

E.L.I.S.A

ENZYME

LINKED

IMMUNO

SORBENT

ASSAY

# ANTECEDENTES

---

- *Salomon Berson*, desarrollaron el **Radio Immunoassay R.I.A** (radioinmunoensayo)
- Detección de Ags o Acs marcados con radioisótopos  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{57}\text{Co}$ .
- La radioactividad proporciona una señal que indica si un Ag específico o un Ac está presente en la muestra.
- Se buscaron otras alternativas seguras para el medio ambiente, que no perjudicara la salud, de menor costo, sencilla y práctica.
- El **E.I.A Enzyme Immunoassay**, enzimo inmunoensayo se desarrolló independientemente por *Stratis Avrameas* y *Pierce*.
- Usa la unión de Acs a los Ags para identificar y medir sustancias, por colorimetría.
- Primera publicación en 1966, *Ancho* y *Porath*.

# DESARROLLO

El nombre *enzyme-linked immunosorbent assay*, luego abreviado como ELISA, fue acuñado por los investigadores suecos ***Eva Engvall*** y ***Peter Perlmann***, describieron el procedimiento, publicado en 1971.

El mismo año el procedimiento era objeto de otro artículo de los holandeses ***Bauke Klaas Van Weemen & Antonius HWM Schuurs***, *immunoassay using antigen-enzyme conjugates*, publicado en FEBS Letters 15.

Las aplicaciones mas interesantes se iniciaron en el campo de la microbiología y parasitología, por los grupos de Alister Voller y Dennis Bidwell en Londres y Joost Ruitenberg en el Institute of Public Health del estado de Dutch.

Voller y Bidwell introdujeron el uso de microplacas de 96 pocillos.

*Engvall y Perlmann, Suecia 1971*

*Van Weemen y Schuurs, Holanda 1971, 1972*

Premio Biochemische Analytik, Munich, April 1976

De izquierda a derecha, Dra. Eva Engvall (Sweden), Dr. Anton Schuurs (Netherlands), Dr. Peter Perlmann (Sweden), Dr. Bauke van Weemen (Netherlands), and Prof. Johannes Büttner (Germany), President of the German Society of Clinical Chemistry (Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie; DGKC).

# IMPORTANCIA

---

- └ Son utilizados en el diagnóstico médico, la industria de alimentos y el estudio y control del medio ambiente.
- └ En estudios serológicos, hematológicos, endocrinológicos, oncológicos, en los trasplantes, la medicina forense y la antropología.
- └ Con propósitos médicos se han aplicado en la determinación de hormonas y proteínas plasmáticas, antígenos tumorales, drogas, Ag y Ac de microorganismos (parásitos, hongos, bacterias, virus).
- └ Los resultados aportan elementos diagnósticos, información de una enfermedad y coadyuvan en la planificación del tratamiento.

# INTRODUCCIÓN

## los Acs son la base de los inmunoensayos

---

- ┘ Analito es todo lo que se mide en una prueba de laboratorio.
- ┘ En el inmunoensayo, el analito puede ser tanto un Ac como un Ag.
- ┘ Los Acs poseen una alta especificidad y afinidad para un Ag específico. Es esta unión específica lo que permite la detección de analitos por medio de una variedad de técnicas de inmunoensayo.
- ┘ La nomenclatura de los inmunoensayos es confusa, en general el nombre tiene la palabra “inmuno” y posteriormente la palabra que indica el marcador utilizado ( Ej: enzimo) y por consiguiente hace referencia a la metodología utilizada para la detección de la reacción colorimétrica, espectrofotometría.
- ┘ Con el avance científico-tecnológico se han desarrollado “in vitro” una gran variedad de **Acs** contra las mas diversas sustancias biológicas.



# DEFINICIÓN

## E.L.I.S.A

---

Método analítico que depende de la reacción Ag-Ac.

Determinación de la [Ag] o un [Ac], mediante el uso de uno de ellos inmovilizado en fase sólida y el otro en solución.

Cualitativo, cuantitativo.

Dependiendo del diseño: se puede emplear **Ags**, haptenos, o **Acs marcados con una enzima**, para revelar: **Ags**, **Acs**, hormonas o fármacos, presentes en los fluidos corporales.

El producto de la reacción, puede ser detectado y cuantificado mediante un marcador enzimático con un sustrato apropiado.

# Revisiones sobre E.L.I.S.A

<b>REFERENCIAS</b>	<b>APLICACION</b>
<i>Capron et al, 1975</i>	Varias infecciones parasitarias
<i>Bout et al, 1975</i>	Varias infecciones parasitarias
<i>Scharpe et al, 1976</i>	Correlación con otras técnicas serológicas
<i>Voller et al, 1976</i>	Varias infecciones parasitarias
<i>Wisdom, 1976</i>	Revisión de inmunoensayos
<i>W.H.O., 1976</i>	Detallada descripción del método
<i>Bulloch y Walls, 1977</i>	Evaluación de parámetros
<i>Ruitenbergh et al, 1977</i>	Aplicación a varias infecciones parasitarias
<i>Voller et al, 1977</i>	Comparación con el RIA
<i>Voller et al, 1977</i>	Revisión de kits comerciales
<i>Walls y Palmer, 1978</i>	Manual de técnicas
<i>Nakamura et al, 1979</i>	5 reportes sobre como hacer



# USOS EN PARASITOLOGÍA

---

PARASITOS	DETECCION	REFERENCIAS
<i>Plasmodium falciparum</i>	Acs en humanos	<i>Voller et al, 1974</i>
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Acs en humanos	<i>Voller et al, 1975</i>
<i>Leishmania donovani</i>	Acs en humanos	<i>Edrissian y Darabian, 1978</i>
<i>Toxoplasma gondii</i>	Acs en humanos	<i>Capron et al, 1975</i>
<i>Entamoeba histolytica</i>	Acs en humanos	<i>Bos et al, 1975</i>
<i>Schistosoma mansoni</i>	Acs en humanos y animales	<i>Capron et al, 1975</i>
<i>Fasciola hepatica</i>	Acs en humanos	<i>Carlier et al, 1979</i>
<i>Echinococcus granulosus</i>	Acs en humanos	<i>Bout et al, 1975</i>
<i>Trichinella spiralis</i>	Acs en cerdos	<i>Ruitenbergh et al, 1974</i>
<i>Toxocara canis</i>	Acs en monos	<i>Ruitenbergh et al, 1977</i>

# PRINCIPIO BÁSICO

---

## E.L.I.S.A

- ┌ De la reacción consiste; al suero problema se le agrega un conjugado que son anticuerpos dirigidos contra anticuerpos humanos o antígeno, los cuales se unirán a una enzima.
- ┌ Las enzimas son capaces de modificar al sustrato en presencia de un cromógeno produciendo un producto coloreado que es detectado visualmente o por un espectrofotómetro.

# VENTAJAS I

---

- ┌ Luego de 35 años mantienen vigencia como procedimiento analítico de gran sensibilidad y especificidad, sencillo, bajo costo, reproducible y adaptable a las características de cualquier laboratorio.
- ┌ Es versátil, consigue mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre.
- ┌ Pueden detectar sustancias en el orden de los nanogramos y picogramos por mililitro.
- ┌ Se han propuesto y desarrollado diferentes métodos de amplificación de la señal (luminiscentes, cascadas enzimáticas) que han permitido elevar la sensibilidad a la obtenida en el radioinmunoensayo hormonal.
- ┌ Automatización.

# VENTAJAS II

---

- ┌ Poca cantidad de muestra, suero problema (  $\mu\text{l}$  )
- ┌ Las enzimas son de menor costo y seguras para el operador.
- ┌ Menor tiempo
- ┌ Mas estables; mayor período de validez.
- ┌ Pureza, estabilidad y cantidad del Ag
- ┌ Pureza y calidad del Ac conjugado
- ┌ Tipo y calidad de la placa
- ┌ Sustrato
- ┌ Calidad de los reactivos y buffer

# CLASIFICACIÓN

# DETECCIÓN

---

- └ DIRECTOS: se usan para la detección de antígenos.
- └ INDIRECTOS: para la detección de anticuerpos.
- └ En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un **anticuerpo primario anti-antígeno y uno secundario anti primario marcado (ELISA indirecto)**.
- └ Permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario.

# SOportes

---

Heterogéneos u homogéneos según requieran o no la separación de las fracciones libres y ligada antes de realizar la medida de la actividad enzimática.

## 1. HOMOGÉNEO

Se usan para detectar pequeños analitos: hormonas, medicamentos o drogas de abuso.

No requieren la separación de la unión Ac-Ag\* del Ag\* libre, generalmente son más fáciles y más rápidas de realizar.

## 2. HETEROGÉNEO E.L.I.S.A

Se desarrollan sobre soporte sólido

Se usan diagnóstico de enfermedades infecciosas.

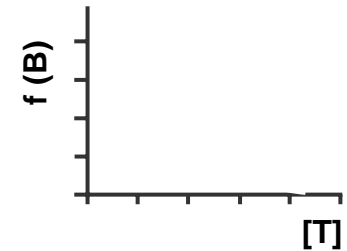
Requiere de separación entre la fracción libre y ligada.

# DISEÑOS

## COMPETITIVO

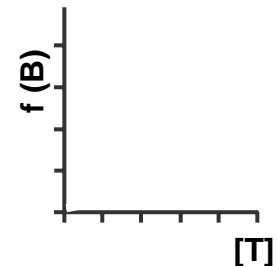
- ┌ Con reactivo limitante; para dosificar partículas pequeñas con relativa pureza en una muestra y pueden ser marcados con una enzima.
- ┌ Detectan Acs específicos independientemente de su isotipo.

Curva dosis-respuesta



## NO COMPETITIVO

- ┌ También llamado inmunométrico “reactivo en exceso”
- ┌ Con reactivo en exceso; son los más utilizados en inmunopatología de las enfermedades infecciosas.
- ┌ Diseñados para detectar tanto Ags como Acs.
- ┌ La sigla E.L.I.S.A suele usarse indistintamente para ensayos competitivos o de exceso de reactivo. En general los distintos marcadores aportan su variedad a los nombres de los inmunoensayos y no suelen aceptarse demasiado las reglas de nomenclatura.





E.L.I.S.A

**HETEROGENEO**

# CARACTERÍSTICAS

---

- ┌ Pueden inmunométricos o de tipo sandwich.
  - ┌ La separación de la fracción del Ag libre al unido se consigue sobre la misma superficie sólida con la adición de una solución de lavado.
  - ┌ Acs utilizados
- Sensibilidad: capacidad del test de identificar individuos afectados.
- Especificidad: identifica individuos no afectados

**POLICLONALES**  
**Mayor sensibilidad**

**MONOCLONALES**  
**Mayor especificidad**

# VARIABLES DEL ENSAYO

# VARIABLES

---

- ┌ FASE SÓLIDA
- ┌ ADSORCIÓN
- ┌ INMUNORREACTIVOS
- ┌ ENZIMAS
- ┌ LAVADOS
- ┌ TEMPERATURA

# FASE SÓLIDA

---

## **SE PUEDEN UTILIZAR DOS TIPOS DE SUSTANCIAS**

- └ Las que favorecen la adsorción física (por fuerzas electrostáticas) de las moléculas de A<sub>g</sub>s o A<sub>c</sub>s: poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, nylon y silicona.
- └ Las que permiten la fijación covalente de esos reactivos: acrilamida, celulosa y isotiocianato.
- └ Los mejores resultado se obtienen con el **poliestireno** y el **polivinilo**, por su **transparencia, rigidez y propiedades adsortivas, tienen gran afinidad por las proteínas.**
- └ Tubos, **placas de microtitulación**, éstas requieren menor cantidad de reactivos, muestra y son aptas para la automatización.

# INMUNORREACTIVOS

---

## CLASIFICACIÓN

- ▮ **SOLUBLES:** proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos.
- ▮ **PARTICULADOS:** células.

# SOLUBLES

---

- ┌ Los mas utilizados son las proteínas, pero también se pueden utilizar : carbohidratos, glicoproteínas, nucleoproteínas, ácidos nucleicos, etc, unidos a la fase sólida.
- ┌ El método mas empleado para fijar proteínas a fase sólida es la adsorción.
- ┌ También se ha utilizado la unión covalente para disminuir las perdidas por lavado durante el procedimiento del E.L.I.S.A.
- ┌ Otra variante es la adsorción-fijación, en la que la proteína adsorbida es fijada utilizando glutaraldehido.

# ADSORCIÓN

---

- ┌ Las moléculas que se adhieren con facilidad y regularidad a los polímeros, son: proteínas, lipoproteínas, glicoproteínas, algunos lipopolisacáridos y el ADN desnaturalizado.
- ┌ La unión que se establece entre fase sólida-Ag-Ac es de tipo físico, produciéndose una reacción de **equilibrio entre las porciones fija y libre del Ag.**
- ┌ En el curso de la reacción ocurre una liberación gradual del material adherido, lo que puede modificar significativamente al sistema.
- ┌ Se minimizan estos cambios, **estandarizando la adsorción, concentración de reactivos, pH, tiempo de incubación y temperatura.**



# REACTIVOS

## ANTÍGENOS

---

- ┌ Una de las dificultades es la obtención del Ag adecuado.
- ┌ Por su sensibilidad, es necesario contar con Ag purificados y estables que aseguren la reproducibilidad.
- ┌ Los Ags parasitarios en general son mezclas complejas de macromoléculas inmunogénicas, entre las que se hallan Ags específicos y sustancias antigénicas que provienen del medio de cultivo o del huésped.
- ┌ La purificación de Ags ha mejorado sustancialmente con el empleo de la ingeniería genética, AcMo y sueros monoespecíficos.
- ┌ Las concentraciones óptimas del Ag se determinan en cada lote en base a titulaciones, tanto del Ag, Acs, y conjugados enzimáticos.

# MARCADORES

---

- |  |                     |
|--|---------------------|
| └ Enzimáticos                          | Espectrofotometría  |
| └ Fluorescentes (Fluoroinmunoensayo)   | Fluorescencia       |
| └ Ligandos (biotina, Avidina)          | Quimioluminiscencia |
| └ Luminiscentes<br>(Luminoimunoensayo) | Electro-química     |
| └ Partículas (liposomas)               |                     |

# ENZIMAS

---

- ┆ Actividad específica.
- ┆ Pureza
- ┆ Estabilidad
- ┆ Solubilidad
- ┆ Fácil medición y detección
- ┆ No se reduce la actividad por la conjugación
- ┆ Bajo costo.
- ┆ Estables en amplio intervalo de condiciones del ensayo.
- ┆ Con grupos funcionales adecuados para su unión a Ac o Ag.

ENZIMA	SUSTRATO	TAMPÓN
<p>Peroxidasa de rábano <i>E.coli</i></p>	<p><b>OPD</b></p>	<p>10 mg/25 mL de tampón citrato sódico 0.15 M pH 5; añadir peróxido de hidrógeno al 30%.</p>
	<p><b>TMB</b></p>	<p>2.5 mg/250 microL de DMSO; hasta 25 ml con tampón citrato sódico 0.1M pH 6; añadir 5 microL de peróxido de hidrógeno 30%</p>
<p>Fosfatasa alcalina <i>E.coli</i></p>	<p><b>PNPP</b></p>	<p>(A) 4 mg de fosfato de naftol en 200 microL de dimetilformamida en un tubo de vidrio, (B) 10 mg de sal Fast Blue BB/ 10 ml de tampón Tris 0.05M pH 9.2 - 2 mM cloruro de magnesio. Mezclar A + B y filtrar.</p>
	<p><b>NAPR</b></p>	<p>(A) 4 mg de fosfato de naftol en 200 microL de dimetilformamida en un tubo de vidrio, (B) 10 mg de sal Red BB/ 10 ml de tampón Tris 0.05M pH 9.2 - 2 mM cloruro de magnesio. Mezclar A + B y filtrar.</p>
<p>Ureasa</p>	<p><b>BP</b></p>	<p>8 mg/1.48 ml de 0.01M NaOH; llevarlo a 100 ml con agua desionizada; añadir 100 mg de urea y EDTA a 0.2 mM; ajustar el pH a 4.8 con 1 mM NaOH o HCl; almacenar a 4°C</p>

# OTROS MARCADORES

<b>MARCADOR</b>	<b>EJEMPLO</b>
<b>RADIOISÓTOPOS</b>	$^{14}\text{C}$ , $^3\text{H}$ , $^{32}\text{P}$ , $^{125}\text{I}$ , $^{57}\text{Co}$
<b>FLUOROFOROS</b>	Fluoresceína, Umbeliferonas, Rodamina, Quelatos de tierras
<b>ENZIMAS</b>	Fosfatasa alcalina, Peroxidasa
<b>QUIMIOLUMINISCENTES</b>	Luminol y derivados, Luciferasa / luciferina
<b>PARTICULAS</b>	Látex, eritrocitos, gelatina
<b>IONES METALICOS</b>	$\text{Au}^{3+}$
<b>OTROS</b>	Cofactores enzimáticos (FAD), Sustratos Enzimáticos Proteínas, Ionóforos

# INCUBACIÓN

---

- ┌ Se trabaja con solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato a un pH alcalino.
- ┌ El tiempo de incubación es variable, depende del ensayo: 1/2 - 1 hora cuando se trabaja a 37 ° C

# LAVADOS

---

- ┌ Luego de la incorporación de cada componente (Ag, Ac, conjugado, sustrato enzimático) , debe efectuarse una serie de lavados con el fin de eliminar el exceso que no se haya fijado (físico – inmunológico) al soporte sólido.
- ┌ Dependiendo del ensayo, habitualmente se realizan entre 3-6, en cada una de las etapas.
- ┌ El tiempo también depende del ensayo
- ┌ Como solución se emplea buffer pH 7,2, que tiene además Tween 20, el cual facilita la separación de las sustancias, actuando como humectante, detergente y fungicida.

# TIPOS DE LAVADO

---

**Solución de lavado: buffer con Tween 20**



# PROCEDIMIENTO MANUAL

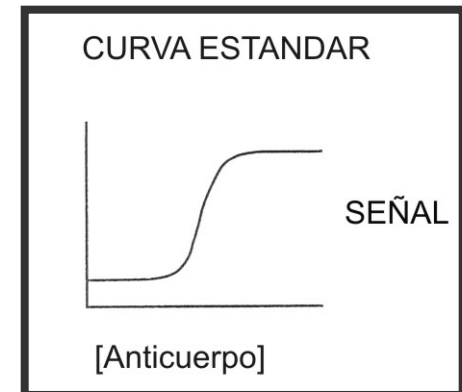
# MÉTODO INDIRECTO

---

- ┌ Se fija el Ag a la fase sólida, agregándose luego la muestra que se quiere investigar el Ac correspondiente.
- ┌ Posteriormente se adiciona una antigamaglobulina fabricada contra el primer Ac **CONJUGADO**.
- ┌ Se incorpora a la reacción una enzima **SUSTRATO** y luego un **CROMÓGENO** de la enzima .
- ┌ La cantidad de Ac presente será directamente proporcional a la cantidad de producto enzimático formado.

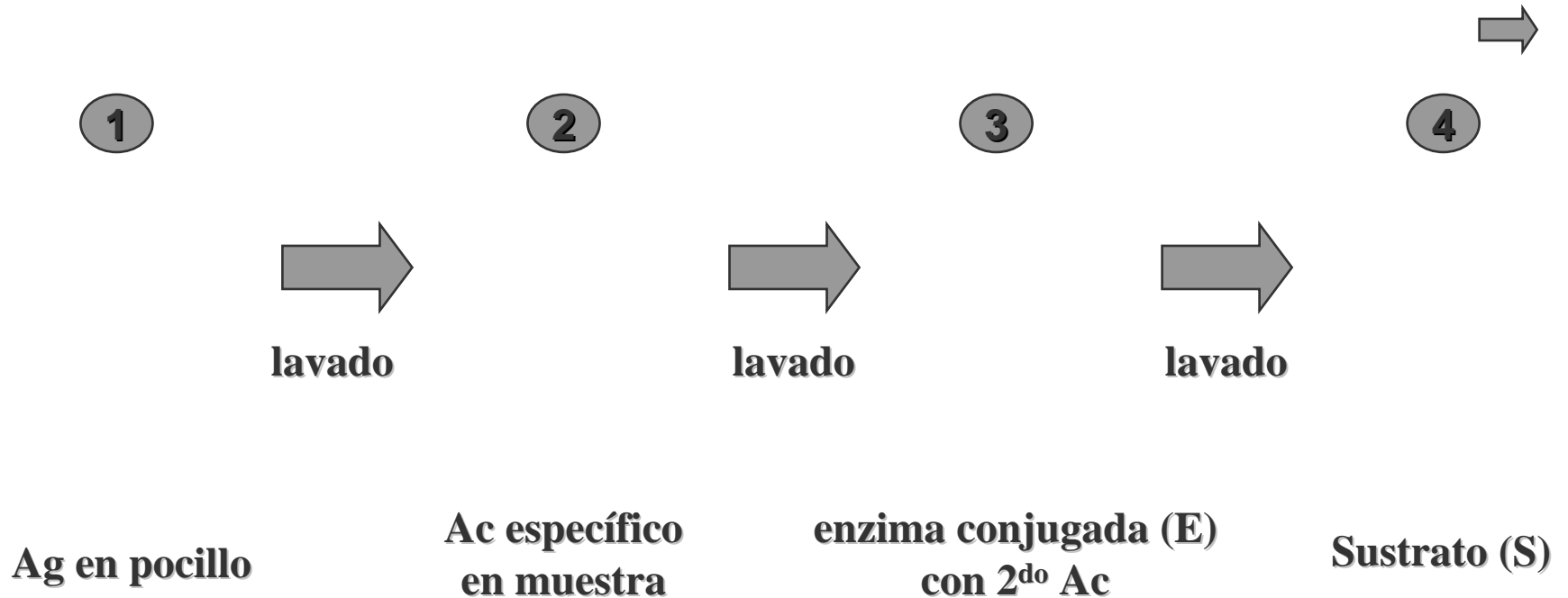
## IMPORTANTE

- ┌ **Antes de iniciar el procedimiento se deberá realizar un protocolo de trabajo.**



# E.L.I.S.A INDIRECTO

## DETECCIÓN DE Acs



# DESDE EL PUNTO DE VISTA ANALÍTICO

---

- ┌ **SENSIBILIDAD:** expresa la capacidad de la técnica para detectar las menores concentraciones posibles de los anticuerpos (o antígenos) buscados.
- ┌ **ESPECIFICIDAD:** expresa la capacidad de esa técnica para diferenciar los anticuerpos específicos (o antígenos) buscados de otros presentes en el material en estudio.

# PASOS

---

- **Dilución de la muestra**
- **Incubación de la muestra**
- **Lavados**
- **Conjugado**
- **Lavados**
- **Sustrato-cromógeno**
- **Solución stop**
- **Lectura**

# Incubación de la muestra

---

+

+

-

-

1

2

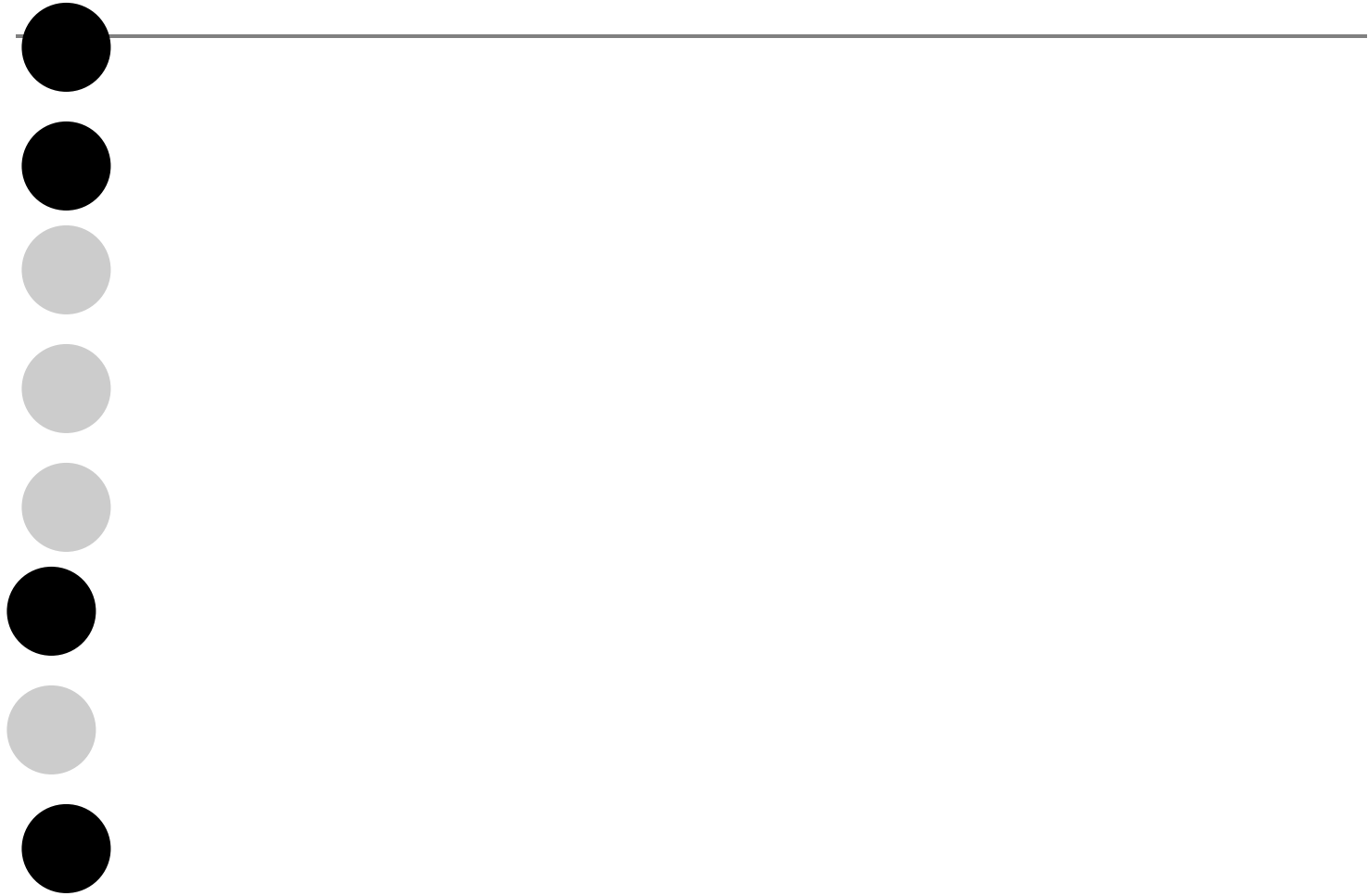
3

4

# Conjugado

---

# Sustrato-cromógeno





# LECTURA

---

# CÁLCULO

- ┌ En los cualitativos se realiza en base a las densidades ópticas de los controles negativos.
- ┌ Los puntos de corte ya están establecidos.

$$\text{Cut off} = \frac{\text{DO (C-)} + \text{DO (C-)} + 0.150}{2} = 0,270$$

$$\text{Índice de muestra} = \frac{0,508}{0,270} = 1,88$$

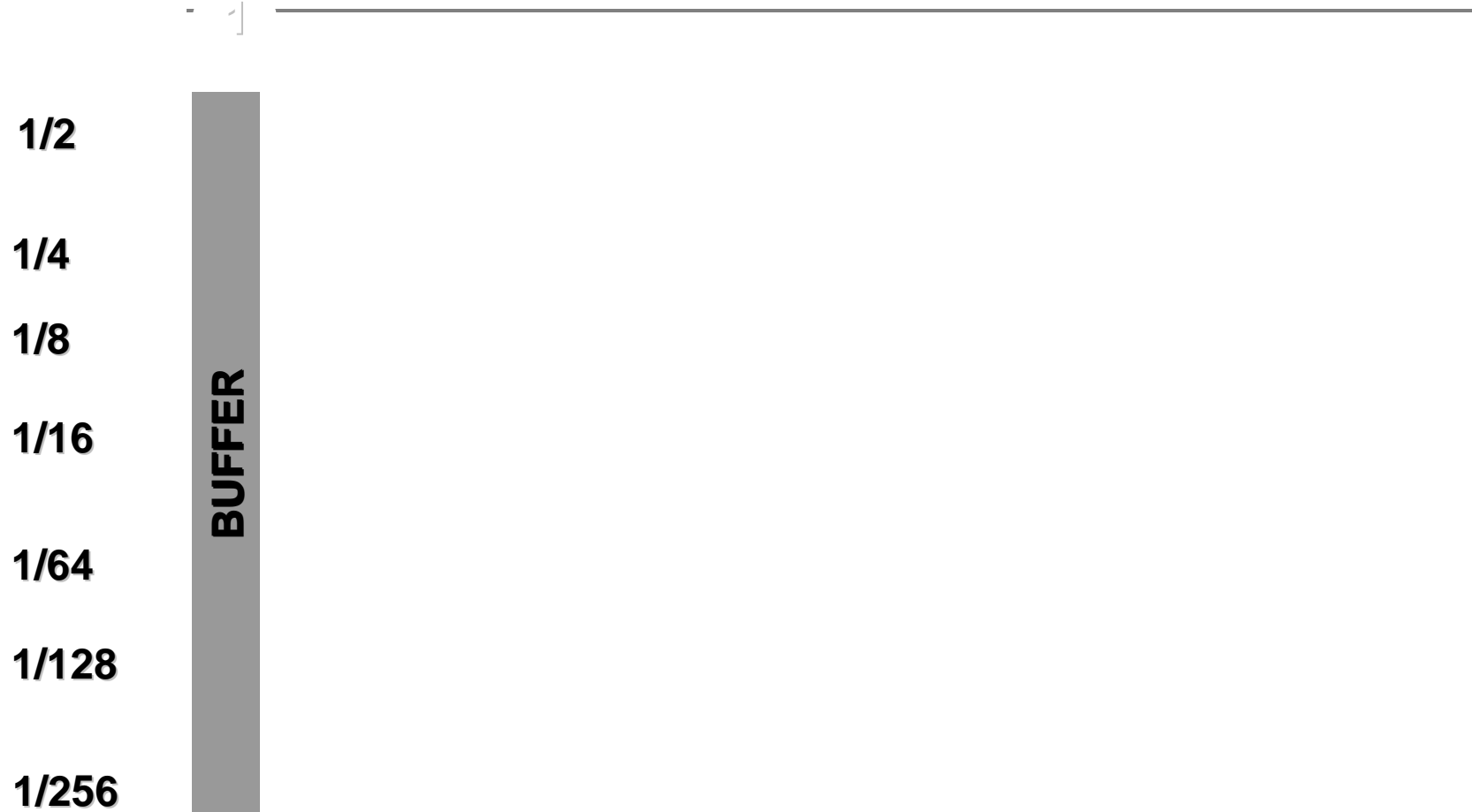
Controles	Valor esperado
Negativo	< 0,3
Positivo	> 0,8
INTERPRETACIÓN	
Negativo	< 0,9
Dudoso	0,9 – 1,1
Positivo	> 1,1

# CUANTITATIVOS

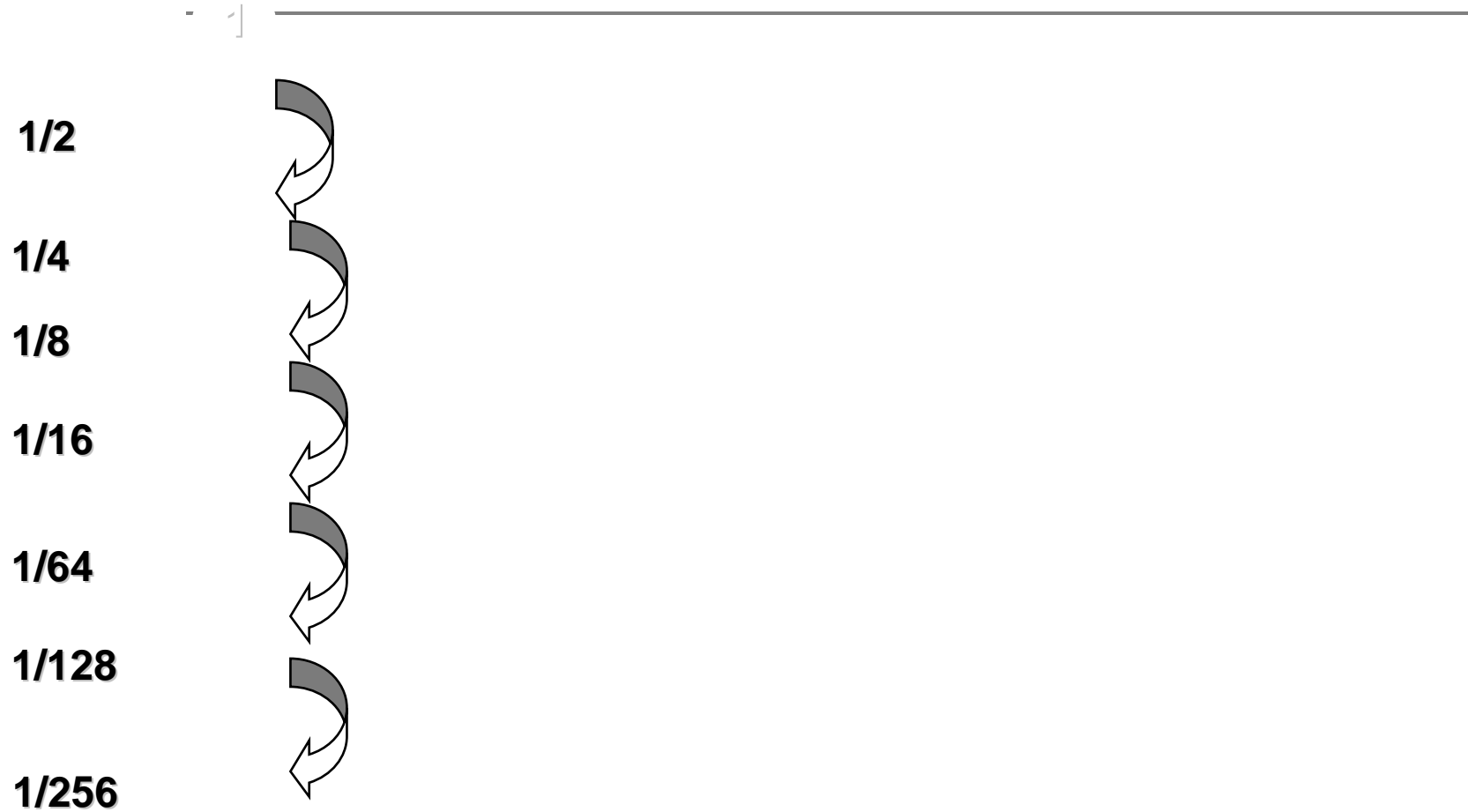
---

- ┆ En los cuantitativos se establece el cálculo en base a los calibradores o estándares. Debe ser homogéneos, puros y químicamente idénticos al analito que se va a medir.
- ┆ Las curvas permiten discriminar entre muestras normales y anormales
- ┆ Deben tener un intervalo razonable.
- ┆ **TÍTULOS:** máxima dilución del suero problema que arroja un resultado positivo (Ej: 1/16; 1/128; 1/2048)
- ┆ **UNIDADES PREDETERMINADAS:** cuando el valor obtenido como resultado es comparado a un patrón predeterminado de densidad óptica, fluorescencia , luminiscencia o concentración conocida de Ac específicos, que expresa el “punto de corte” de la técnica (cutoff o valor límite que diferencia positivos y negativos) (Ej: UI/ml; Index Value; MIU/ml; OD; etc.)

# CUANTITATIVO



# DILUCIÓN



# RESULTADO

- 1 |-----

**1/2** +

**1/4** +

**1/8** +

**1/16** +

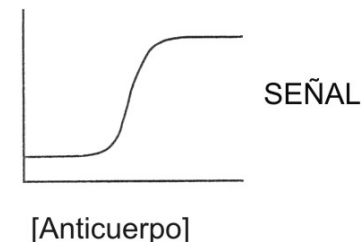
**1/64** +

**1/128** +

**1/256**

# SANDWICH DOBLE ANTICUERPO

CURVA ESTANDAR



## Ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos

- ┌ Se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno.
- ┌ Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo.
- ┌ Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado.
- ┌ Así cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo que lo marca.
- ┌ Tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que otorga el segundo anticuerpo.
- ┌ **Con antígeno:** En este caso el conjugado es un antígeno unido a un cromógeno.

# AUTOMATIZACIÓN



# AUTOMATIZACIÓN

---

- ┌ **Existen equipos electrónicos, que permiten la automatización de los procedimientos y el análisis computacional de los resultados.**
- ┌ **La lectura y medida de la [ Acs-Ag ] se hace mediante colorímetros, fluorómetros, fotómetros, etc.,**
- ┌ **Facilitando la padronización y reproducibilidad de las técnicas, mayor precisión y registro de resultados, mejor cuantificación y valoración de los mismos.**
- ┌ **Disminuye los errores y permite un mejor control de calidad.**

# CONTROL DE CALIDAD

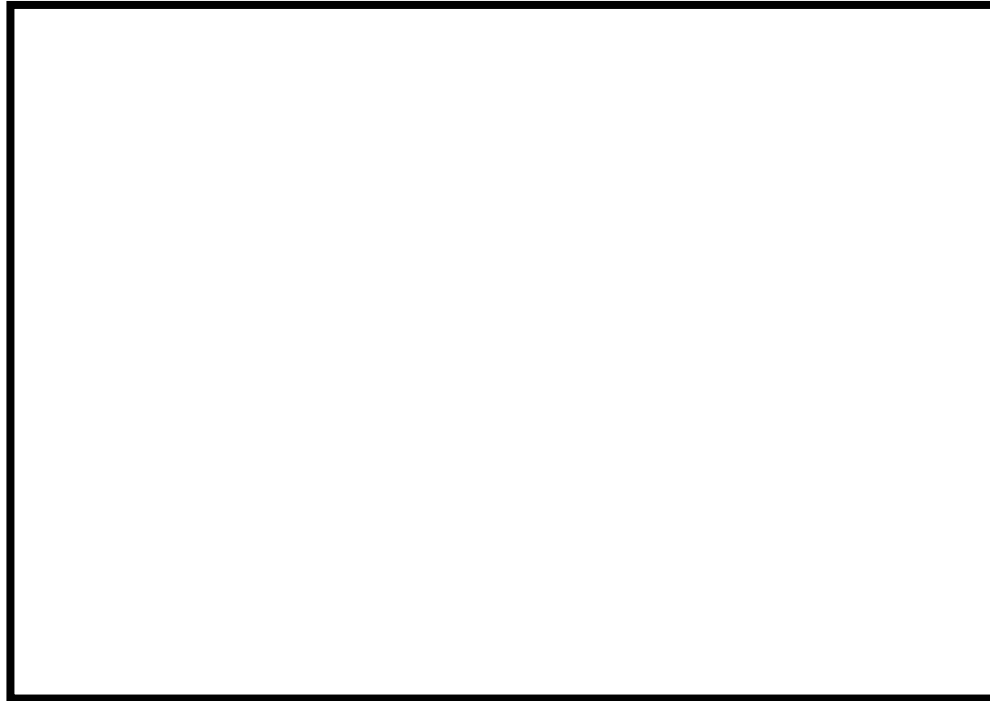
---

- ┌ Es el procedimiento que verifica si todo el proceso de laboratorio se desarrolla de acuerdo con las condiciones preestablecidas
- ┌ Se distinguen dos tipos de control: el control de calidad interno (CCI) y el control de calidad externo (CCE)

# AUTOMATIZACIÓN DE LAVADO

---

En 1980 se lanza al mercado el primer analizador semiautomatizado, Organon-Technika



# ANALIZADORES

---

**IMX**

**AXSYM**

# MEIA

## enzimoimmunoensayo con micropartículas

---

Utiliza partículas de látex submicroscópicas recubiertas con (Ag ó Ac).

- ┌ **Se combinan: muestra + micropartículas + conjugado en la cubeta de reacción.**
- ┌ Una sonda aspira la mezcla del pocillo de incubación y la dispensa en la celdilla matriz (**fibra de vidrio**)
- ┌ Utiliza como **conjugado fosfatasa alcalina** y como **sustrato 4-metilumbeliferilfosfato (MUP)**.
- ┌ El conjugado de fosfatasa alcalina cataliza la disociación del MUP formándose **4-metilumbeliferona (MU) fluorescente.**
- ┌ El complejo se une en forma irreversible a la celdilla de matriz; el lavado de la celdilla elimina los materiales no unidos.
- ┌ El sistema óptico **MEIA mide la tasa de formación de MU.**
- ┌ Se mide la intensidad de **luz fluorescente** emitida por la superficie de la celdilla matrix.

# JIMIX

- ┌ Se carga el carrusel con las muestras y los dispositivos de reacción
- ┌ Se inserta el paquete de reactivos
- ┌ Se presiona la tecla “run”
- ┌ Lee un código de barras del reactivo e identifica la prueba.
- ┌ Combina automáticamente la solución microparticulada con la muestra en el dispositivo de reacción. En este paso el analito es capturado por el Ac sobre la superficie microparticulada.
- ┌ Añade un conjugado con fosfatasa alcalina, que se une al complejo anterior sobre la superficie microparticulada , formando un sandwich “ Ac-analito-conjugado”.
- ┌ Transfiere la solución a una matriz de fibra de vidrio.
- ┌ Añade un sustrato “MUP” que se convierte por la acción de la fosfatasa alcalina en un producto fluorescente.
- ┌ Lee la fluorescencia de la superficie de la celdilla matriz .
- ┌ La lectura es proporcional al analito presente en la muestra.
- ┌ El valor de la concentración se obtiene a partir de una curva de calibración.

# QUÉ ES LA AVIDEZ DE ACS ?

---

**Indica la estabilidad de la malla de unión Ag-Ac.**

**Fuerza con la cual el Ac se une al Ag.**

**Regida por la ley de acción de masas:  $K = K_a/K_d$**

**$K_a$  : constante de la tasa de asociación**

**$K_d$ : constante de la tasa de disociación**

Aumenta con el tiempo  
Permite estimar el tiempo transcurrido desde el inicio de la infección

**AVIDEZ**

**ALTA**

*IgG*

**Selección de linfocitos B**

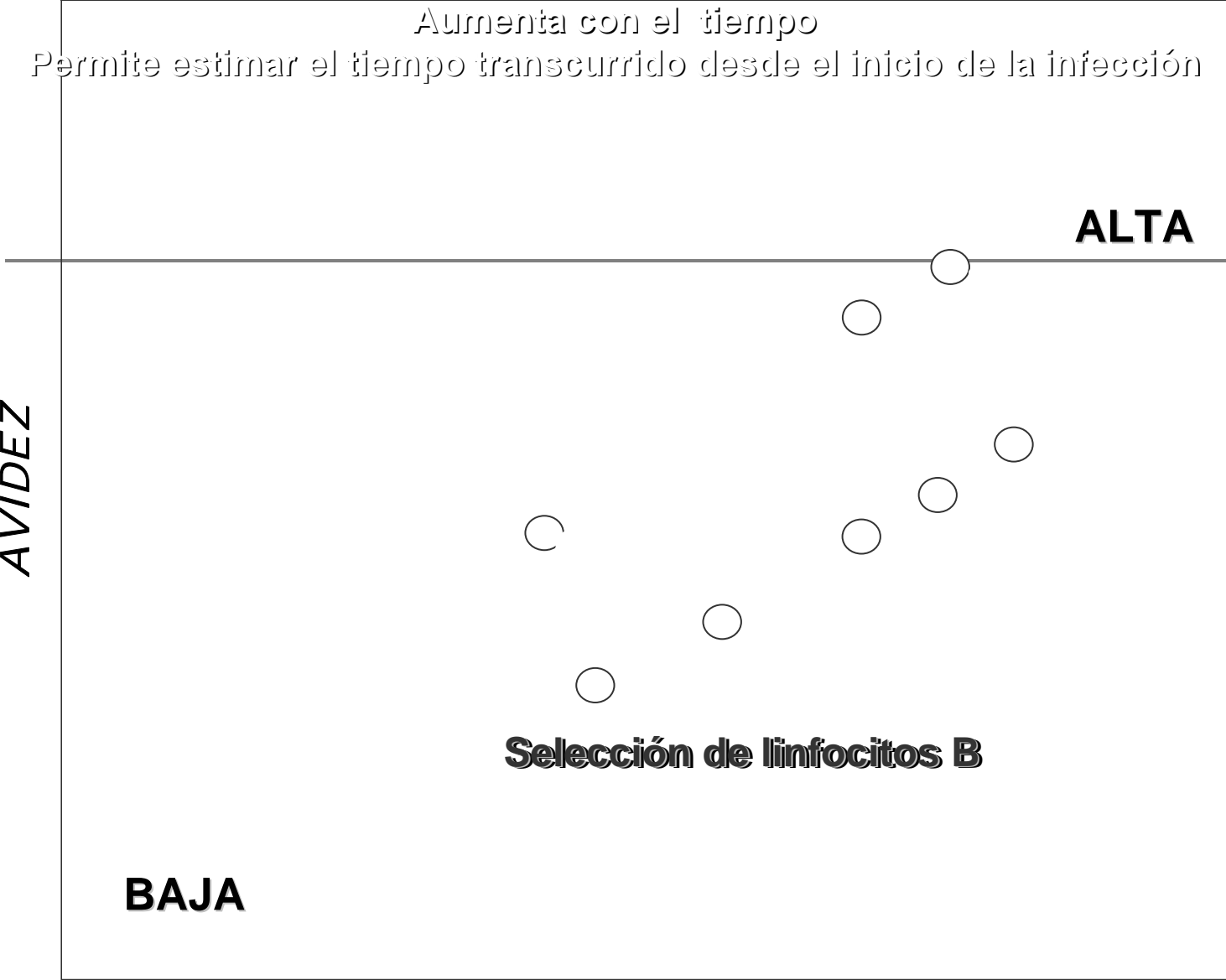
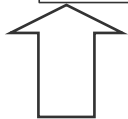
**BAJA**

**Primoinfección**

**Semanas**

**Meses**

**Años**





# INTERPRETACIÓN

---

ÍNDICE	AVIDEZ IgG
$< 0.200$	baja
$0.200 \leq < 0.300$	media
$\geq 0.300$	alta

**Un índice de Avidéz elevado indica una infección de más  
4 – 6 meses de evolución**

---

**$< 0.200$**

**$\geq 0.300$**

# I S A G A

## Immunosorbent Agglutination Assay

---

### FUNDAMENTO

**Ej.; para *Toxoplasma gondii* IgM**

- ┌ Las placas, revestidas con suero anti-inmunoglobulina M humana, captan las IgM del suero (muestra) diluida.
- ┌ Luego de los lavados la presencia de Acs anti *T. gondii* de dicho isotipo, es detectada por su capacidad de aglutinar una suspensión de parásitos (Ag ) que se agrega a posteriori.
- ┌ El ensayo se visualiza como en la técnica de aglutinación directa, es decir un sedimento de parásitos en el fondo del pocillo indica un resultado negativo, mientras que la formación de un velo sobre las paredes se interpreta como resultado positivo.
- ┌ Evita las interferencias de IgM inespecíficas como: antinucleares o factor reumatoideo y también previene de la inhibición competitiva que producen las altas concentraciones de IgG anti *T. gondii* generando falsos positivos y falsos negativos.
- ┌ Mayor sensibilidad y especificidad que la hemoaglutinación.

# CONCLUSIONES

---

- El E.L.I.SA es una herramienta útil que coadyuva al diagnóstico y seguimiento de muchas enfermedades infecciosas.
- No debe utilizarse como única técnica.
- Se debe tener conocimiento de la relación huésped-parásito en la interpretación.
- Cualitativo-cuantitativo
- Sensibilidad-especificidad; Exactitud y precisión.
- Exactitud: el valor verdadero o real de un analito con un margen estrecho de error que no afecta la interpretación del resultado.
- Precisión: la posibilidad de ejecutar repetidas pruebas con la misma muestra y obtener resultados muy poco diferentes
  - La elección una u otra metodología depende también de:  
incidencia /prevalencia
- Recursos de cada laboratorio ; número de muestras a ser procesadas.

# TENER PRESENTE

---

- ┌ En muchos casos la detección de Acs o Ags presenta mayor sensibilidad diagnóstica que el hallazgo del agente.
- ┌ Los Acs circulantes pueden hallarse en grandes cantidades, sin que esto implique un rol protector.
- ┌ Relación huésped-parásito- Evolución de la infección- Tratamientos
- ┌ **Huésped**
  - ┌ Desarrollo del sistema inmunológico
  - ┌ Respuesta individual
  - ┌ Inmunocompetentes / Inmunodeprimidos
- ┌ **Parásito**
  - ┌ Localización
  - ┌ Tipos de Ags: membrana; citoplasmáticos; metabólicos

# BIBLIOGRAFÍA

---

**Lequin, R.M.** Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*. 2005. 51:12 2415–2418

**Voller, A.** The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (E.L.I.S.A). W.H.O 1978. 2 (1)

**van Weemen, B.K.** The Rise of EIA/ELISA. *Clinical Chemistry*. 2005. 51:12.

**Martínez, J.** Inmunología . Bases moleculares y celulares.

**Goers, J.** Immunochemical Techniques. Laboratory Manual.