



MEDICINA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
MÉRIDA VENEZUELA



ELISA



Nubia Silva & Lérica Borges

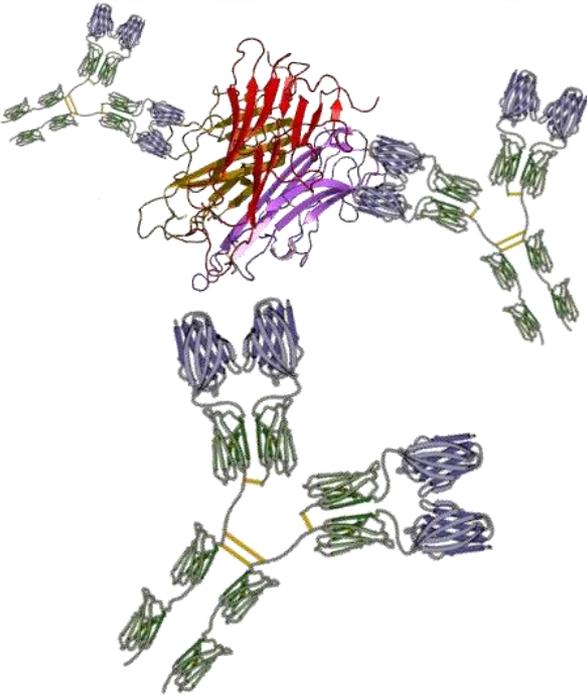
Temario



- ▣ Inmunoensayos
- ▣ Fundamentos del ELISA
- ▣ Componentes
- ▣ Tipos
- ▣ Aplicaciones diagnósticas
- ▣ Ejemplo



Inmunoensayo



**Formación de
inmunocomplejos
(antígeno/anticuerpo)**

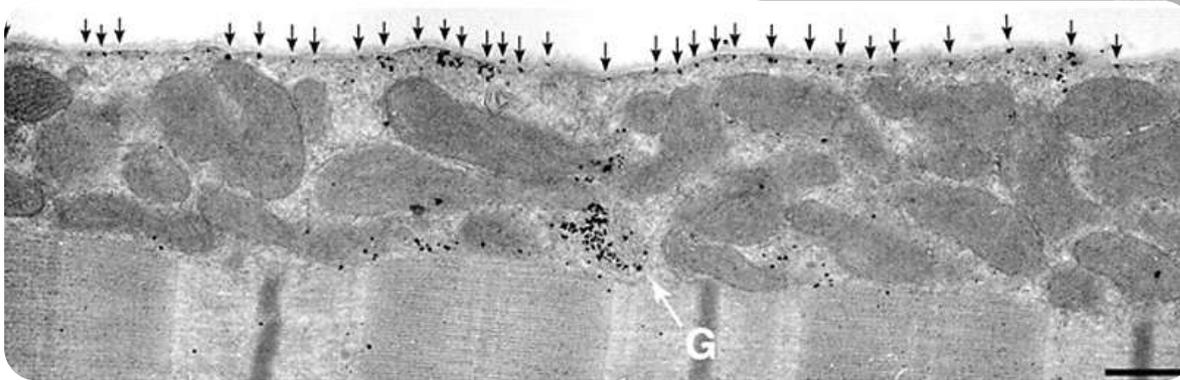
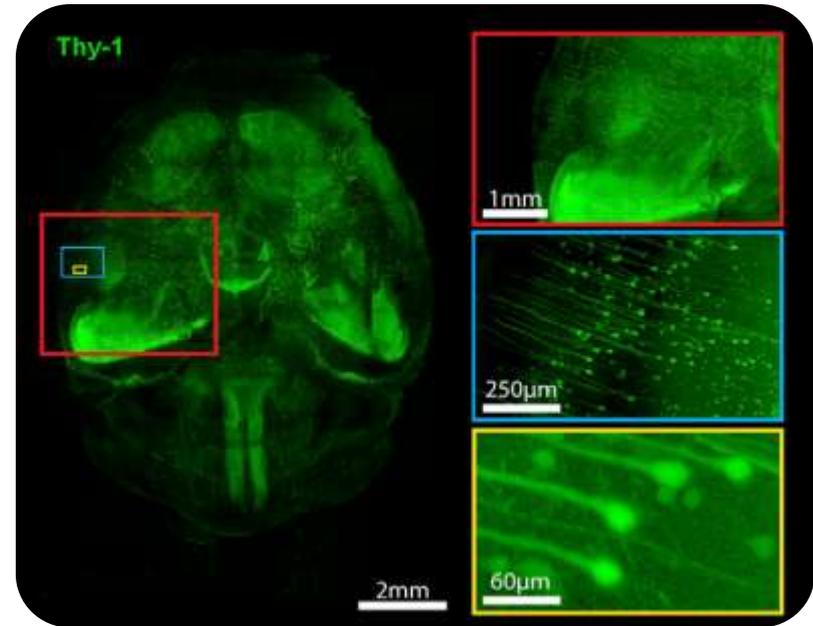
Marcados:
Conjugados a
moléculas que emiten
señales detectables

No marcados:
Son medidos por
dispersión de luz o por
visualización directa

- Radioinmunoensayo (RIA): El marcador es un isótopo radioactivo.
- **Análisis inmunoenzimáticos (EIA):** El marcador es una enzima.
- Fluoroinmunoanálisis: El marcador es una partícula fluorescente.
- Ensayos inmunoquimioluminiscente: La marca es una sustancia quimioluminiscente.

- Precipitación
- Aglutinación

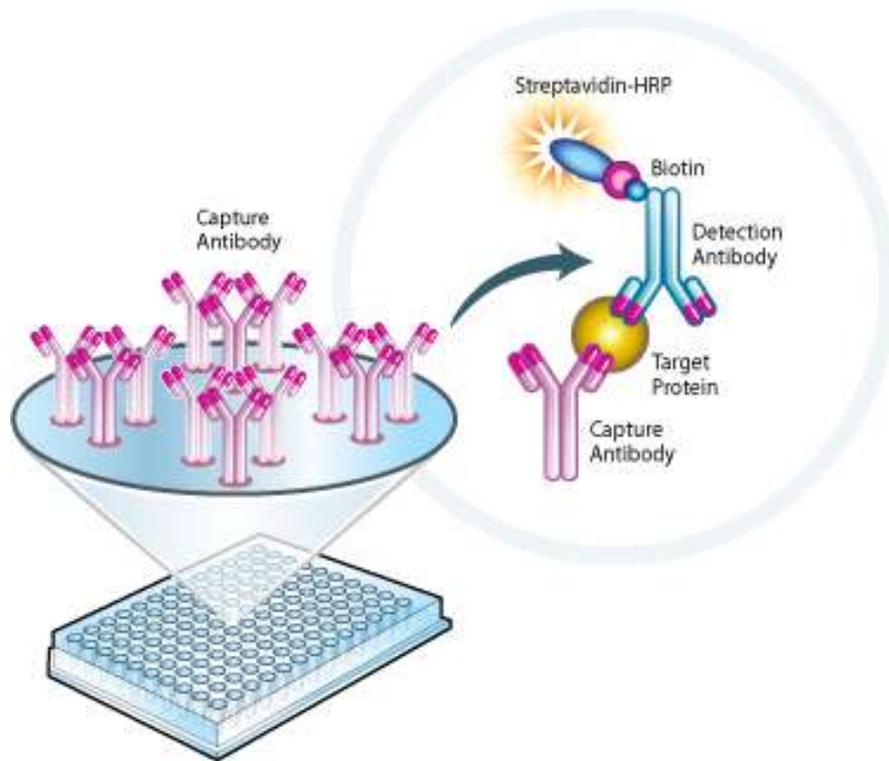
Inmunoensayo



Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2015 Jun 15;308(12):G981-93

Cell. 2014 Aug 14;158(4):945-58

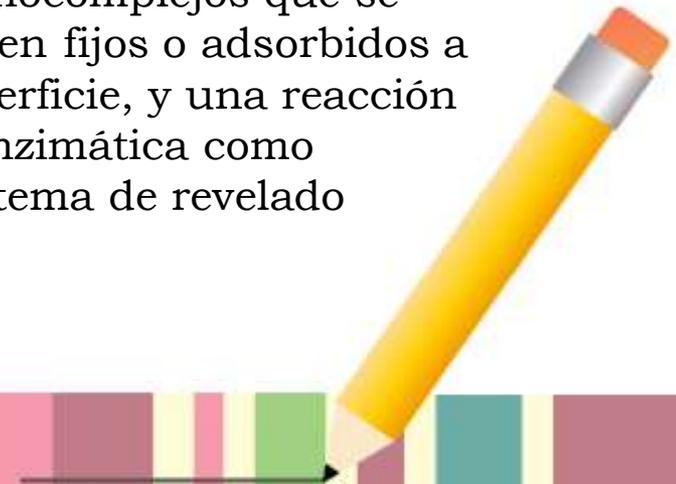
ELISA



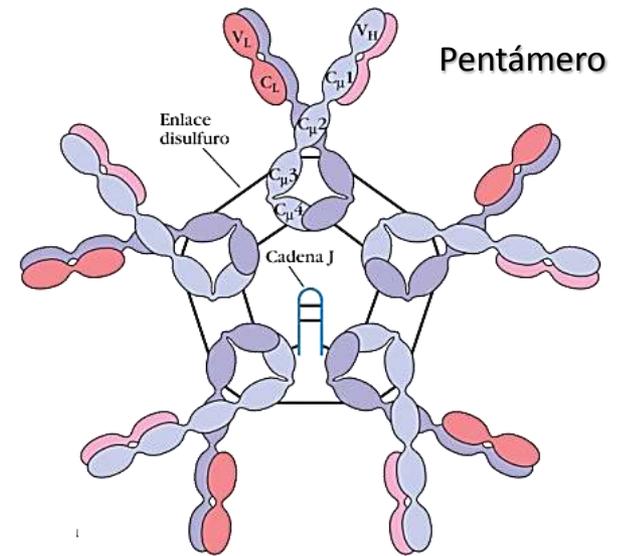
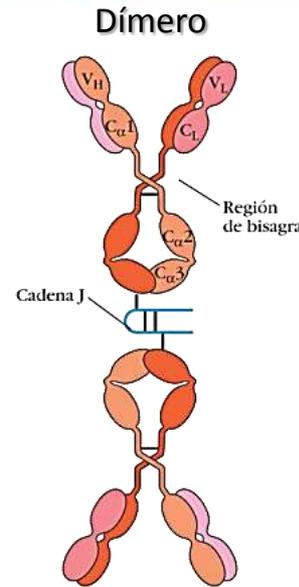
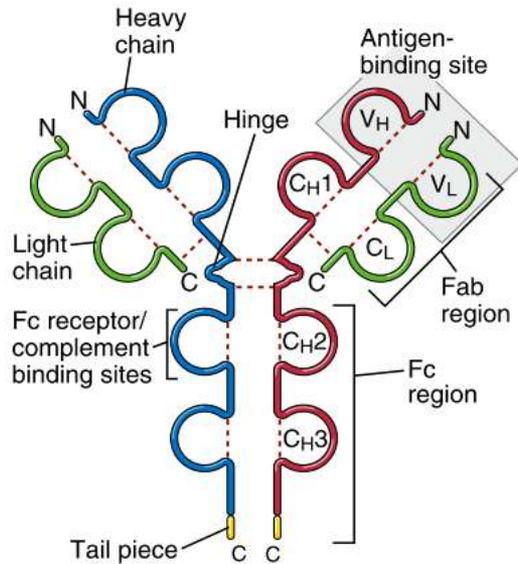
Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzima

Determina presencia de anticuerpos o antígenos en la muestra de un paciente.

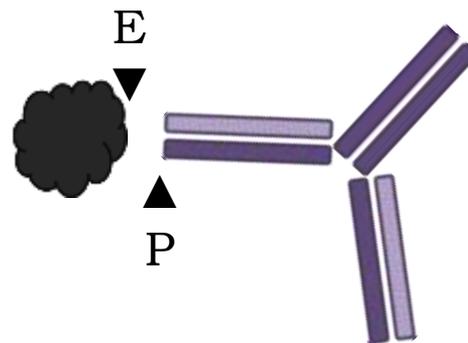
El basamento de la técnica radica en la formación de inmunocomplejos que se encuentren fijos o adsorbidos a una superficie, y una reacción enzimática como sistema de revelado



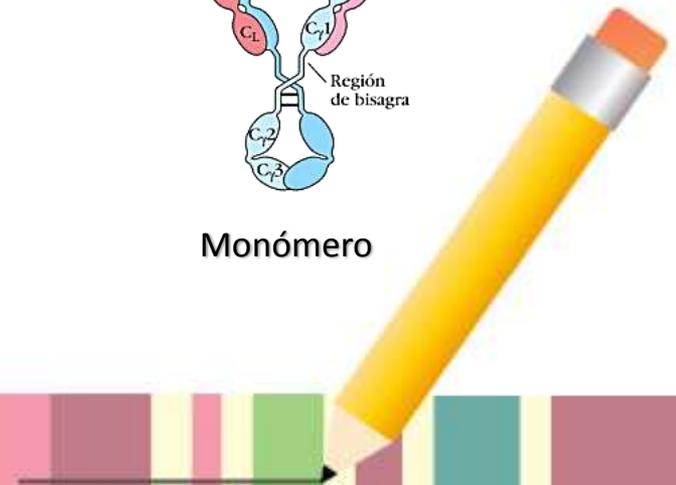
Definiciones



Monómero



- Antígeno
- Inmunogénico
- Antigénico
- Epítipo
- Parátipo
- Anticuerpo
- Cadena pesada
- Cadena ligera
- Porción Fab
- Porción Fc
- Isotipos



Pasos generales del ELISA

Sensibilización



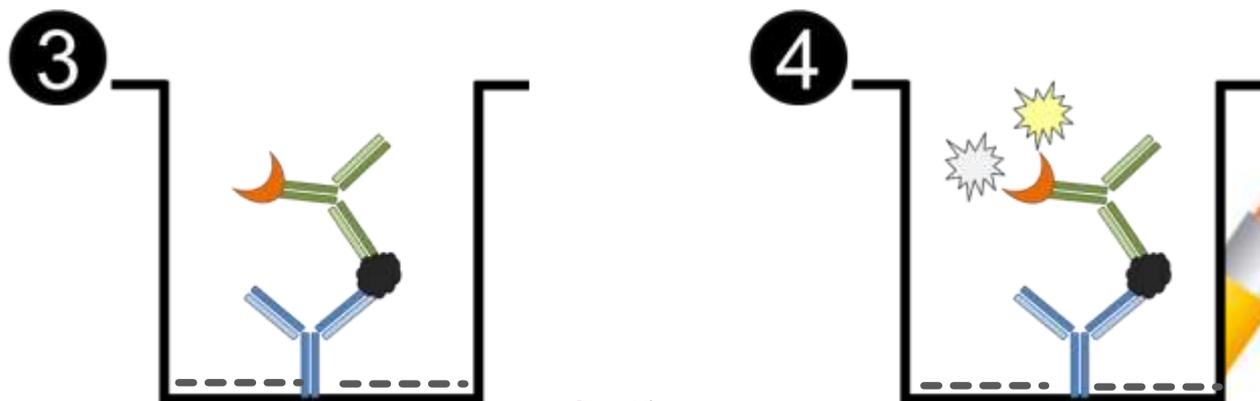
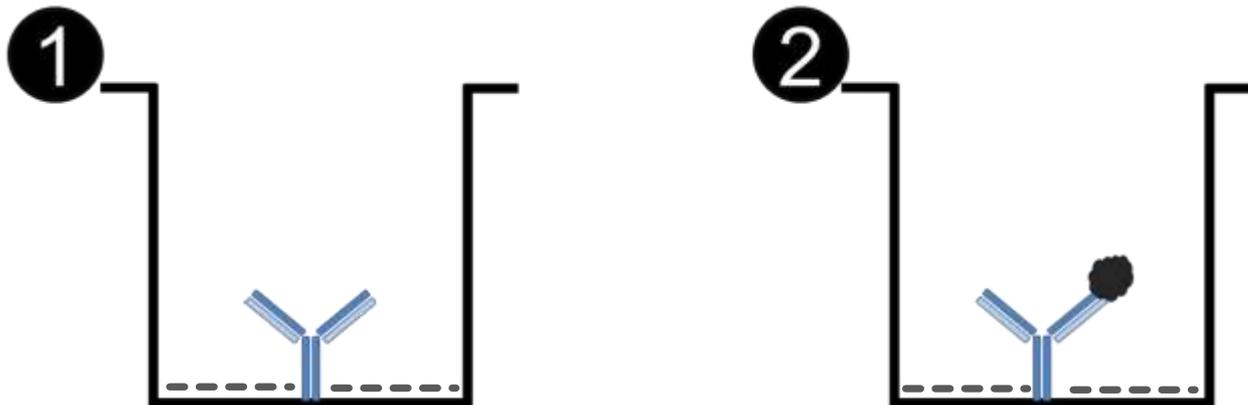
Formación de Inmunocomplejos



Reacción enzimática



Lectura



■ Bloqueos

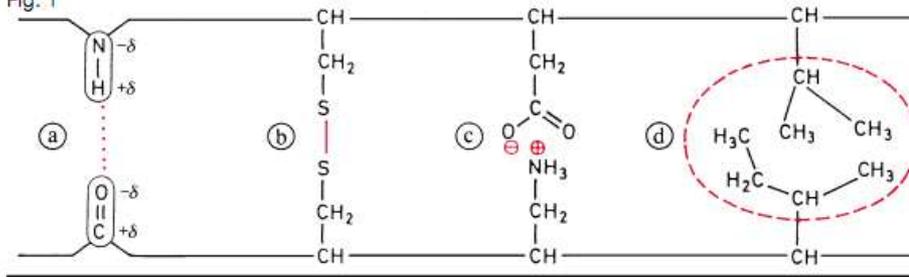
■ Lavados

Pasos generales del ELISA

Sensibilización



Fig. 1



Pasos generales del ELISA



Formación de
Inmunocomplejos



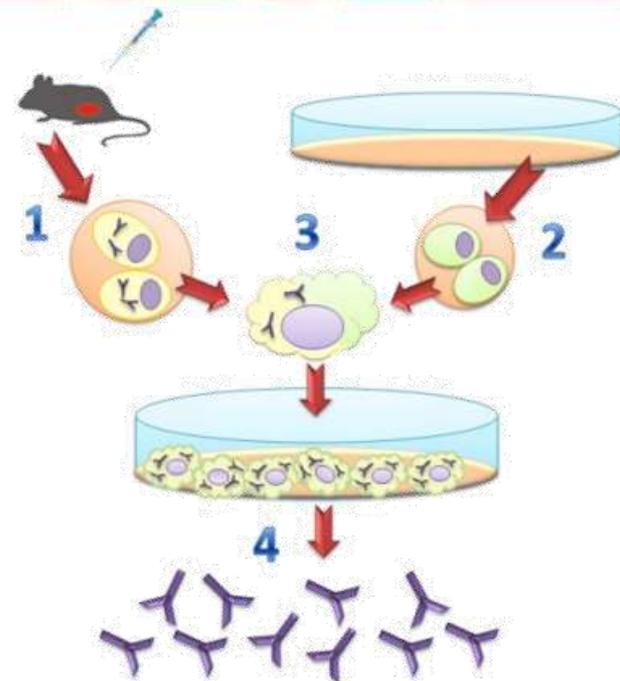
Anticuerpos

- Monoclonales:
 - \$\$\$\$\$\$\$\$\$\$
 - Altamente mono específicos
 - Difícil obtención (hibridomas)

- Policlonales:
 - \$
 - Poli específicos
 - Fácil obtención
 - Reacciones cruzadas

- Conjugados:
 - Marcados directamente con la enzima (\$\$\$\$)

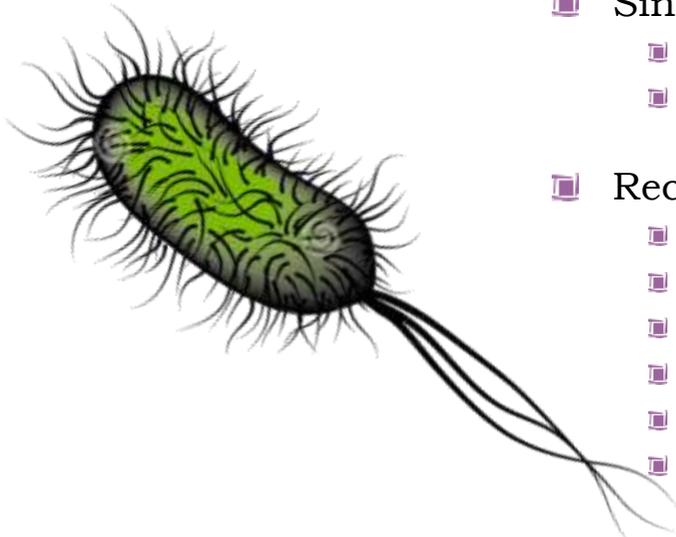
- Biotinilados:
 - Acoplados a biotina (\$\$\$)
 - Multiuso
 - Amplifica señal



Pasos generales del ELISA

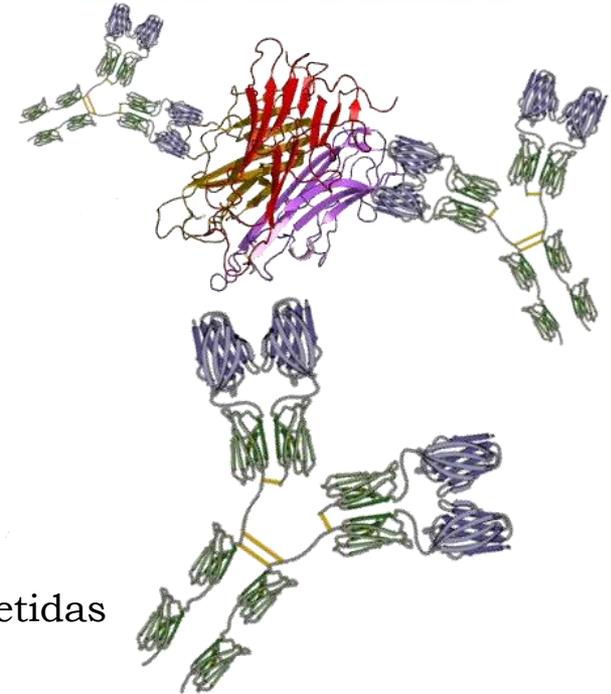


Formación de
Inmunocomplejos



Antígenos

- Lisados:
 - Muy baratos
 - Reacciones cruzadas
 - Inespecíficos
- Purificados:
 - Mejora especificidad
 - Laboriosos
- Sintéticos:
 - Costosos
 - Estructuras 3 y 4 comprometidas
- Recombinantes:
 - Moderadamente costosos
 - Altamente específicos
 - Reproducibilidad
 - Permiten quimeras
 - Sistemas eucariotas y procariotas
 - Producción en masa
- Anticuerpos como antígenos



Pasos generales del ELISA



Formación de
Inmunocomplejos



Muestras

- Prácticamente cualquier muestra biológica en solución



Pasos generales del ELISA



Reacción enzimática



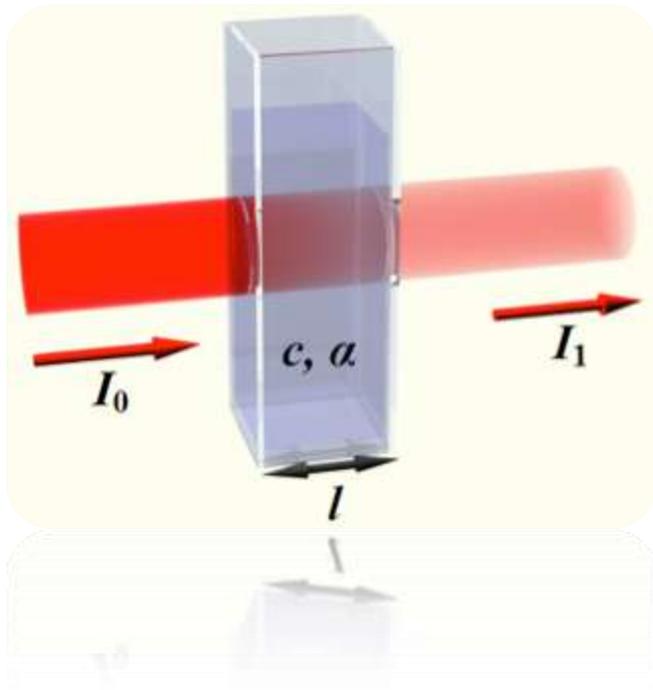
Enzyme	Source	Chromogenic substrates and measurement
Alkaline phosphatase	Calf intestine	<i>p</i> -nitrophenyl-phosphate $\lambda = 405 \text{ nm}$ (pNP)
β -galactosidase	<i>E. coli</i>	<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (oNPG) $\lambda = 420 \text{ nm}$ Chlorophenolic red- β -D-galactopyranoside (CPRG) $\lambda = 574 \text{ nm}$
Peroxidase	Horseradish	H_2O_2 / 2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid-6) (ABTS) $\lambda = 415 \text{ nm}$ H_2O_2 / 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) $\lambda = 450 \text{ nm}$ H_2O_2 / <i>o</i> -phenylenediamine (oPD) $\lambda = 492 \text{ nm}$
Glucose oxidase / peroxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Coupled enzyme reaction glucose + chromogen for HRP
Urease peroxidase	Jack bean niger	Glucose + chromogen for HRP
Urease	Jack beans	Urea/bromocresol yellow $\lambda = 588 \text{ nm}$



Pasos generales del ELISA



Lectura



Pasos generales del ELISA



Lectura

Análisis de resultados

- Cualitativos:
 - Positivo y Negativo
 - **Necesita establecer puntos de corte**
- Cuantitativos:
 - Valores continuos
 - **Necesita curva de calibración**

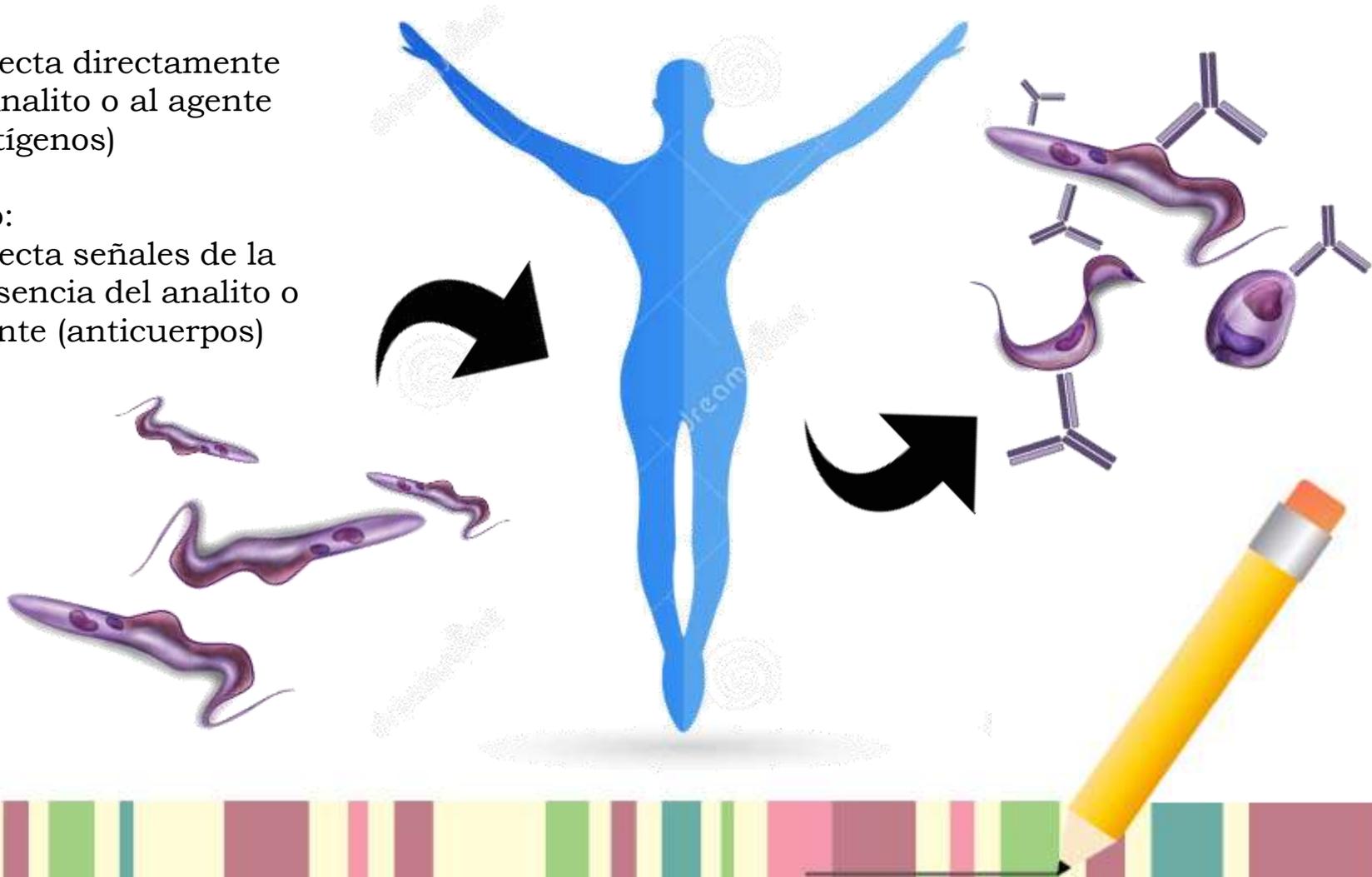
De interés diagnóstico y epidemiológico

- Sensibilidad:
 - Que los enfermos den positivo
- Especificidad:
 - Que los sanos den negativo
- Valor predictivo positivo:
 - Que los positivos realmente sean enfermos
- Valor predictivo negativo:
 - Que los negativos realmente sean sanos

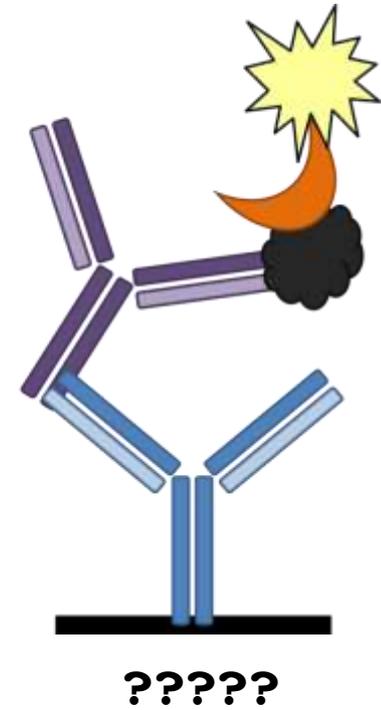
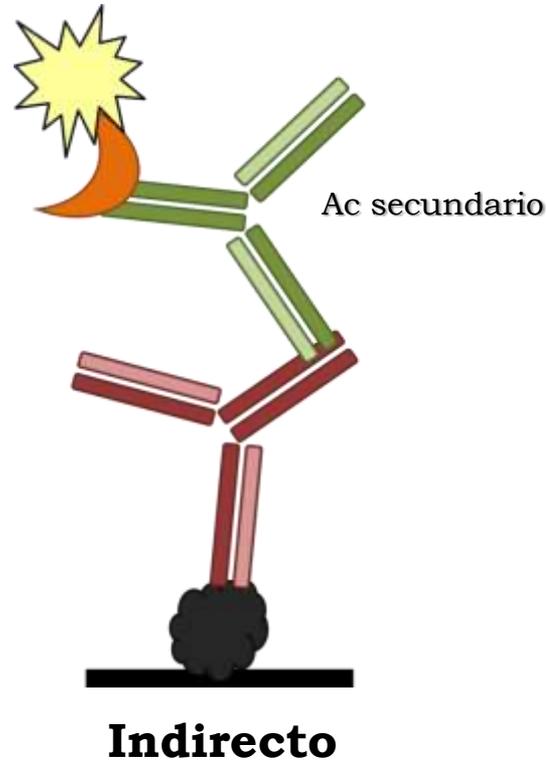
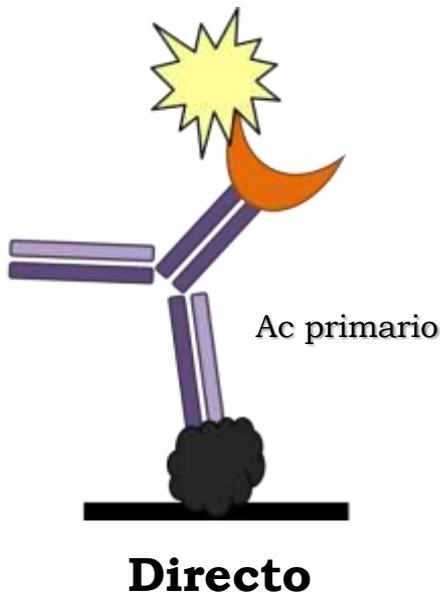
Tipos o variantes del ELISA

De interés diagnóstico y epidemiológico

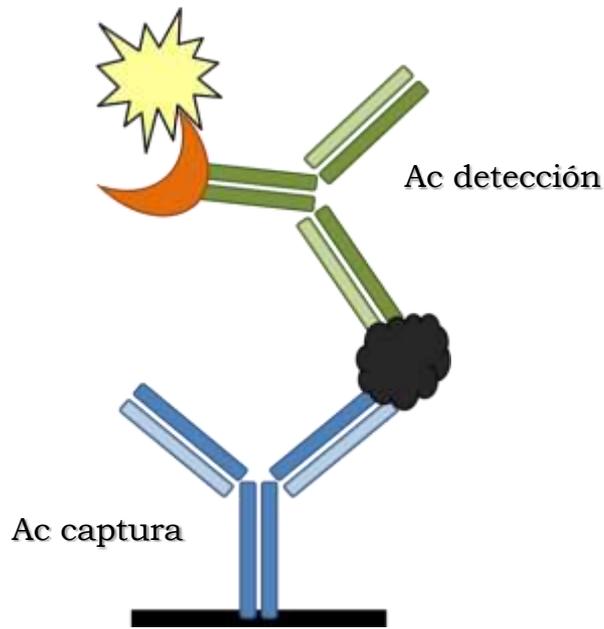
- Directo:
 - Detecta directamente al analito o al agente (antígenos)
- Indirecto:
 - Detecta señales de la presencia del analito o agente (anticuerpos)



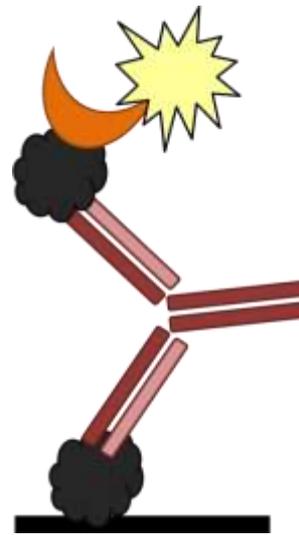
Tipos o variantes del ELISA



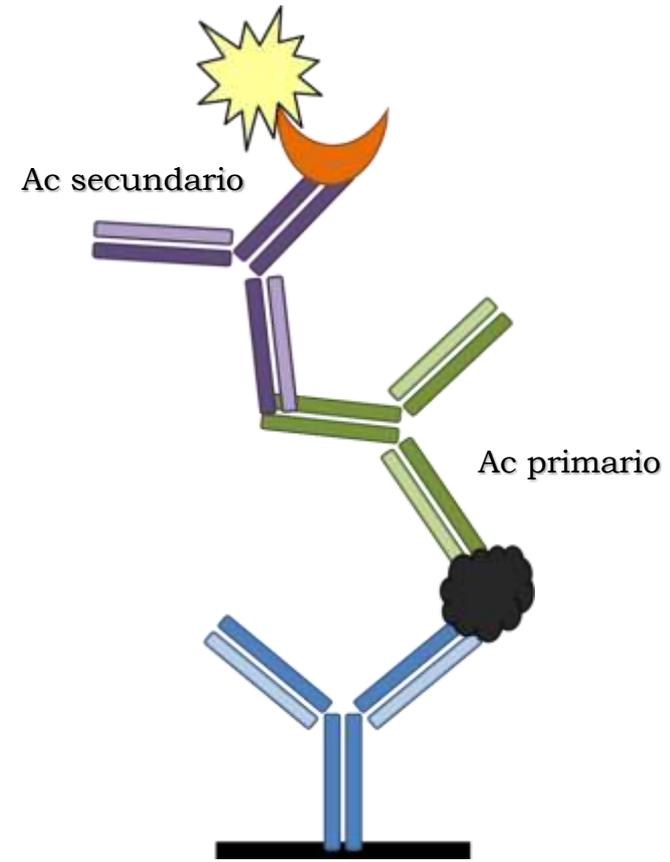
ELISA Sandwich



de Ab

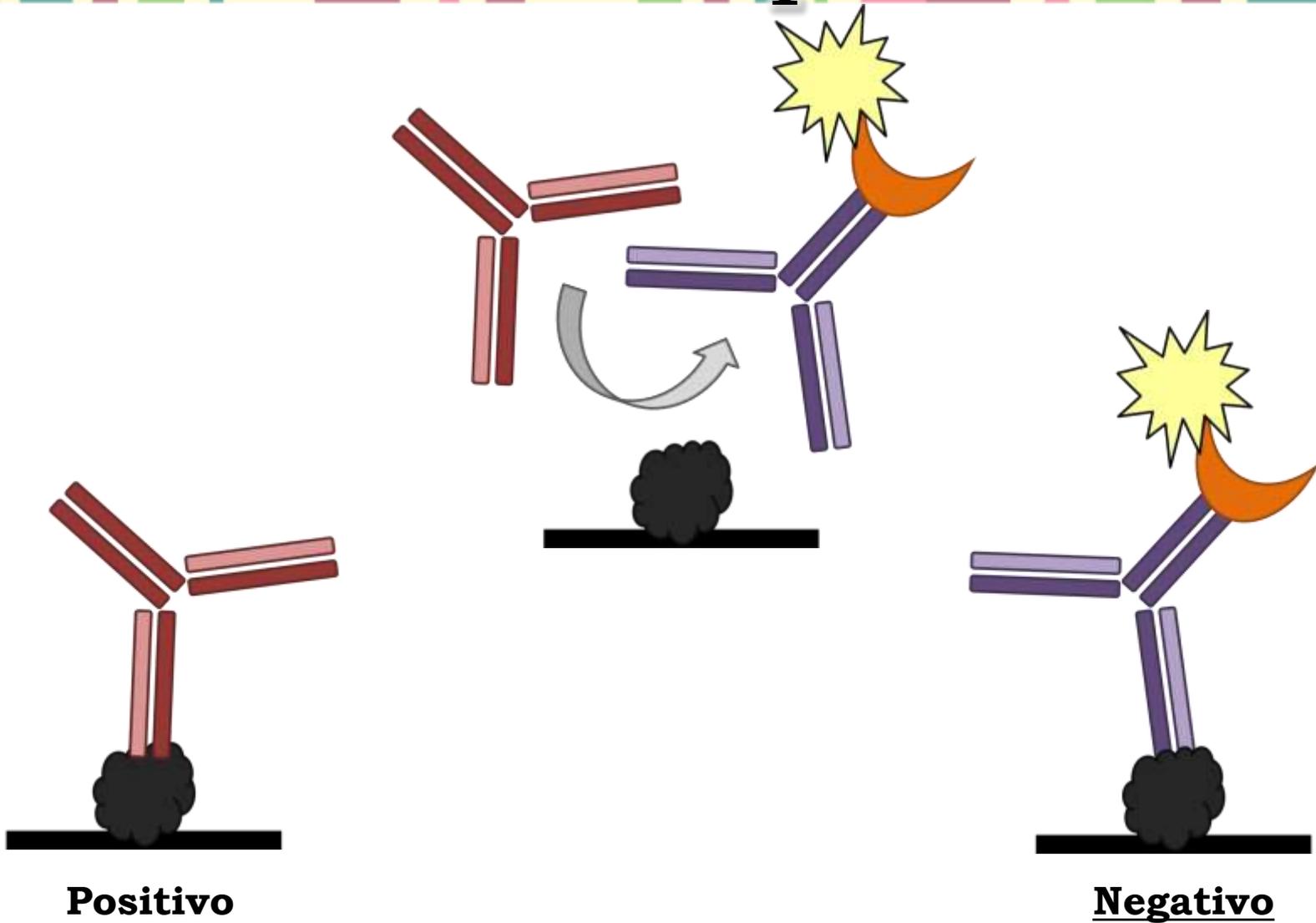


de Ag



Indirecto

ELISA Competitivo

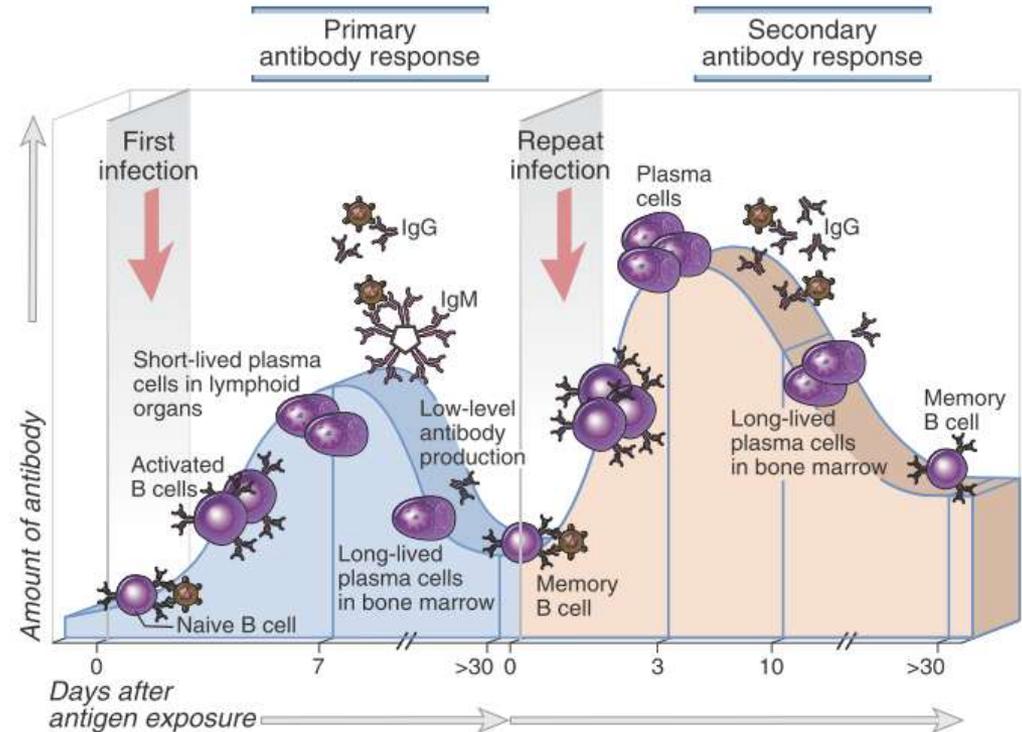
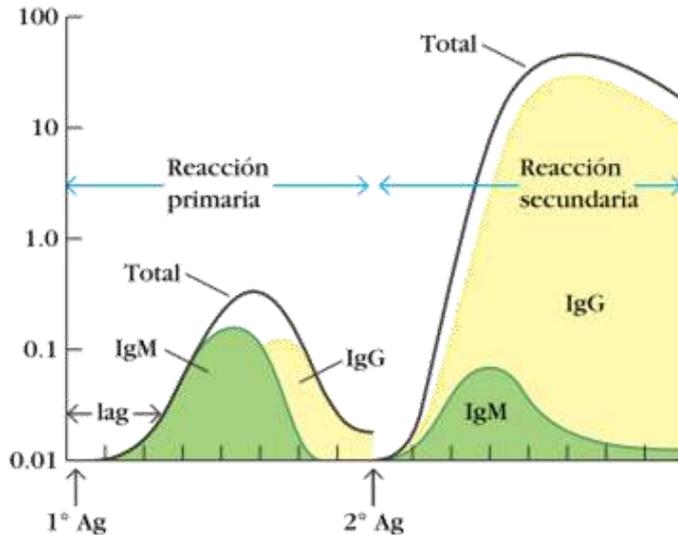


Positivo

Negativo

Aplicaciones

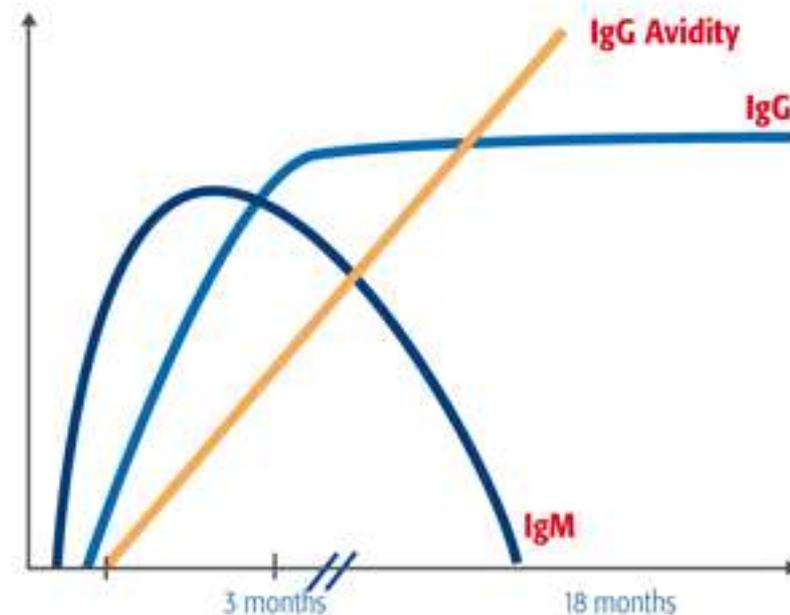
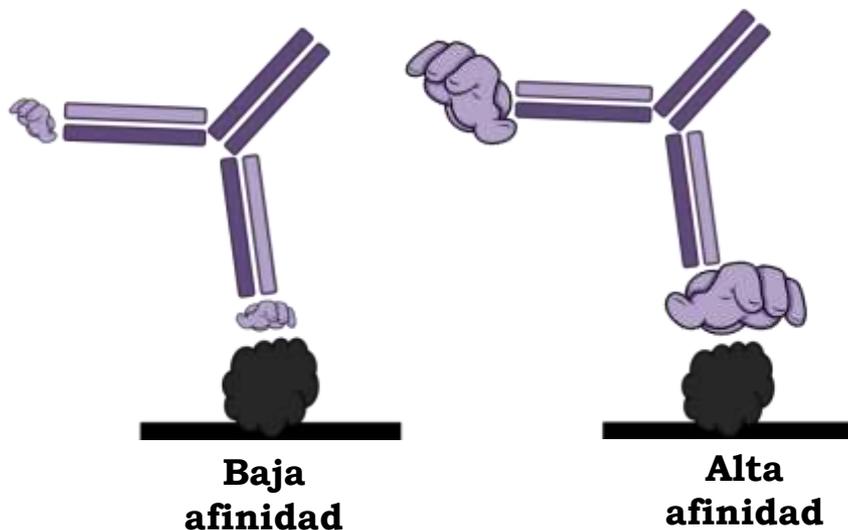
Además de las obvias determinaciones de presencia, ausencia o cantidad; en infecciones permite determinar cuadros agudos o crónicos



Cinética de respuesta de anticuerpos

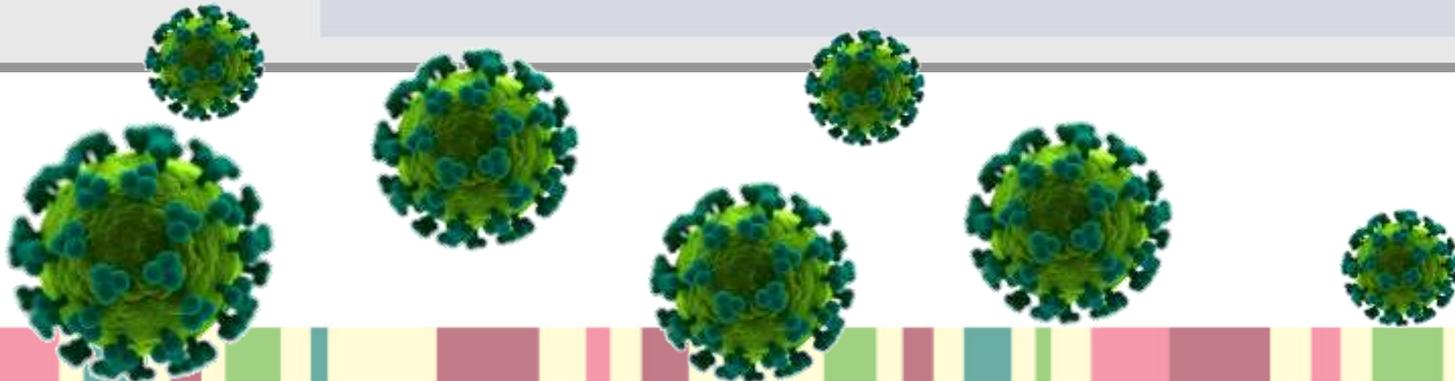
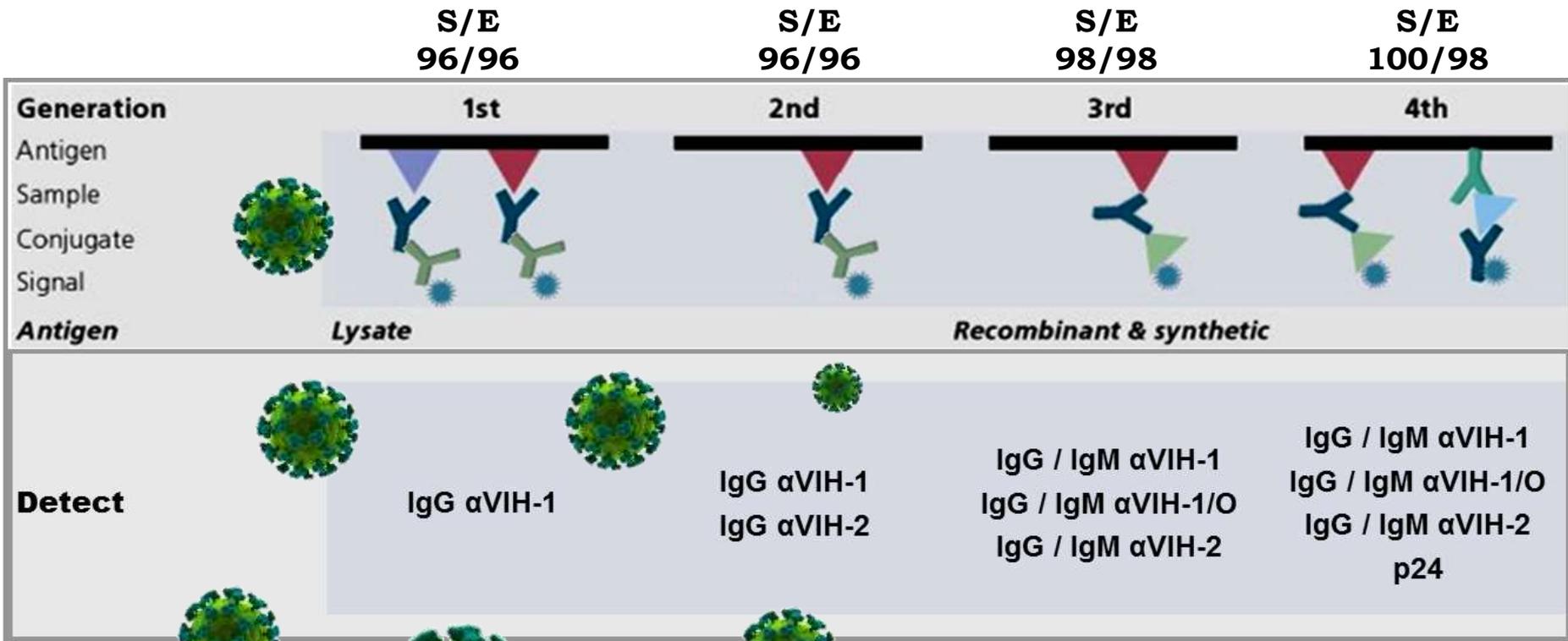
Avidez y afinidad

- ▣ **Afinidad:** fuerza de unión de un anticuerpo con un antígeno monovalente.
- ▣ **Avidez:** fuerza de unión de un antisuero con los antígenos multivalente. Se incrementa con el tiempo de la estimulación antigénica, depende de la afinidad y de las valencias.



Infección por *Toxoplasma gondii*

ELISA en VIH



A laboratory tray containing multiple test tubes and wells, all filled with a red liquid. The test tubes are arranged in rows, and the wells are in a grid pattern. The liquid is a vibrant red color. The background is dark, and the lighting is focused on the tray, creating a slight glow around the edges of the tubes and wells.

Gracias