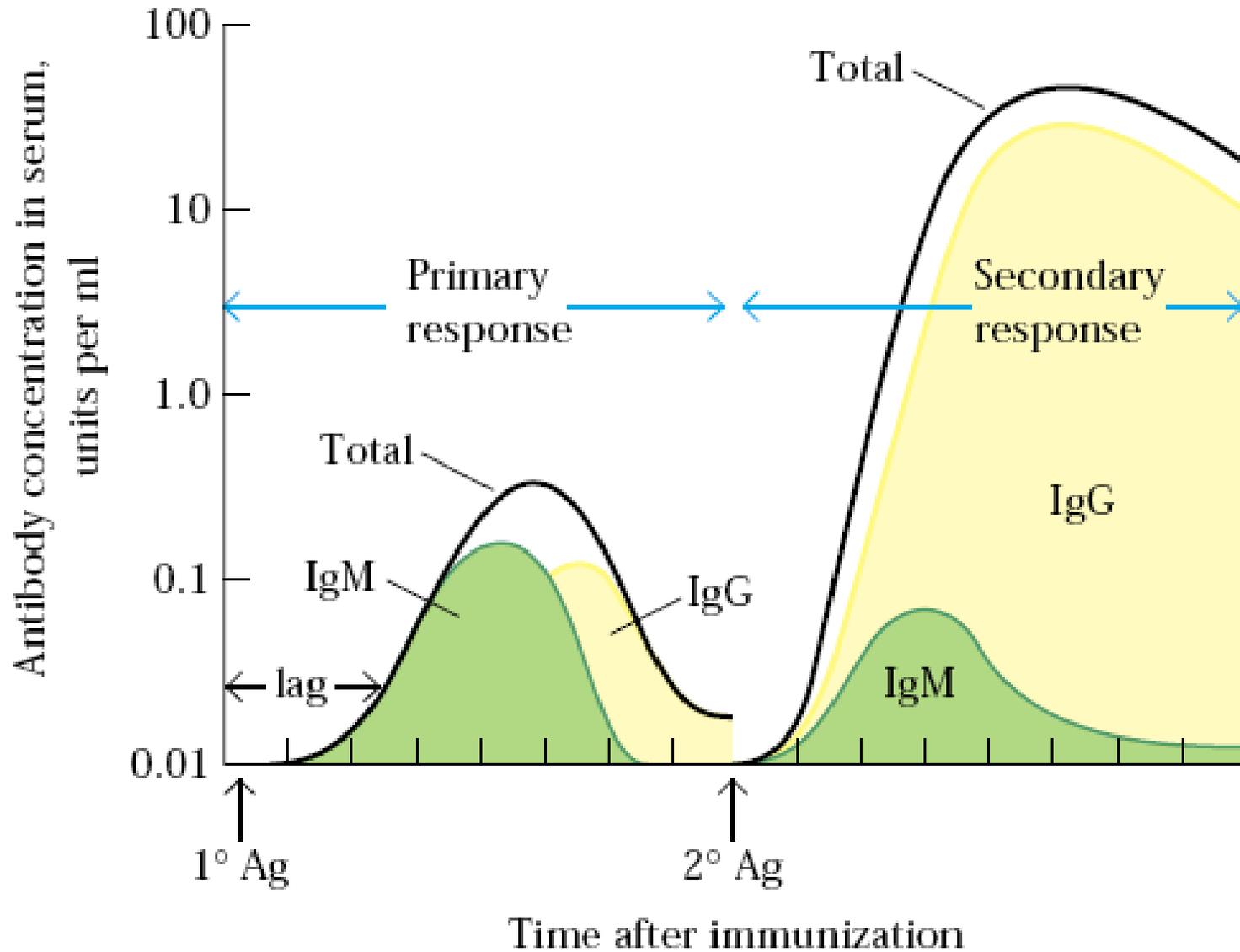




Características del Ac relacionadas con con el reconocimiento del Ag

- 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

+

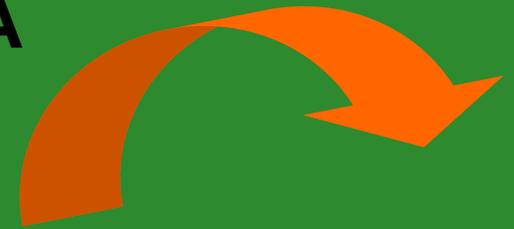
Ag o Ac
en la
muestra

+

Conjugado:
Ac unido a
ENZIMA

+

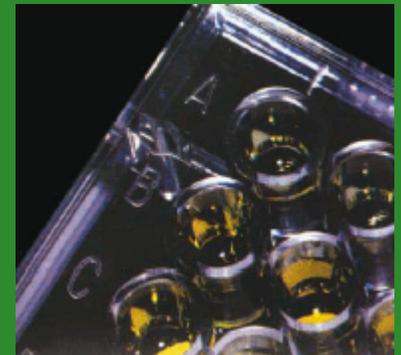
SUSTRATO



**CAMBIO
DE
COLOR**

Componentes del ELISA

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



SOPORTE SÓLIDO

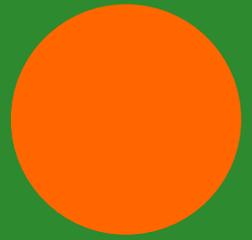
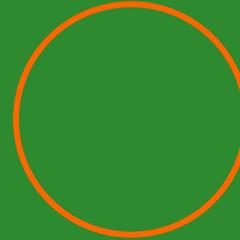
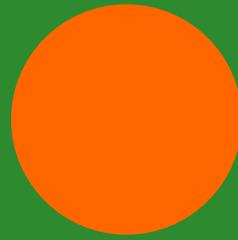
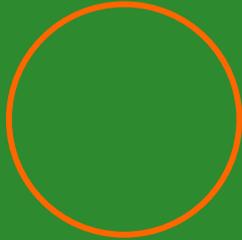
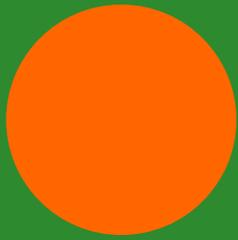


Material del Soporte	Formas disponibles	Unión
Nitrocelulosa	Membranas, Láminas	No covalente
Polivinilo	Placas, Láminas	Covalente
Poliestireno	Placas, Láminas, Perlas	Covalente
Látex, nylon, celulosa y sefarosa	Membranas, Láminas, Perlas	Covalente



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

Disponibles en cantidades ilimitadas

MUESTRA

● Suero

● Orina



● Saliva

● LCR

● Heces

● Otros





ENZIMAS

- Peroxidasa
- Fosfatasa alcalina
- β -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	ρ -Nitrofenil Fosfato (ρ 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 Dihidrocloruro (TMB)	Azul
	3,3'-Diaminobencidina (DAB)	Marrón
	3-amino-9-Etilcarbazole (AEC)	Rojo
	4-cloro-1-Naftol (4C1N)	Azul

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

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



Lavados

Utilizados para separar los componentes unidos de los libres

Generalmente:

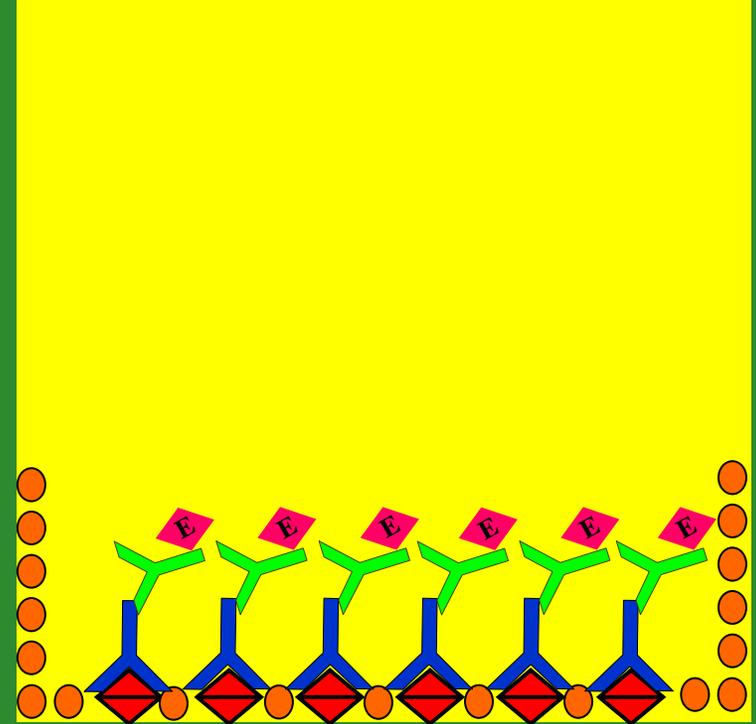
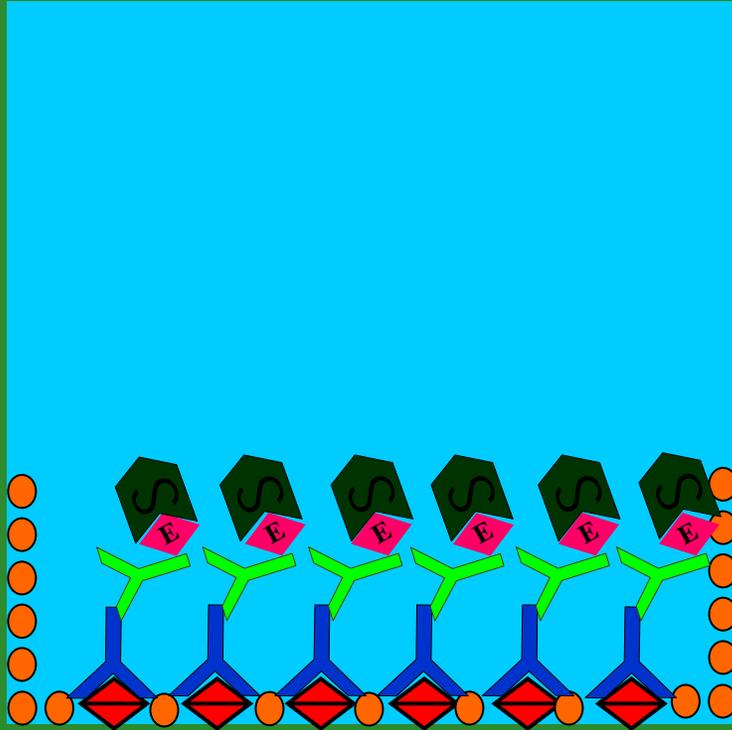
- **De 3 a 6 lavados por cada etapa**
- **Duración de 30 seg a 1 min c/u**
- **Se utiliza Buffer fosfato 0.01 a pH 7,2**



TIPOS DE ELISA

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

ELISA INDIRECTO



◆ Antígeno

● Buffer de bloqueo

Y Muestra (Anticuerpo)

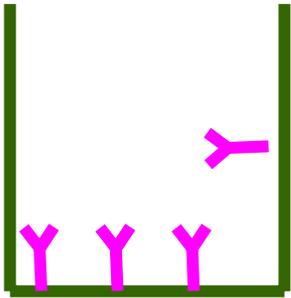


Conjugado Anticuerpo-Enzima



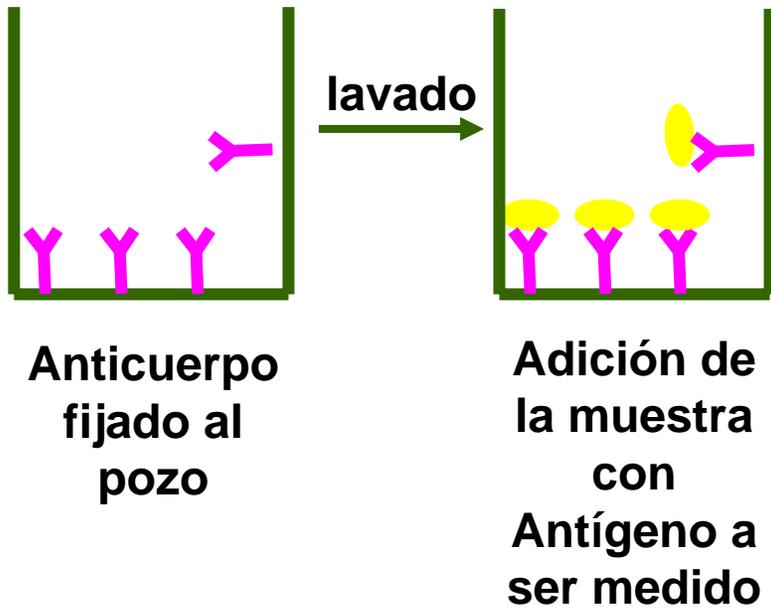
Sustrato

ELISA SANDWICH

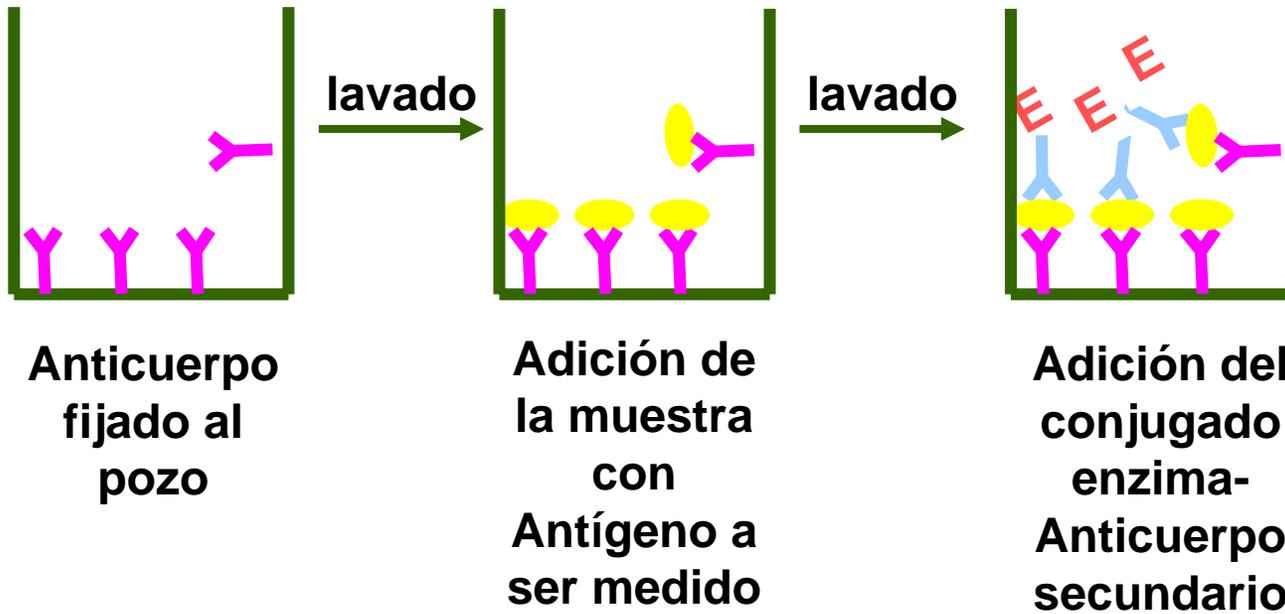


**Anticuerpo
fijado al
pozo**

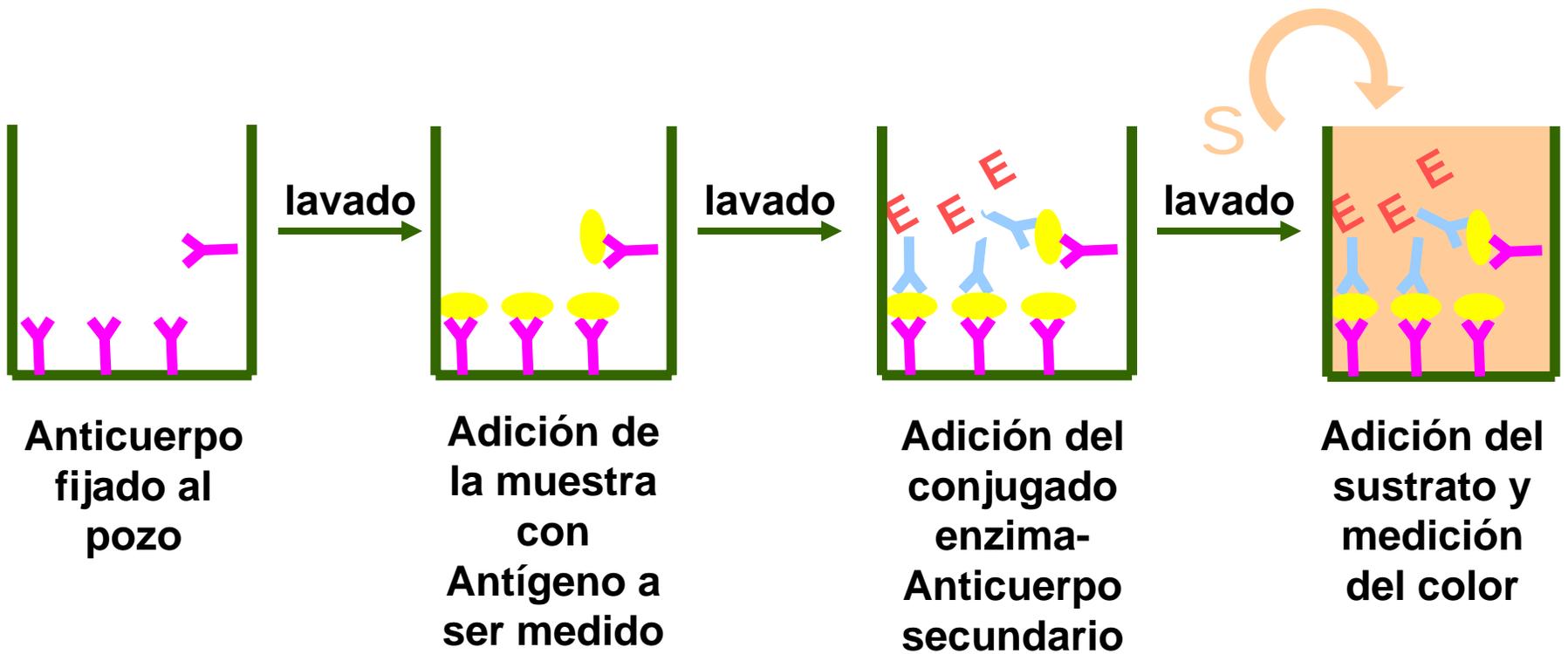
ELISA SANDWICH



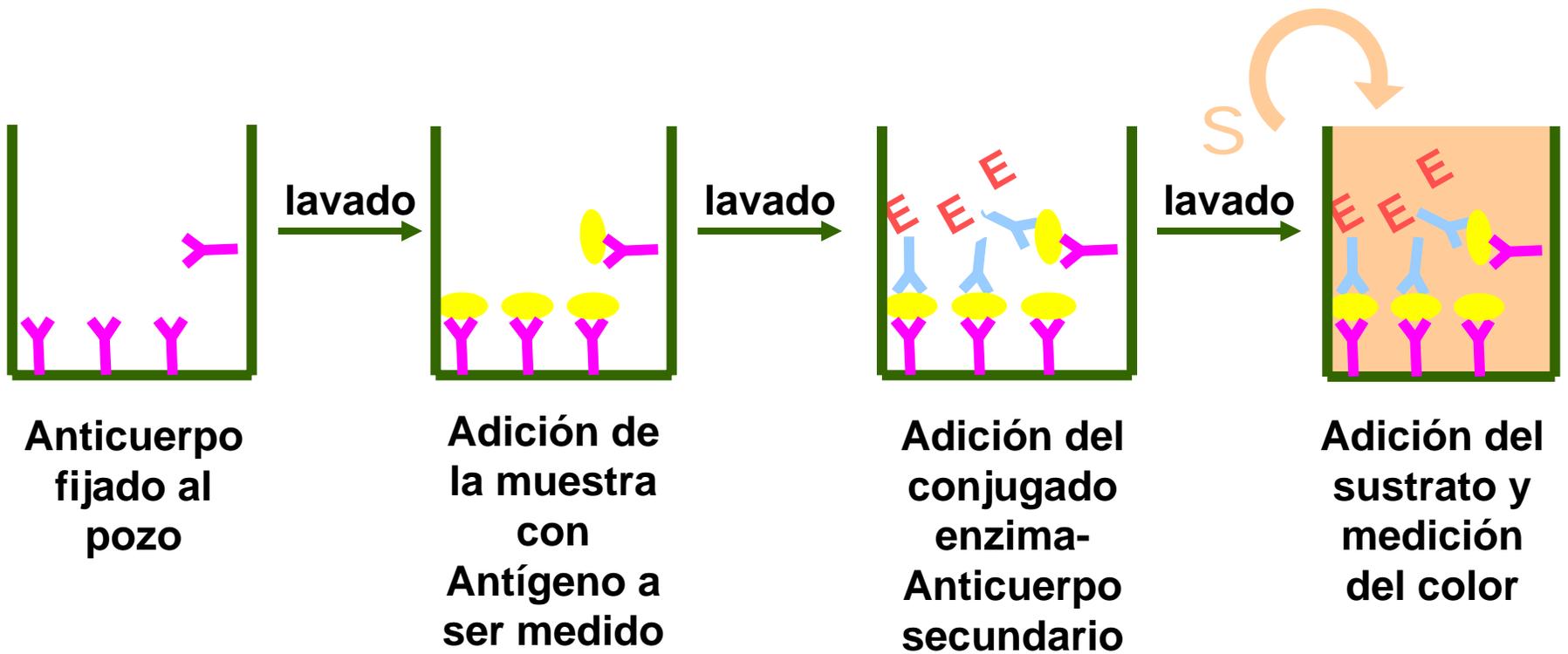
ELISA SANDWICH



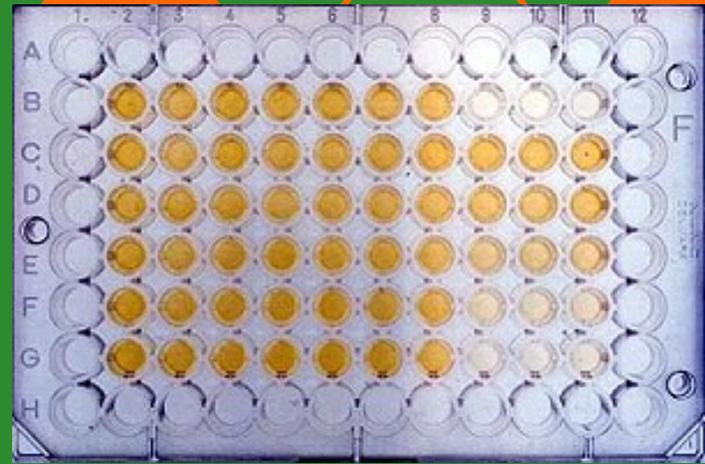
ELISA SANDWICH



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

1/64

A

B

1/256

B

C

1/1024

C

D

1/4096

D

E

1/64

E

F

1/256

F

G

1/1024

G

H

1/4096

H

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



Paciente

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

B L A N C O S

**Control
negativo**

**Control
positivo**

REPORTE DE RESULTADOS

REPORTE CUALITATIVO

- Positivo
- Negativo

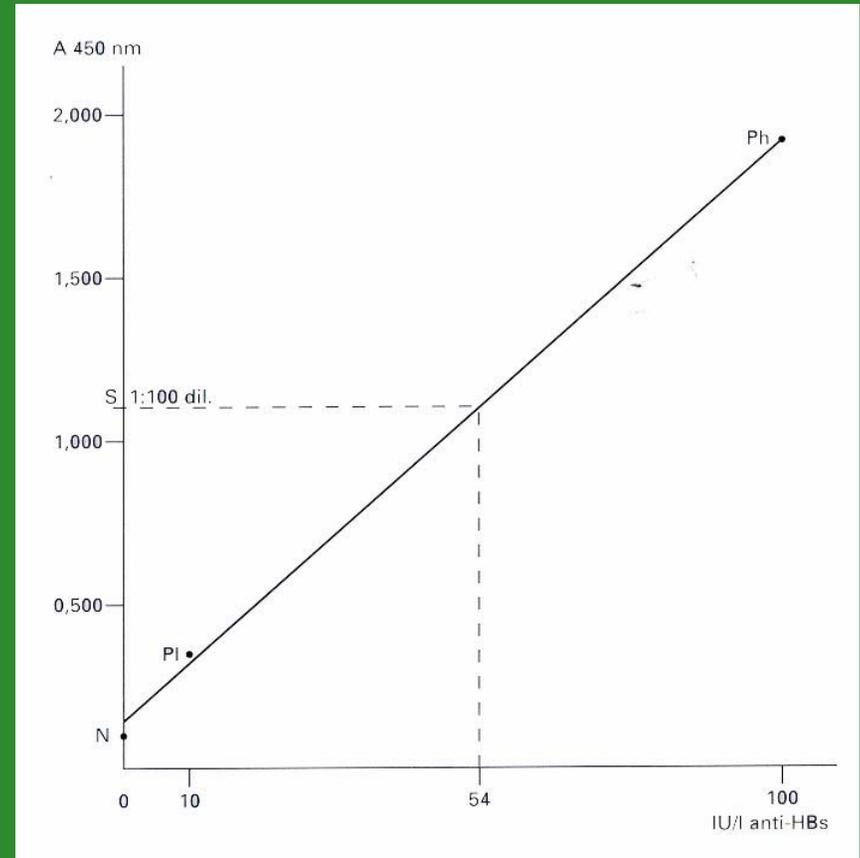
REPORTE CUANTITATIVO

- 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

$$\text{Cut off} \left\{ \begin{array}{l} \text{Valor} \\ \text{mínimo} \\ \text{positivo} \end{array} \right. = \begin{array}{l} \text{Promedio} \\ \text{de los} \\ \text{Controles} \\ \text{Negativos} \end{array} \times \begin{array}{l} 2 \text{ ó } 3 \\ \text{Desviaciones} \\ \text{estándar} \end{array}$$

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

- **ANTICUERPOS CONTRA AGENTES INFECCIOSOS**

Toxoplasma	Cisticerco	Amibas
CMV	Hepatitis A-B-C	Helycobacter pylori
Epstein Barr	Rubeola	HIV

- **ANTÍGENOS TUMORALES**

ACE	CA125	NSE
APS	AFP	CA19-9

- **AUTOANTICUERPOS**

ANA	FR	ANCA
Anticuerpos antitiroideos	Anticardiolipinas	

- **PROTEÍNAS PLASMÁTICAS**

PCR

GRACIAS

