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 five more orange circles: two solid ones on the left and two hollow ones on the right, arranged in a horizontal line.

# ELISA

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

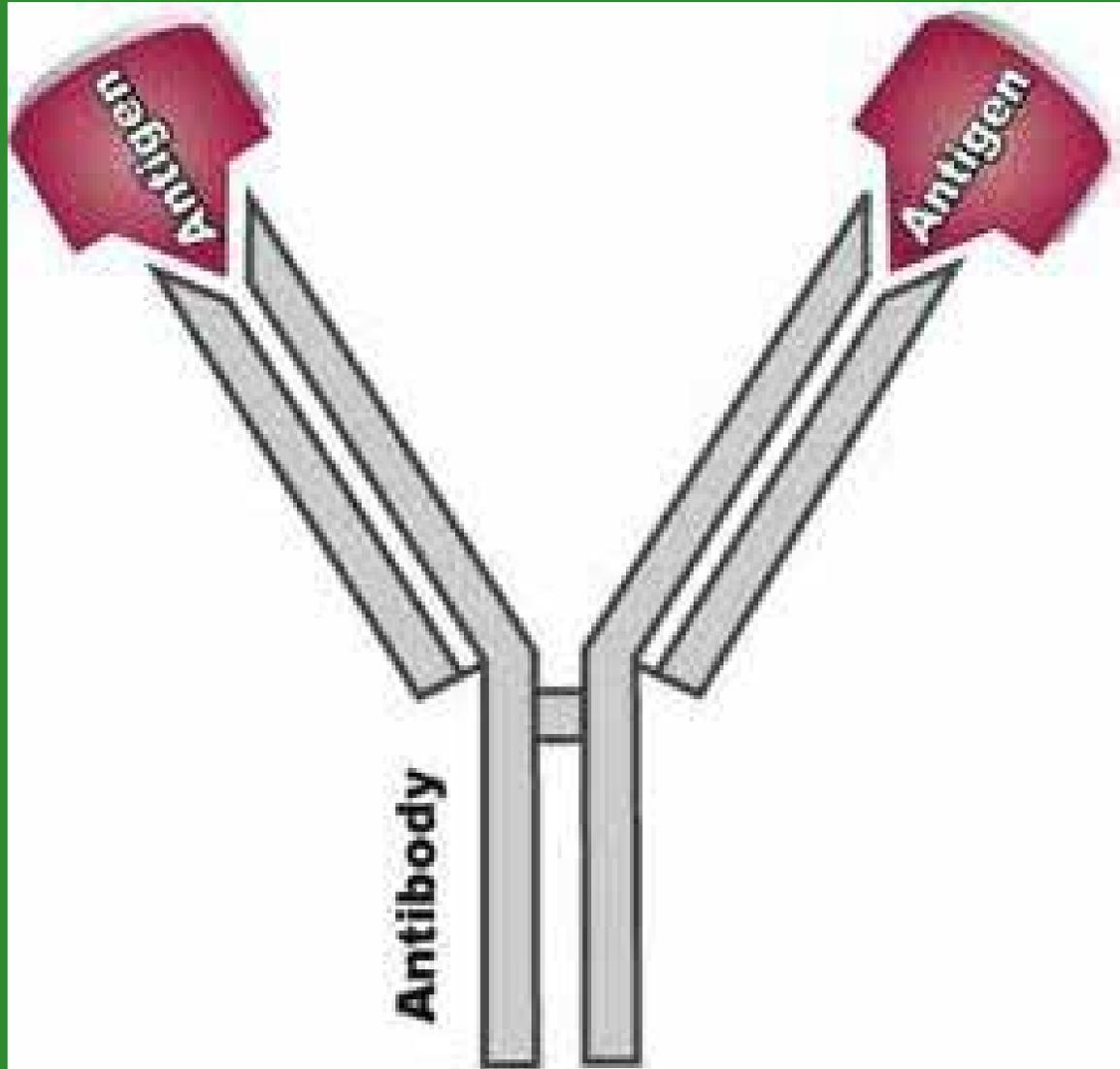
# ELISA



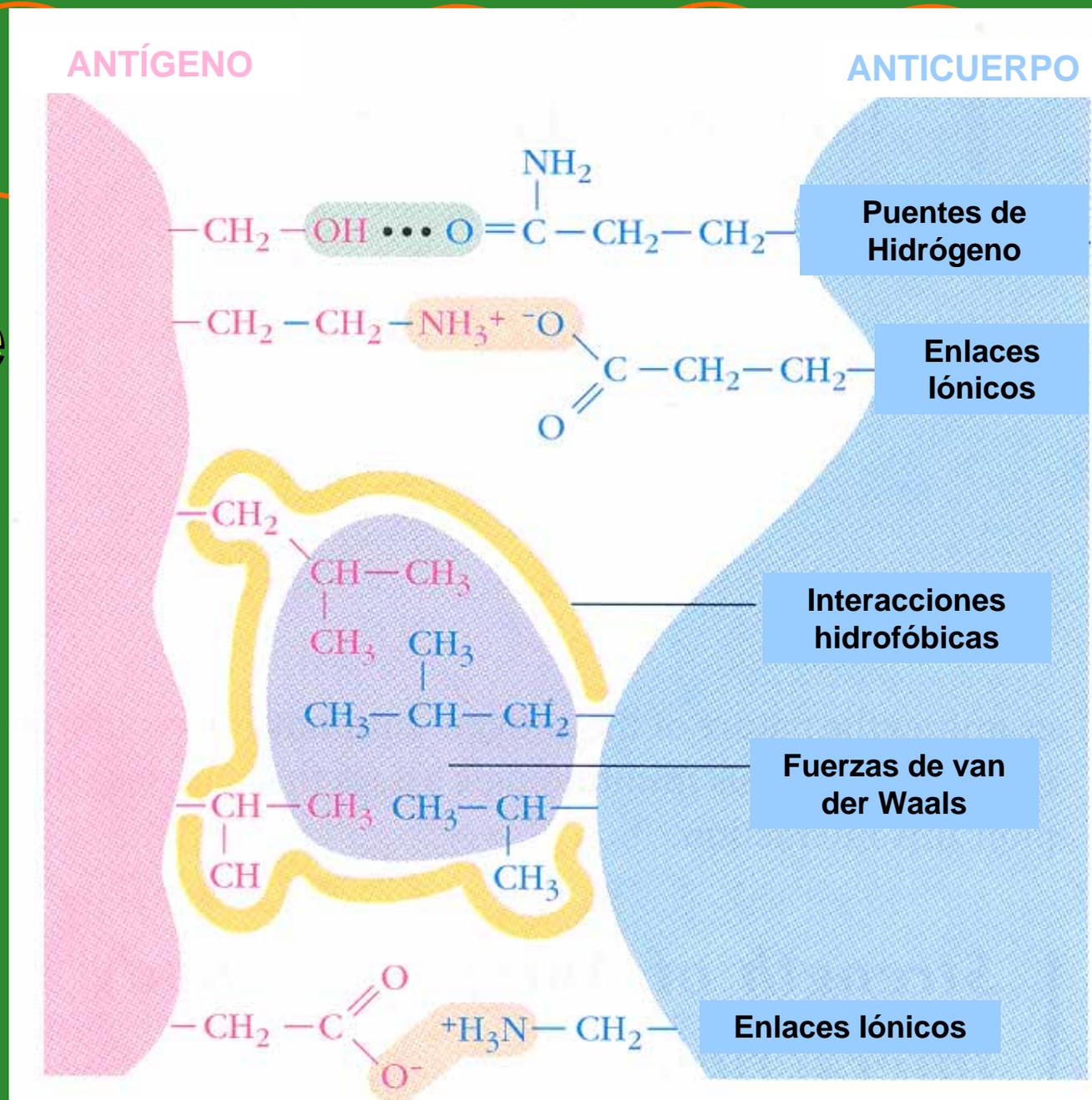
*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

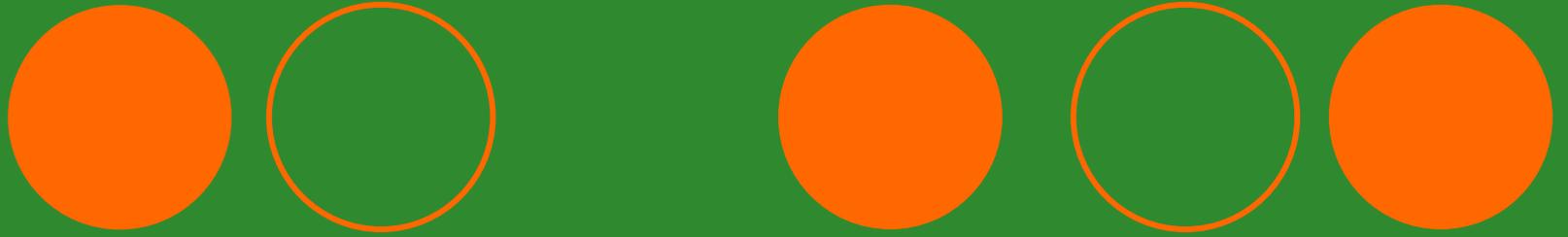
**Dra Morella Bouchard**  
**Instituto de Inmunología Clínica**  
**Universidad de Los Andes**

# Interacción Antígeno Anticuerpo



# Fuerzas que participan en la Interacción Antígeno Anticuerpo

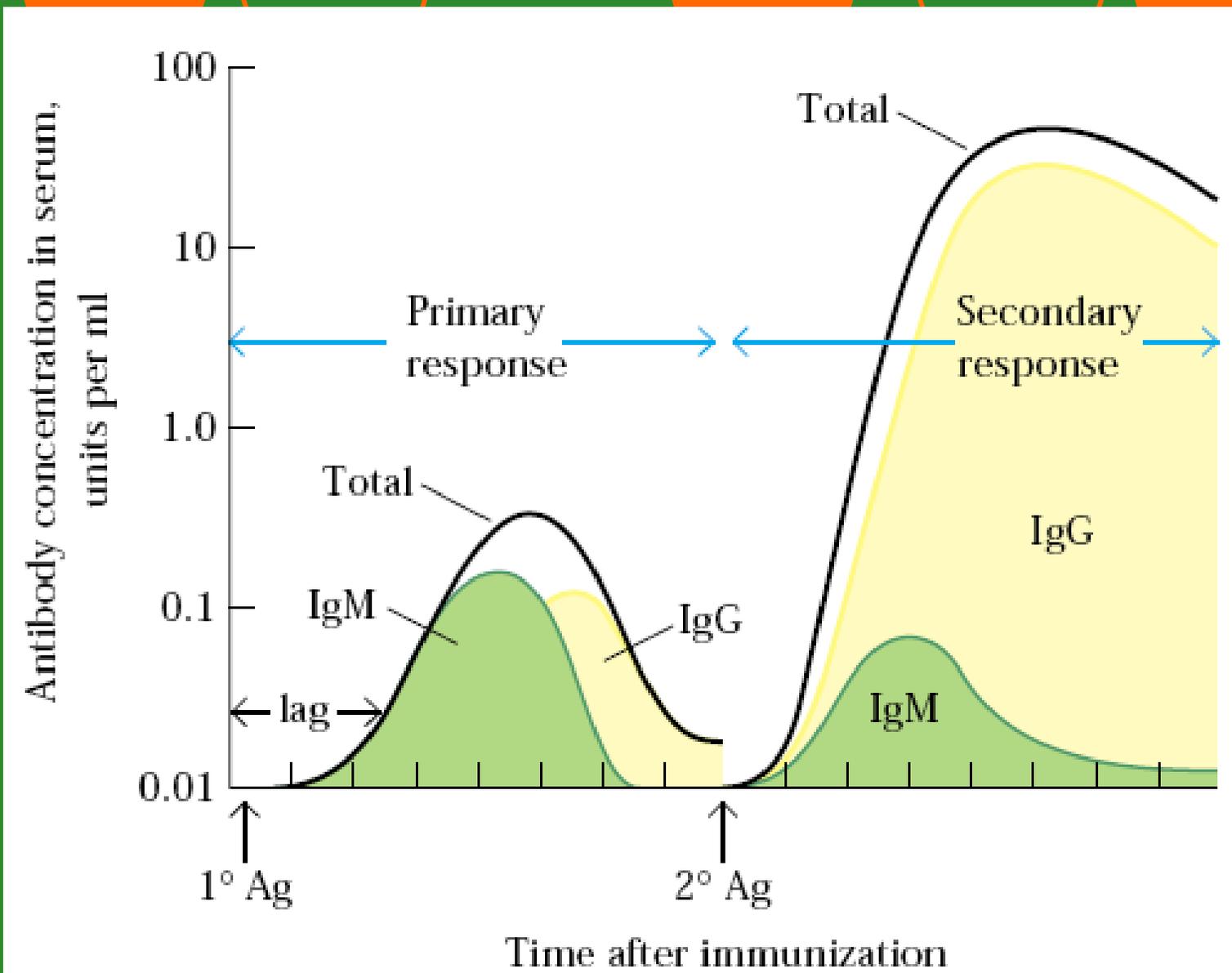




# Características del Ac relacionadas con el reconocimiento del Ag

- 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

+

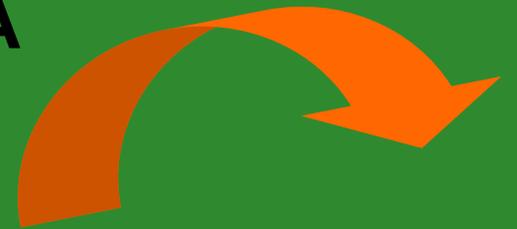
Ag o Ac  
en la  
muestra

+

Conjugado:  
Ac unido a  
ENZIMA

+

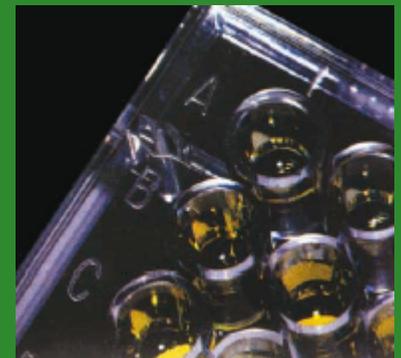
SUSTRATO



**CAMBIO  
DE  
COLOR**

# Componentes del ELISA

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



# SOPORTE SÓLIDO

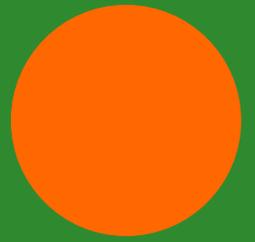
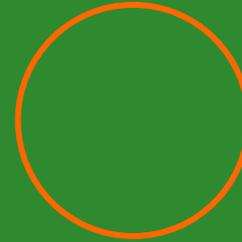
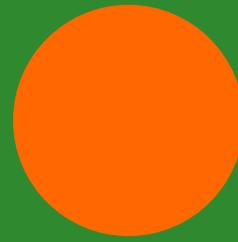
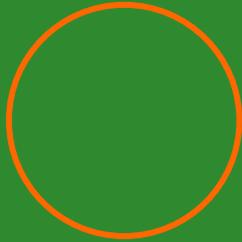
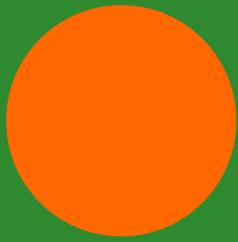


Material del Soporte	Formas disponibles	Unión
Nitrocelulosa	Membranas, Láminas	No covalente
Polivinilo	Placas, Láminas	Covalente
Poliestireno	Placas, Láminas, Perlas	Covalente
Látex, nylon, celulosa y sefarosa	Membranas, Láminas, Perlas	Covalente



# 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 Dihidrocloruro (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

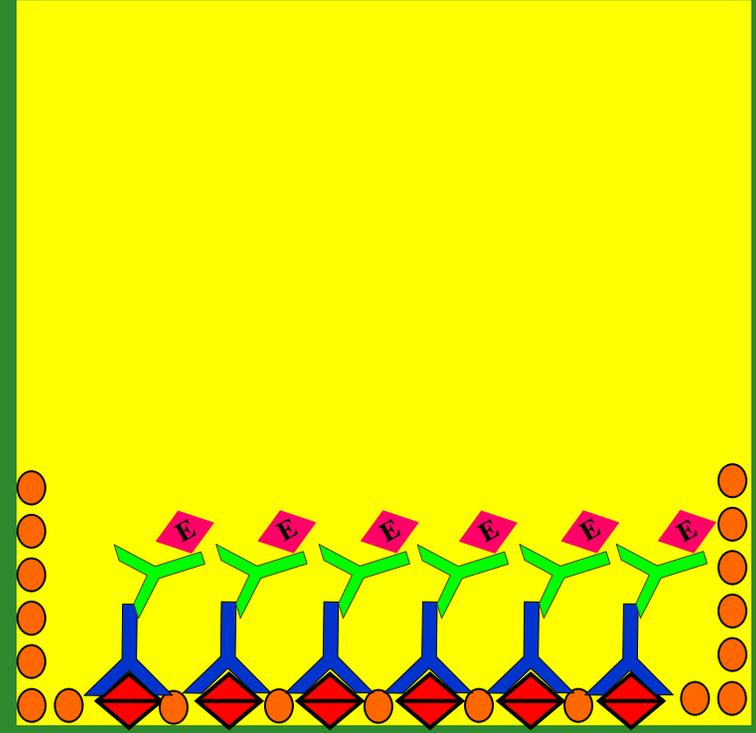
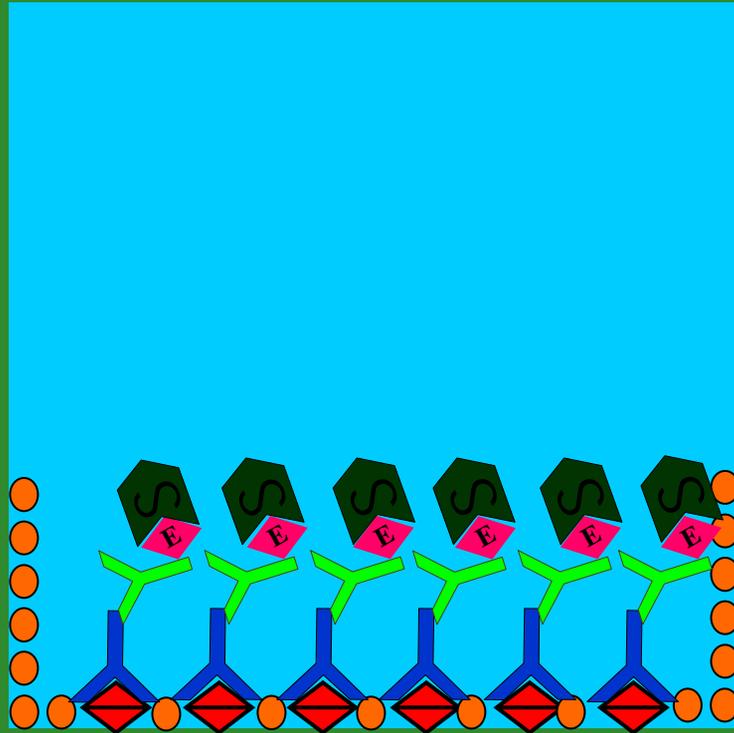
1. Titulación de la cantidad de Ag o Ac a utilizar para sensibilizar la placa.
2. Sensibilización
3. Lavado
4. Bloqueo
5. Lavado
6. Incubación de las placas con las muestras y controles positivos y negativos
7. Lavado
8. Incubación del conjugado
9. Lavado
10. Incubación del sustrato
11. Detenimiento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

Y Anticuerpo

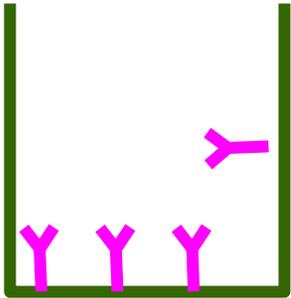


Conjugado Anticuerpo-Enzima



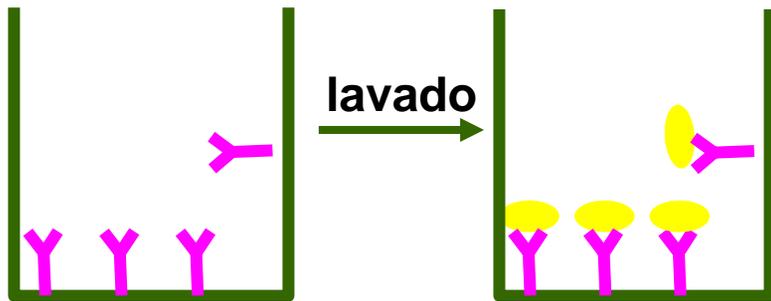
Sustrato

# ELISA SANDWICH



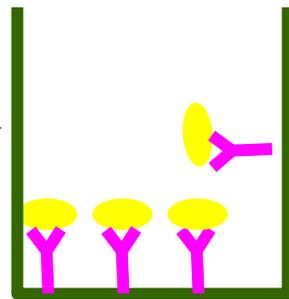
**Anticuerpo  
fijado al  
pozo**

# ELISA SANDWICH



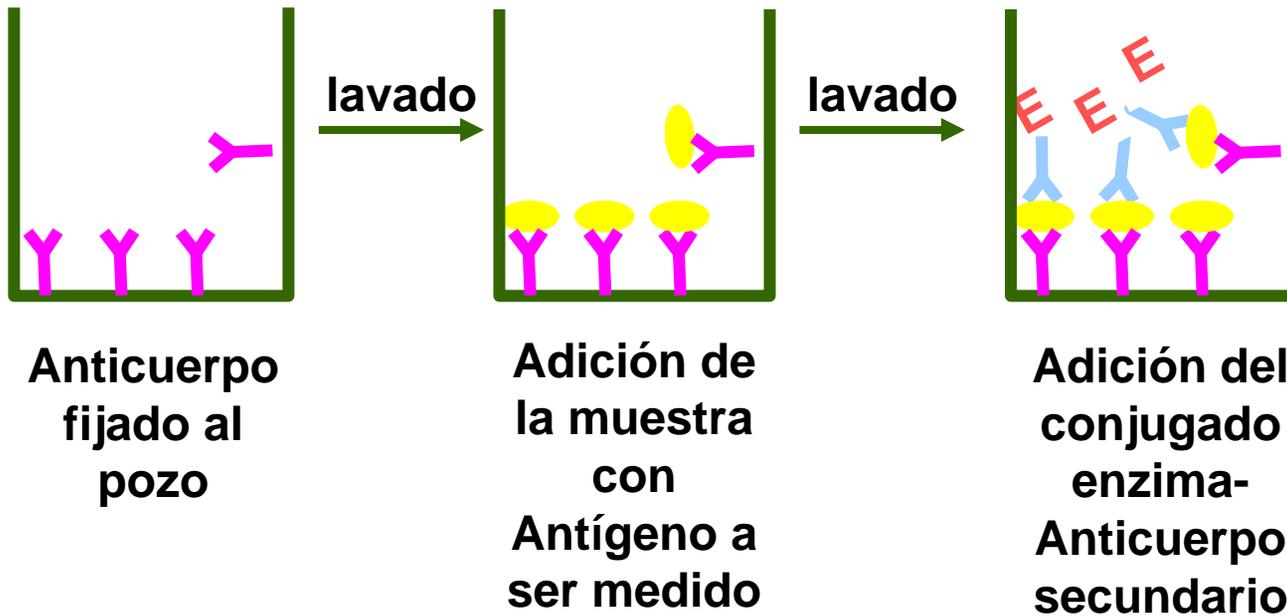
**Anticuerpo  
fijado al  
pozo**

lavado

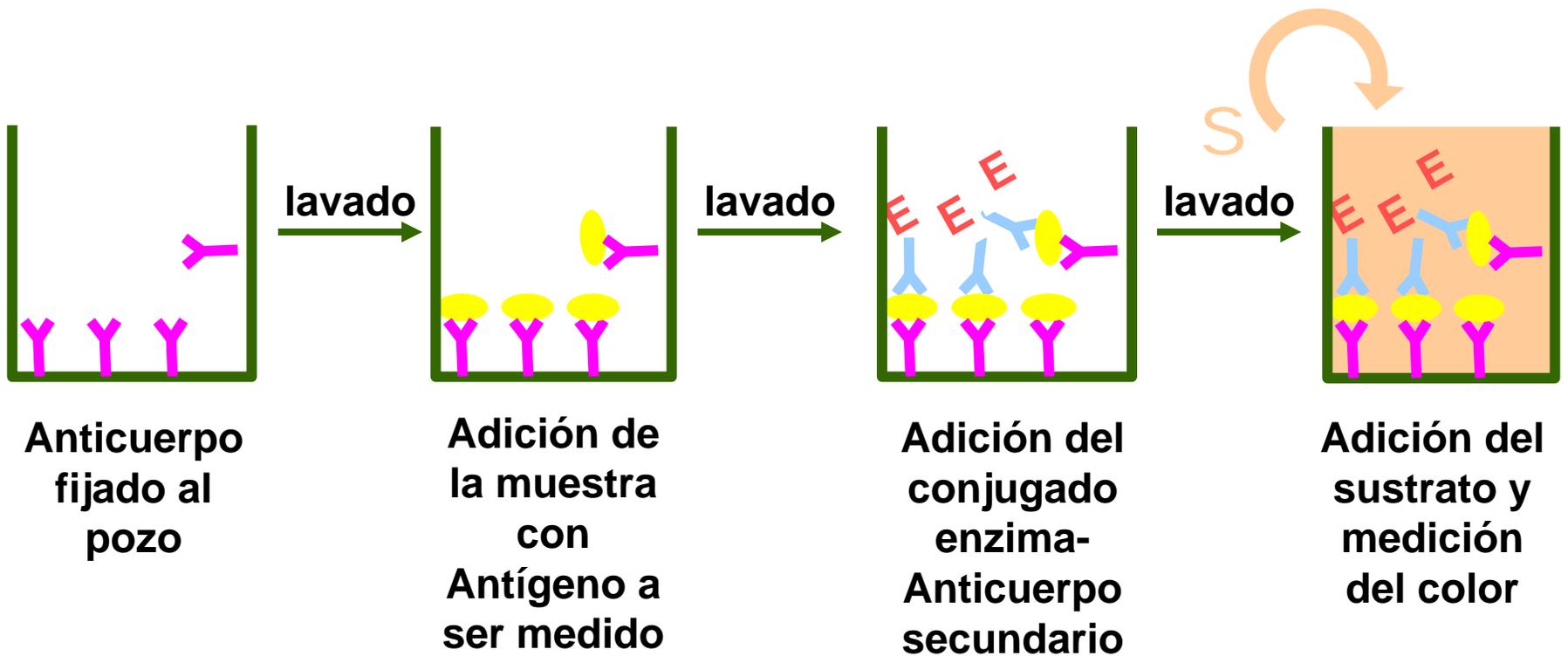


**Adición de  
la muestra  
con  
Antígeno a  
ser medido**

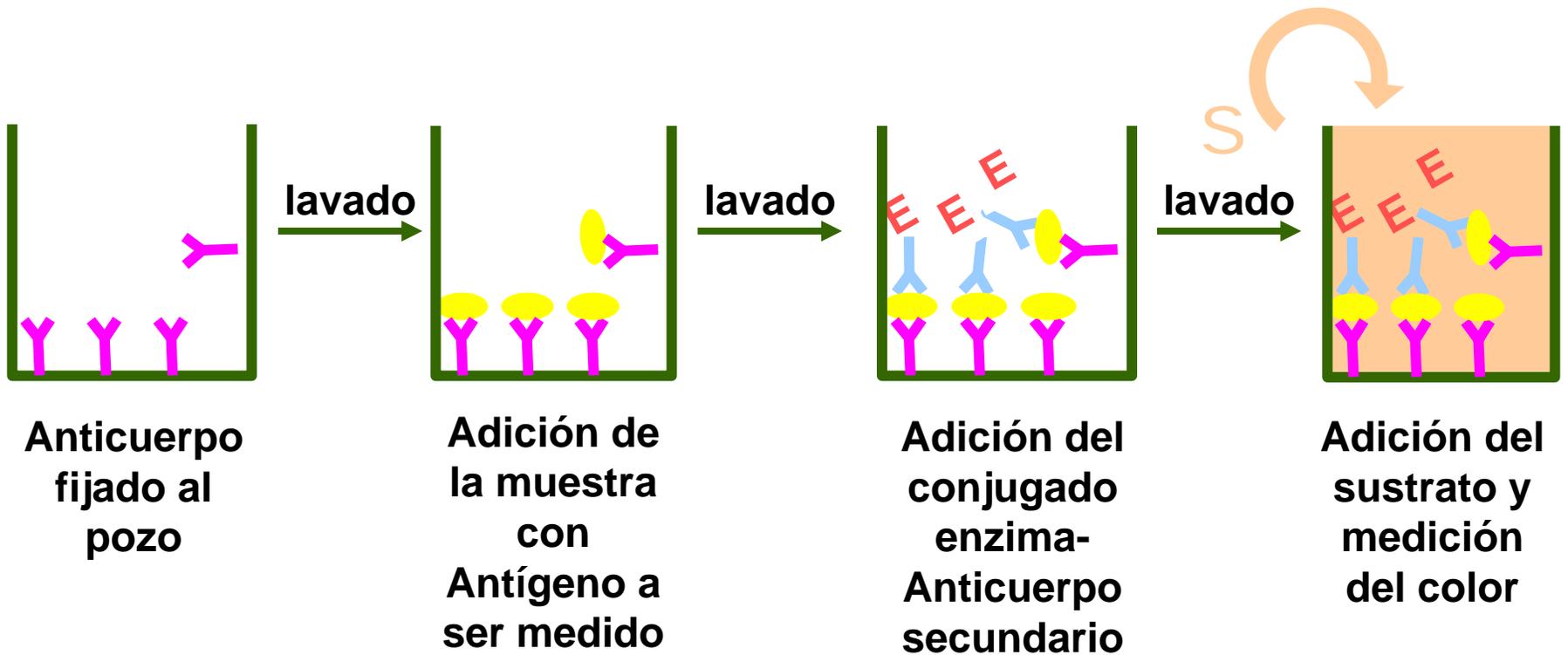
# ELISA SANDWICH



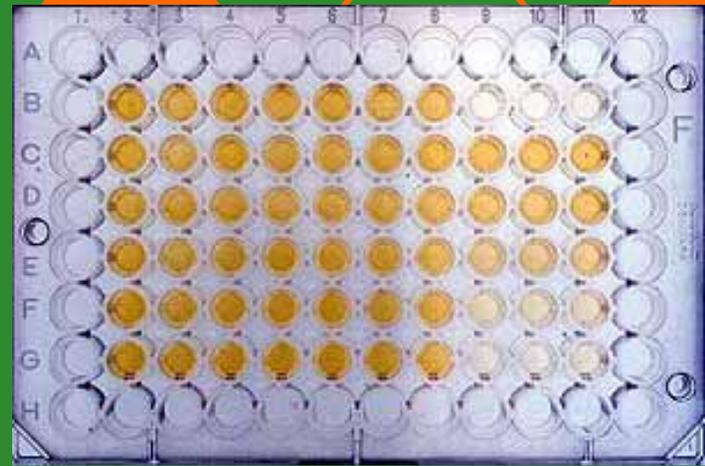
# ELISA SANDWICH



# 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

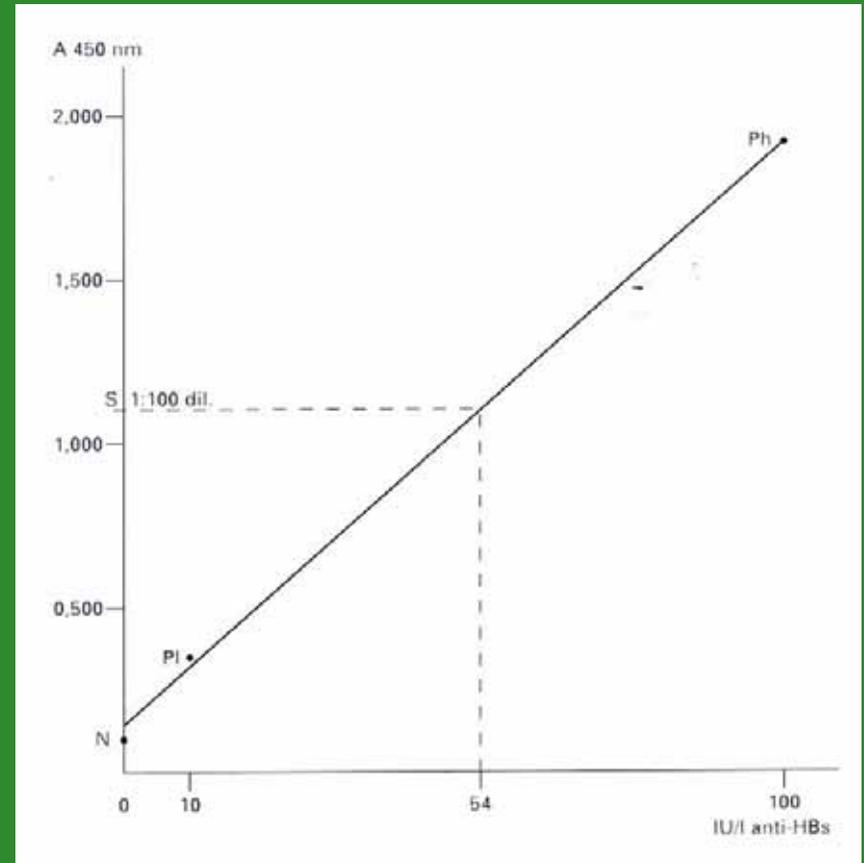
## REPORTE CUANTITATIVO

- 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

