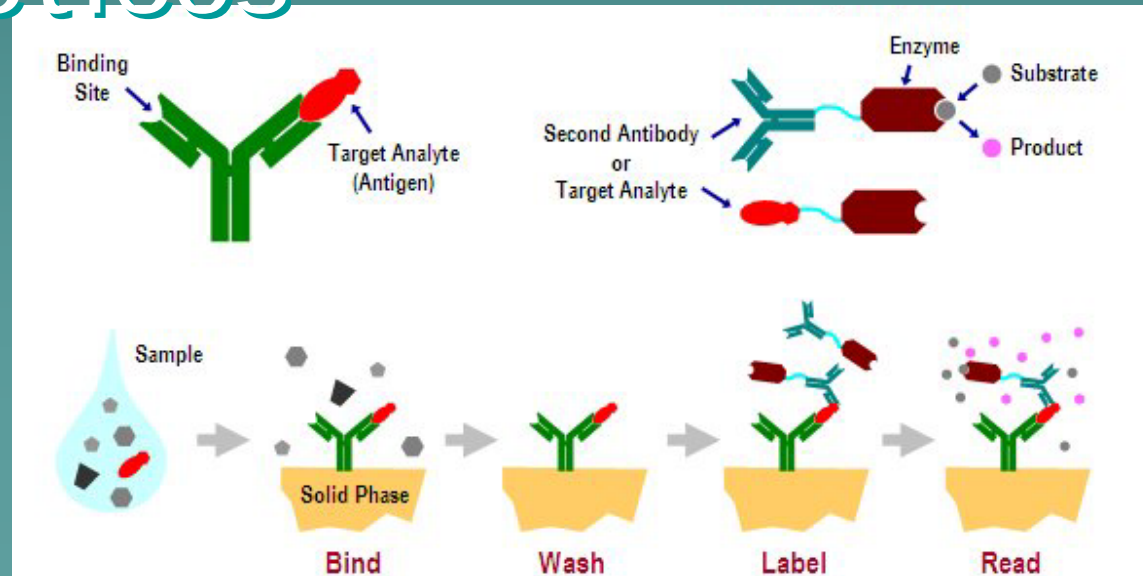


ELISA (Enzyme Linked Immunoassay): Bases Teóricas y Fundamentos Prácticos

Versión a utilizar
en sesiones: 6 y 9

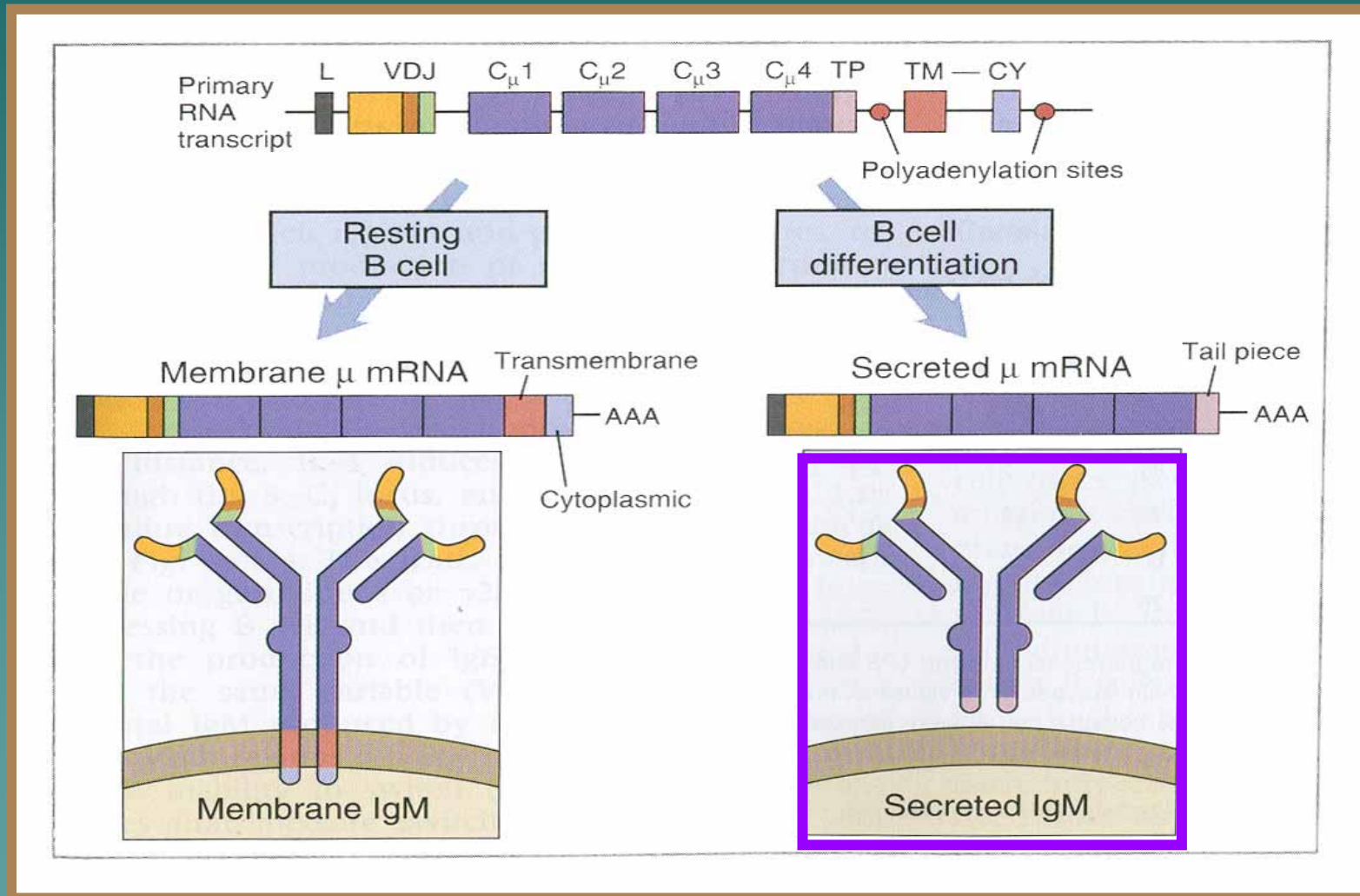


Ensayo inmunoenzimático

◆ Definición:

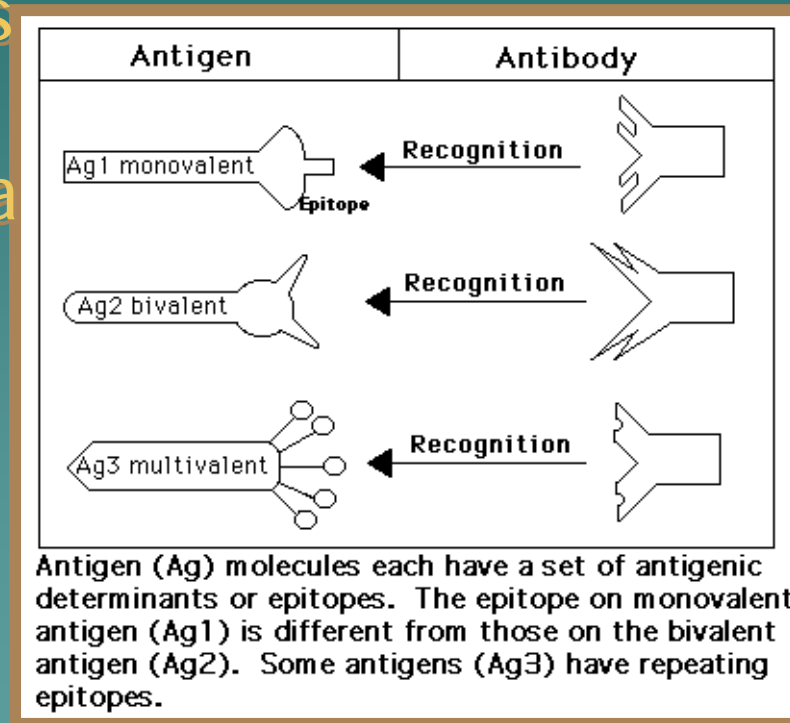
- Es una técnica que combina la especificidad de los anticuerpos con la sensibilidad de un ensayo enzimático. Esta técnica es utilizada para medir tanto **antígenos** como **anticuerpos**, de manera cualitativa, semicuantitativa y cuantitativa

Las inmunoglobulinas: estructura y función



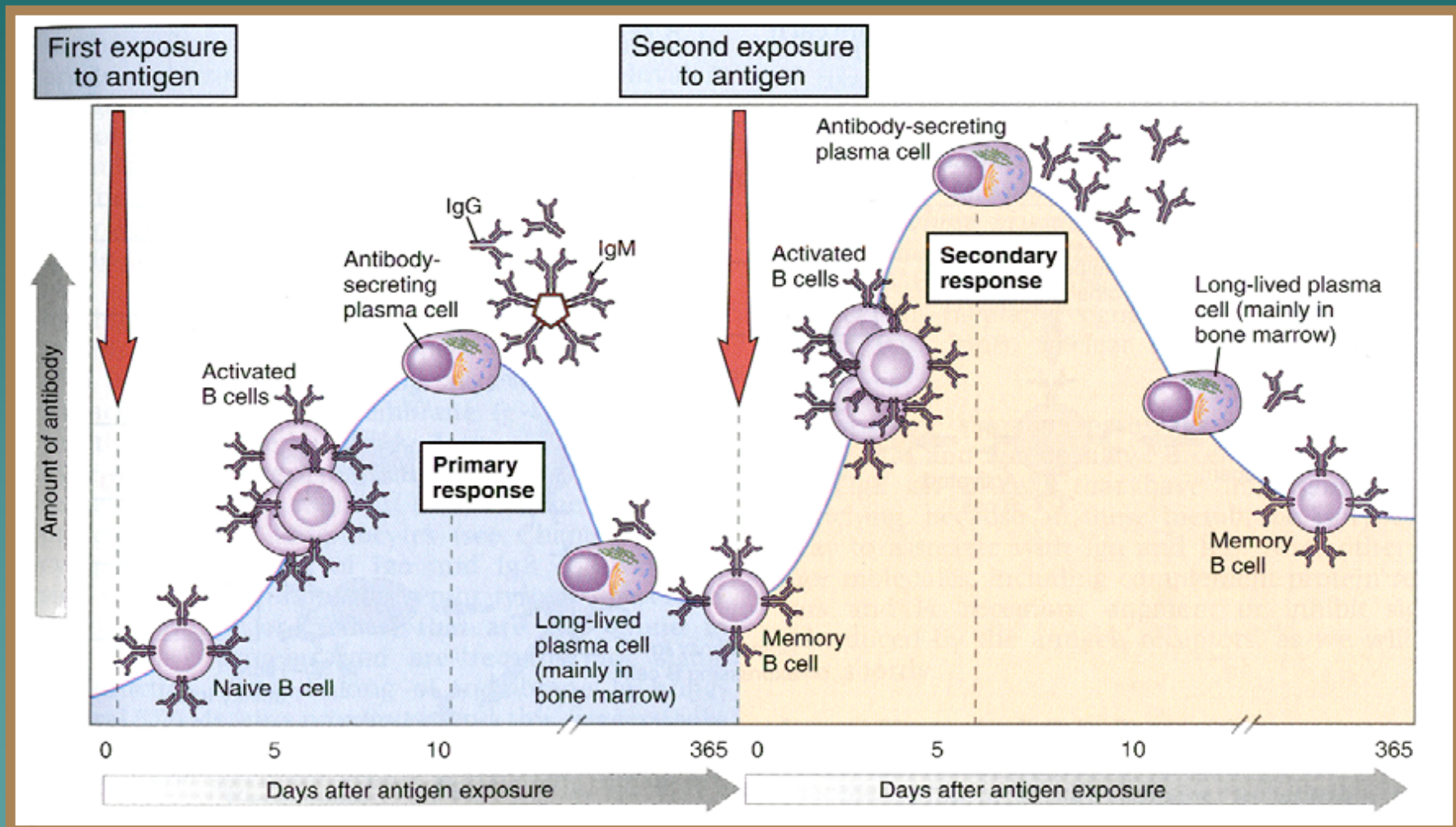
Antígenos e Interacciones Antígeno-anticuerpo

Moléculas complejas extrañas al organismo, de naturaleza proteica que son capaces de inducir una RI y combinarse con los elementos efectores de la misma



- Enlaces iónicos
- Enlaces de hidrógeno
- Interacciones hidrofóbicas
- Fuerzas de van der Waals
- Interacciones dipolo-dipolo

Fases de la respuesta inmune humoral



FUNDAMENTO DEL ELISA

Muestra
Ag Ab

Ag-Ab

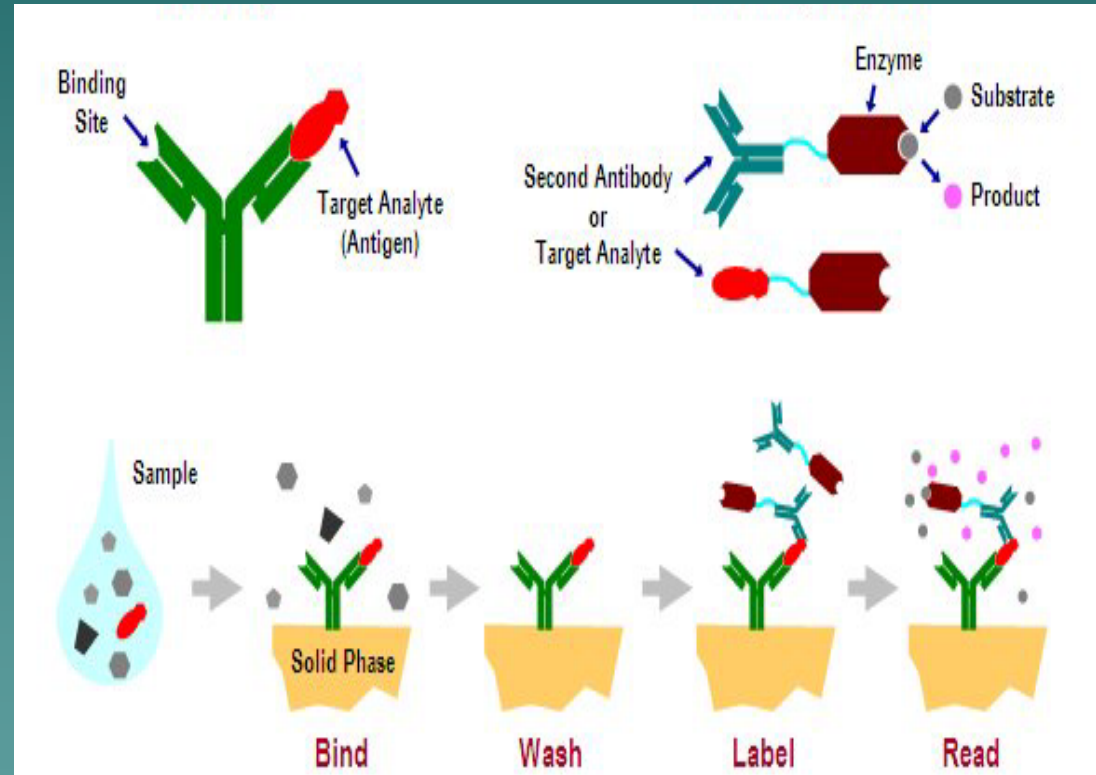
Fase Sólida

Ag-Ab-Enzima

Enzima unida al anticuerpo

Substrato

Compuesto coloreado



ELISA

ELEMENTOS DEL ELISA

- Tipo de muestra
 - Antígenos
 - Anticuerpos
- Fase sólida
- Enzimas
- Lavados
- Substratos
- Revelador de la actividad enzimática



TIPO DE MUESTRA

- Orina
- Suero
- Saliva
- Heces
- LCR
- Otros



ANTÍGENO

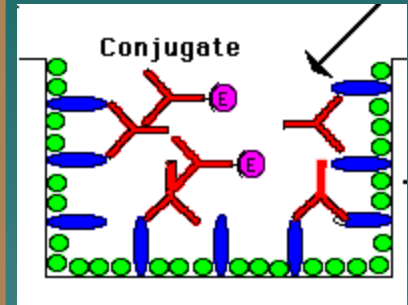
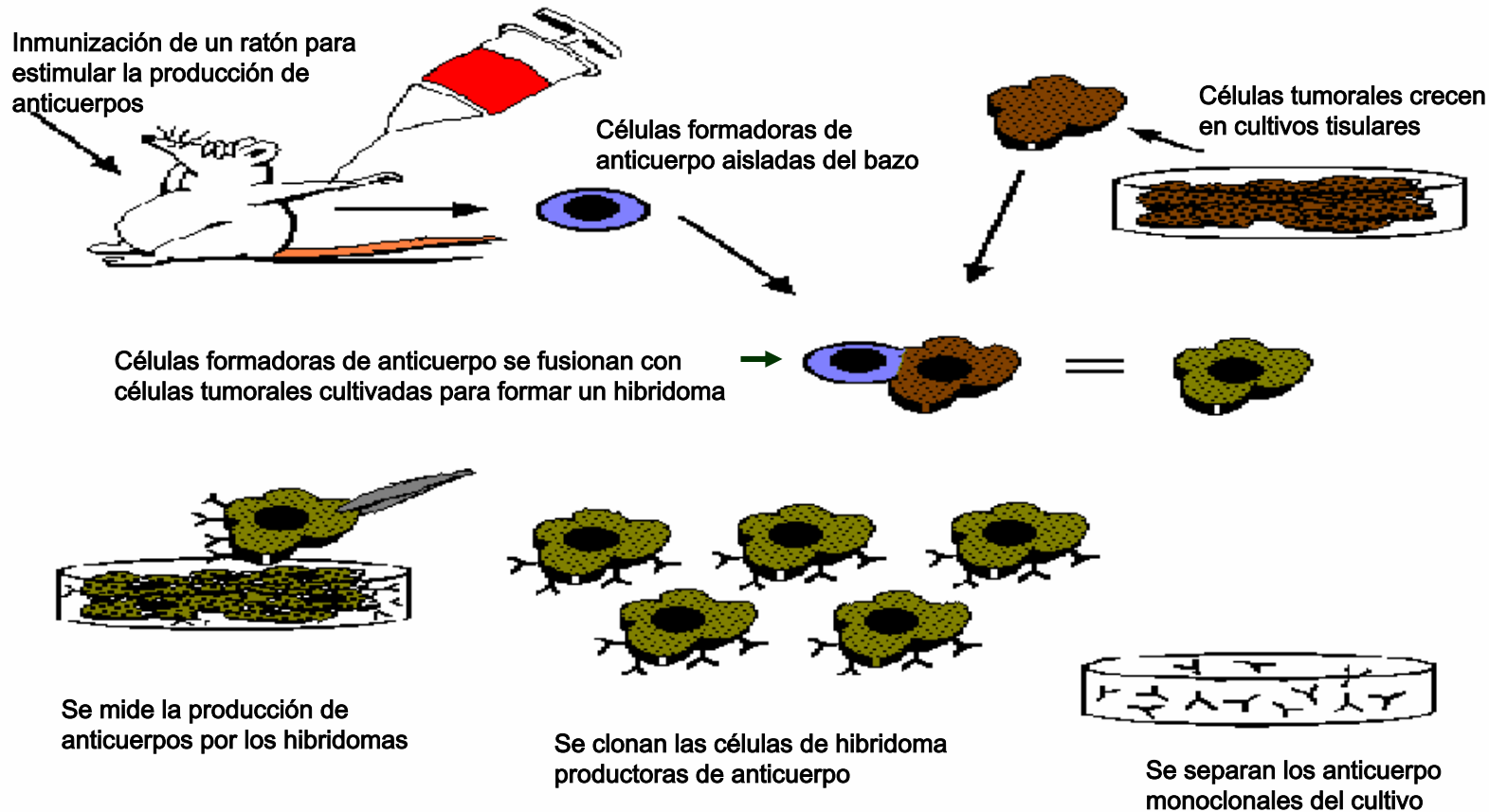
- **Completo** (Organismo, estructura íntegra)
- **Extracto total** (Ultrasonido, solventes)
- **Fracción Purificada** (Núcleo, de membranas, organelas)
- **Péptido sintético**



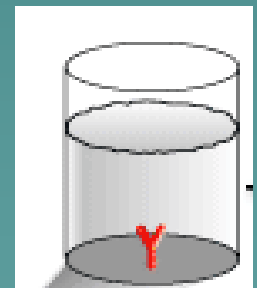
ANTI CUERPOS: Policlonales (infecciones naturales)

Monoclonales

Producción de Anticuerpos Monoclonales

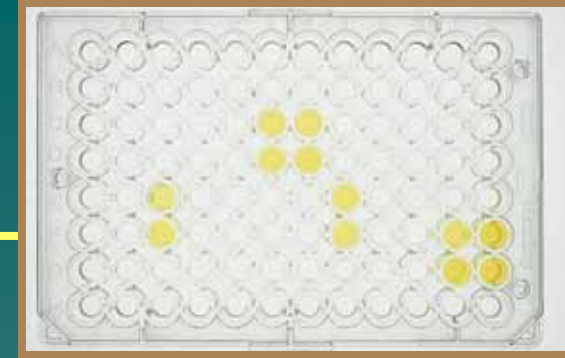


Conjugado con la enzima



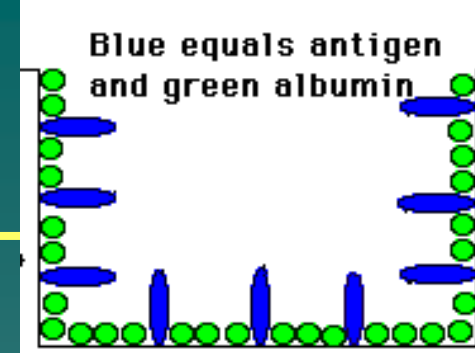
Capturar antígenos

MATERIALES DE LA FASE SÓLIDA:



Soporte	Forma disponible	Unión
Nitrocelulosa	Membranas, Láminas	No covalente
Polivinilo	Placas, Láminas	Covalente
Poliestireno	Placas, Láminas, Perlas	Covalente
Látex, nylon, celulosa	Láminas, Perlas	Covalente

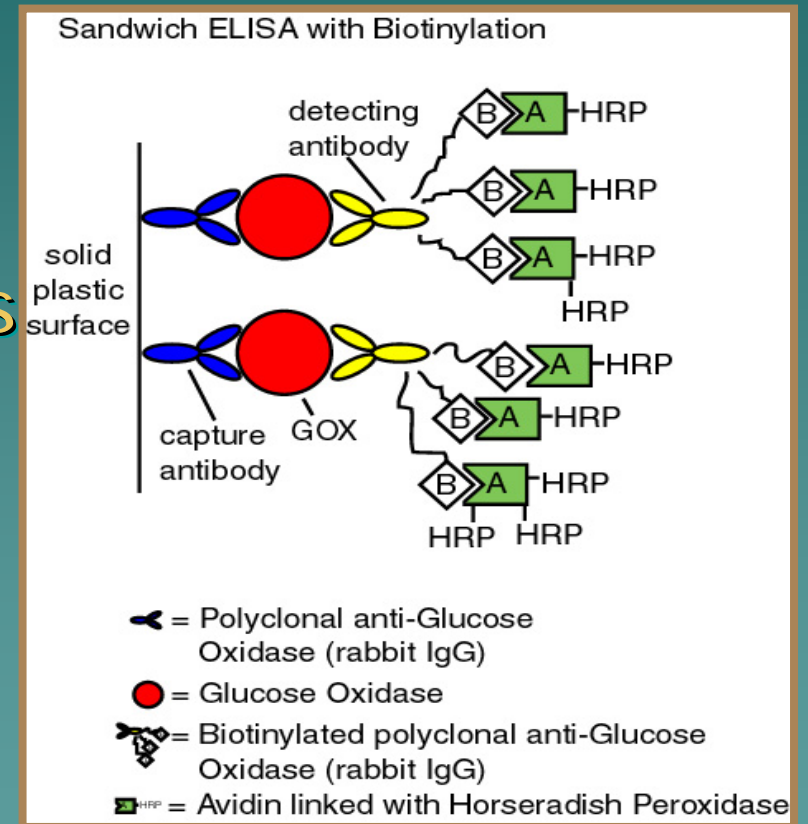
SOLUCIÓN DE BLOQUEO



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

Sistema de revelado de la reacción Ag-Ac: ENZIMA

1. Alta pureza
2. Actividad específica
3. Bajo costo
4. Ausencia en fluidos biológicos
5. Fácil detección
6. Facilidad de conjugación
7. Estabilidad a ciertas condiciones de almacenamiento



TIPOS LA ENZIMA

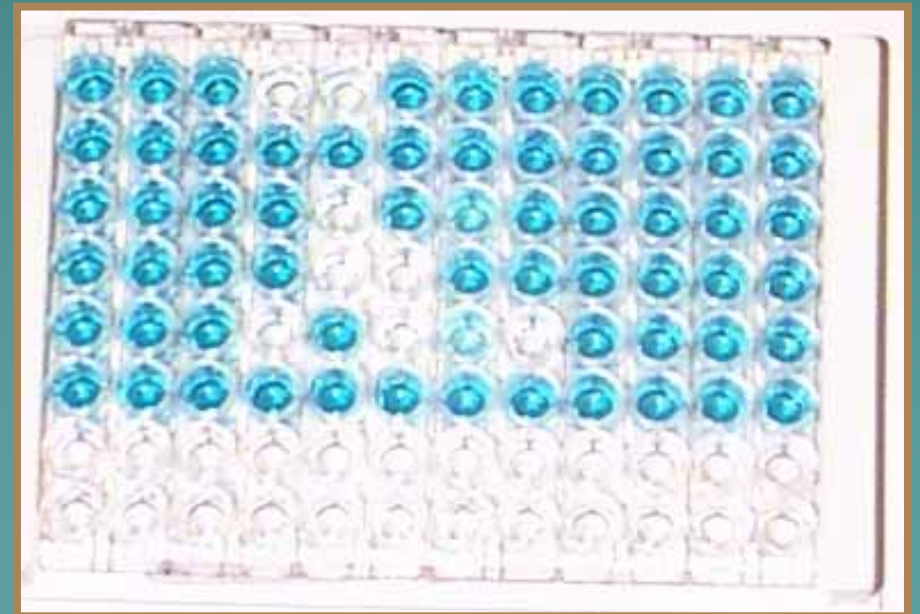
ENZIMA	ORIGEN	Substrato
Peroxidasa	Rabano picante	OPD (Amarillo 492 nm) TMB (Amarillo 450 nm)
Fosfata Alcalina	<i>Eschericia coli</i>	PNP(Amarillo)
β -Galactosidasa	<i>Escherichia coli</i>	ONPG (Amarillo 410)
Glucosa oxidasa	<i>Aspergillus ninger</i>	Glucosa OPD (Anaranjado 490nm)
Lisozimas	Clara del huevo	
Malato Deshidrogenasa	Corazón de Cerdo	

SUBSTRATOS

1. Compuestos solubles
2. Fácil de manipular
3. No resulten tóxicos
4. Bajo costo

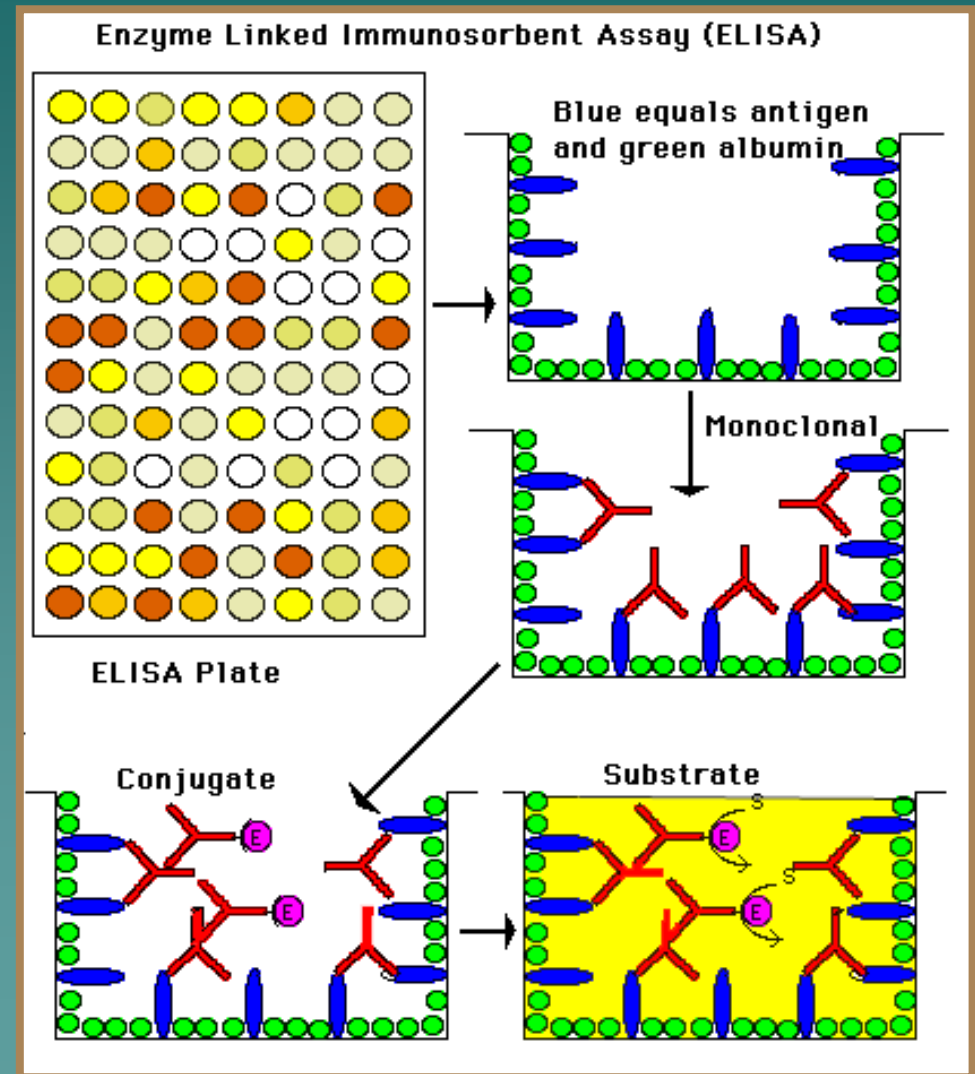
Detección de la actividad Enzimática

Ácidos Fuertes
Bases Fuertes



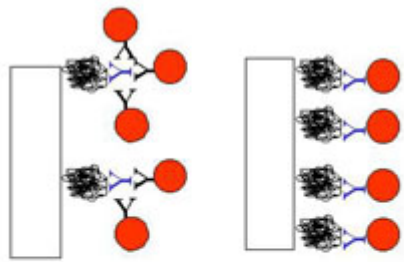
Ensayo inmunoenzimático

- ◆ Sensibilización de la placa
- ◆ Bloqueo de los espacios vacíos
- ◆ Incubación con la Muestra problema
- ◆ Incubación con El sistema de detección: Ej. Si se busca IgG contra Ag del VIH, se trata con anti-IgG humana conjugada con una enzima
- ◆ Adición del sustrato



ELISA

Tipos de ELISA

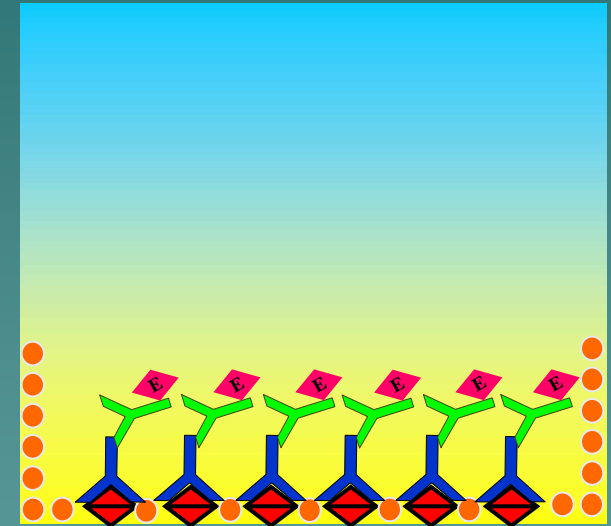
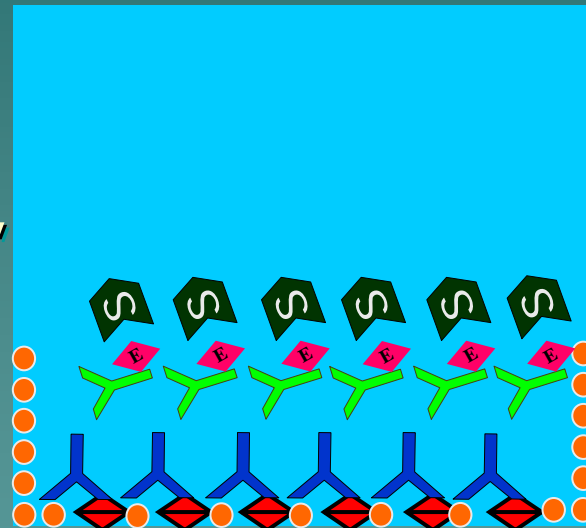


Empleando los pocillos recubiertos de antígeno

ELISA Indirecto

ELISA directo

- ✓ DIRECTO
- ✓ INDIRECTO
- ✓ TIPO "SÁNDWICH" O CAPTURA DE ANTÍGENOS
- ✓ COMPETITIVO



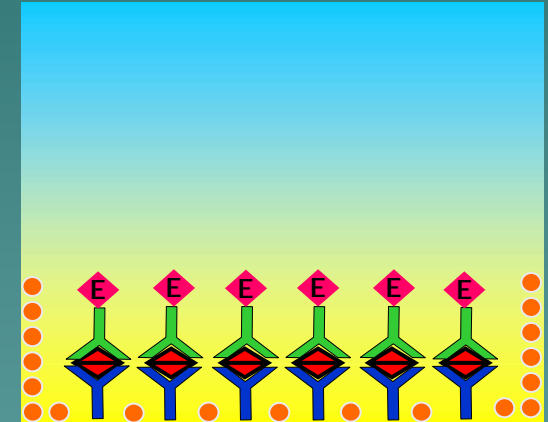
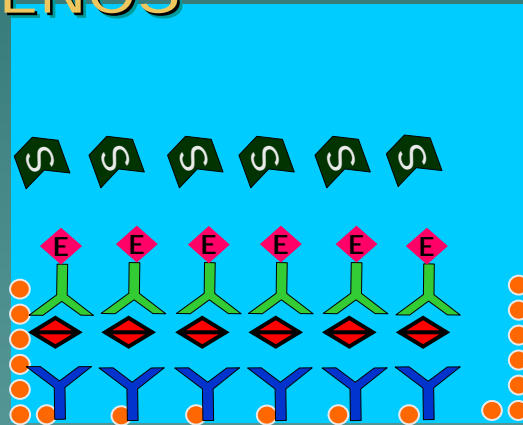
Antígeno
Buffer de bloqueo
Anticuerpo



Anti-I G acoplada a una enzima
Substrato

Tipos de ELISA

- ✓ INDIRECTO
- ✓ TIPO "SÁNDWICH" O CAPTURA DE ANTÍGENOS
- ✓ COMPETITIVO



Antígeno
Buffer de bloqueo
Anticuerpo

Anticuerpo acoplado a la enzima
Substrato

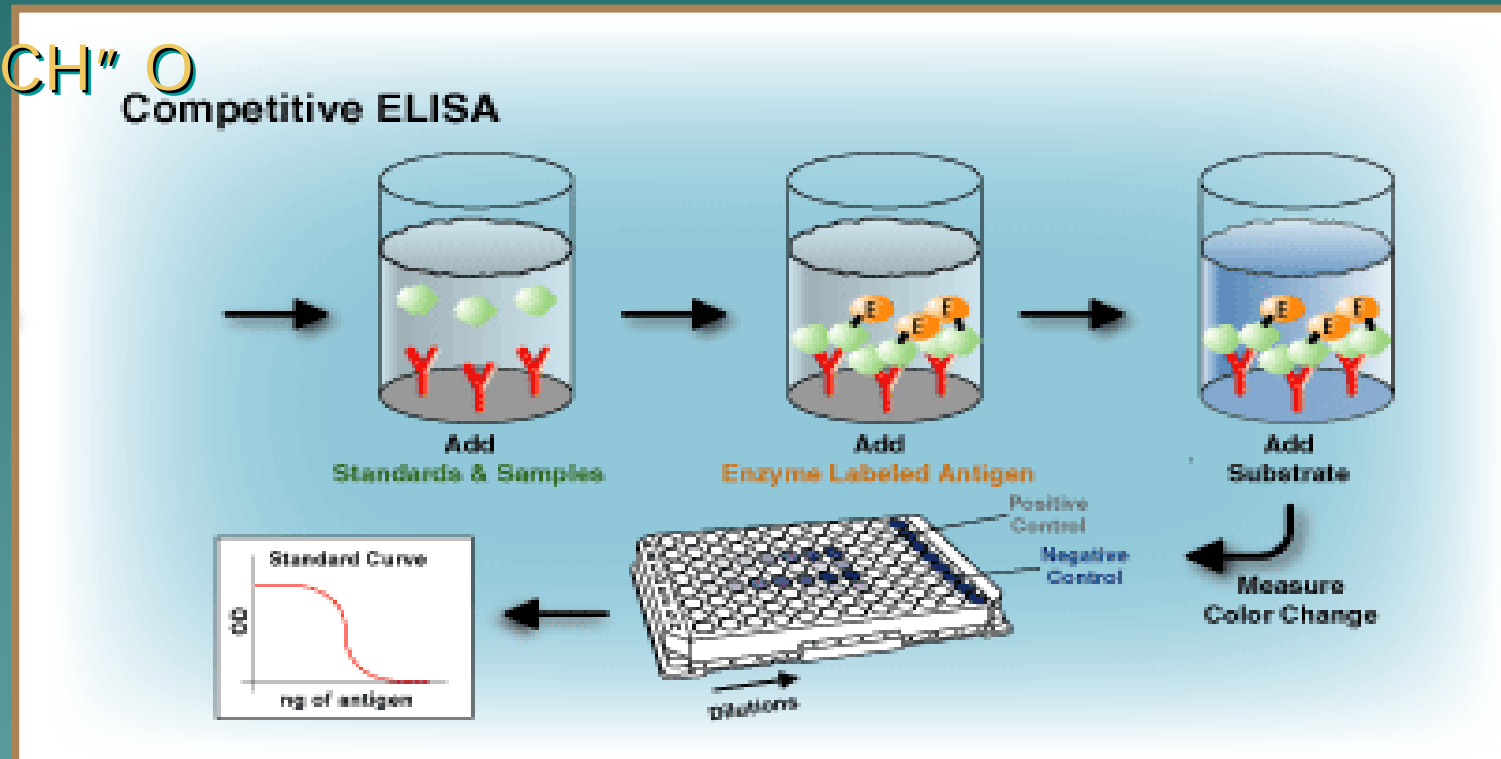
Tipos de ELISA

✓ INDIRECTO

✓ TIPO "SÁNDWICH" ○

CAPTURA DE
ANTÍGENOS

✓ COMPETITIVO



APLICACIONES

Detección de antígenos o anticuerpos

- Virus
- Hongos
- Parásitos
- bacterias

Detección de autoanticuerpos

- IgG (Factor reumatoideo)
- DNA
- Proteína del núcleo
- Tiroglobulina-Microsomales
- Complejos inmune

E

L

I

S

A

APLICACIONES

Medición de Hormonas

Progesterona, estrógenos, cortisol, insulina, testosterona, gonadotropina coriónica humana ,TSH.

Detección de antígenos tumorales:

Antígeno prostático

Alfa-fetoproteína

Antígeno del ovario

Antígeno carcinoembrionario