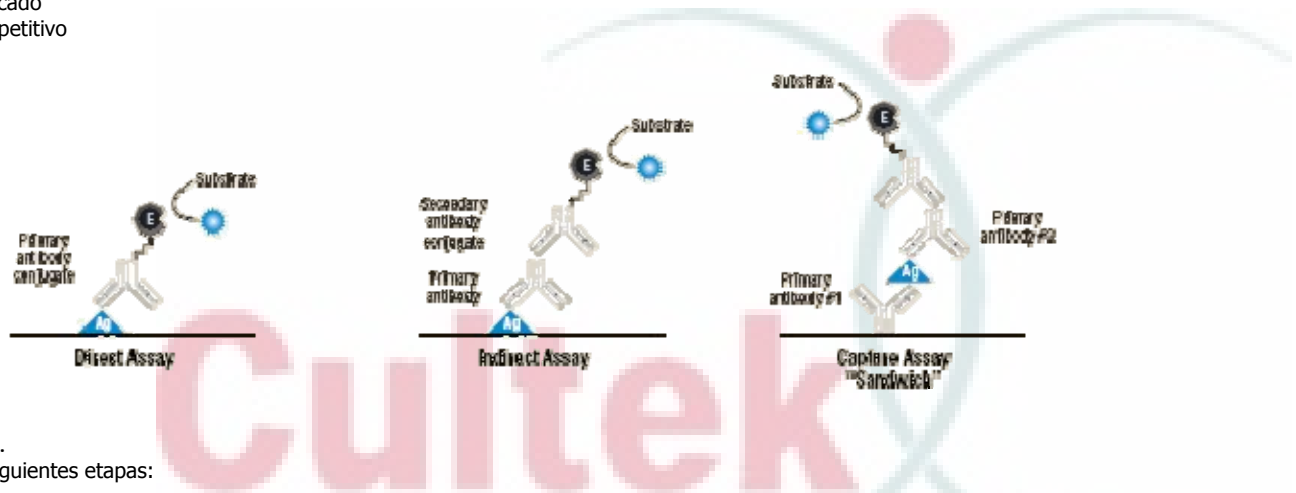


Fundamentos y Tipos de ELISAs.

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

Los diferentes tipos de ELISA son los que se enumeran a continuación:

- Anticuerpos marcados:
 - × ELISA Directo
 - × ELISA Indirecto
 - × ELISA sándwich
 - Doble (DAS)
 - Heterólogo (HADAS)
- Antígeno marcado
 - × ELISA competitivo



ELISA Directo.

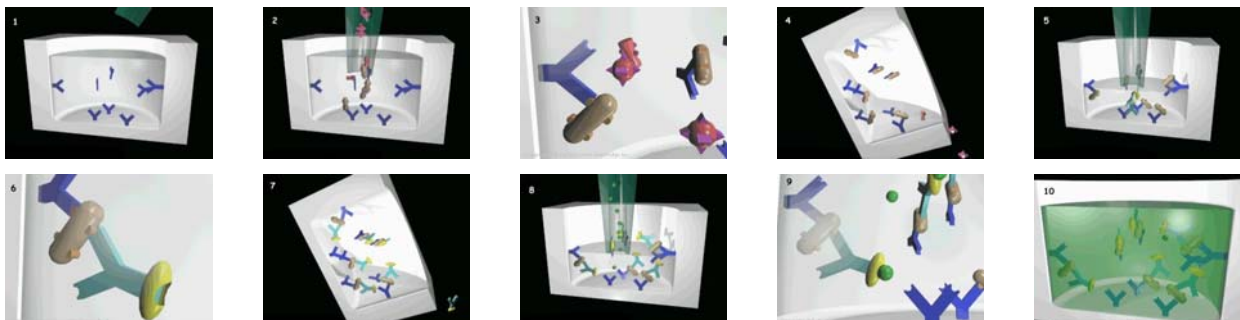
Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble ("tapizado") de antígenos específicos. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición de anticuerpos marcados ("conjugados") con una enzima; si los anticuerpos reaccionan con los antígenos, el complejo quedará solubilizado. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

ELISA Indirecto.

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición del suero problema, de tal forma que sus anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.



Pasos generales de un ELISA.

1. Tapizado del pocillo con el antígeno o anticuerpo.
2. Adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos o anticuerpos.
3. Unión del antígeno o anticuerpo específico al anticuerpo o antígeno tapizado en el pocillo
4. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno o anticuerpo no unido
5. Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima
6. Unión del anticuerpo secundario al antígeno o anticuerpo
7. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida
8. Adición del sustrato
9. Unión del sustrato a la enzima
10. Desarrollo del color

ELISA Sándwich "DAS" (Double Antibody Sandwich).

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición de la muestra problema (extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), de tal forma que si está presente el agente patógeno de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte. Lavado para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados.
- Adición de anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítipo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte) conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

ELISA Sándwich "HADAS".

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición de la muestra problema (extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), de tal forma que si está presente el agente patógeno de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte. Lavado para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados.
- Adición de anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítipo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte), los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos. Lavado para eliminar los anticuerpos que no hayan reaccionado.
- Adición de anticuerpos conjugados con una enzima anti-anticuerpos empleados en el paso anterior. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

ELISA Competitivo.

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición en concentración conocida de una mezcla de antígenos del anticuerpo utilizado en el paso anterior, marcados con una enzima y antígenos desconocidos objeto de estudio. Paralelamente, añadir únicamente antígenos del anticuerpo usado en el paso anterior, marcados con una enzima. Lavar para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado.
- Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado de ambas pruebas y comparar los resultados. Si las lecturas de ambas pruebas son análogas, el antígeno a estudio no tienen nada que ver con los anticuerpos empleados para tapizar el soporte. Si hay diferencia en las lecturas de ambos pocillos, el antígeno objeto de estudio, está relacionado serológicamente con el anticuerpo empleado para tapizar el soporte y la diferencia de densidad óptica, es proporcional a la concentración del antígeno problema en la muestra.

Todos los tipos de ELISAs descritos se pueden resumir en dos grandes grupos:

- ELISAs para detectar antígenos: ELISAs sándwich.
- ELISAs para detectar anticuerpos: ELISAs indirectos.

La fase sólida debe ser de un tipo que permita un fácil manejo (especialmente en los procesos de lavado) y la reproducibilidad de la unión de antígenos o anticuerpos sobre su superficie. Las microplacas de 96 pocillos y un volumen de 350µL son especialmente ventajosas para procesar un elevado número de muestras y un vez tapizadas, el material inmovilizado permanece reactivo mucho tiempo siempre que se mantenga seco y a baja temperatura. Normalmente se utilizan microplacas de poliestireno de fondo plano que pueden adquirirse estériles y con o sin tapa.



Microplacas de poliestireno de 96 pocillos

Las técnicas de ELISA se realizan mediante la adición secuencial de todos los reactivos necesarios separados por etapas de lavado. Cada una de las operaciones puede realizarse manualmente con micropipetas o con equipamiento para la automatización de todas y cada una de las etapas. Esta completa automatización se justifica por la necesidad de procesar y analizar un gran número de muestras y necesitar una elevada repetibilidad de resultados.



Lavador de placas de 96 pocillos



Lector de placas de 96 pocillos

Adsorción de antígenos y anticuerpos ("tapizado").

Los métodos empleados son dos fundamentalmente:

- Dilución del antígeno o anticuerpo en tampón carbonato (pH 9,6) e incubación posterior durante 3h a 37°C o 16h a 4°C.
- Tratamiento a 40-50°C en tampón fosfato (PBS) o en agua fisiológica tamponada pH 7,2-7,4 hasta desecación.

Solución de lavado.

Solución salina con Tween 20 como agente tensioactivo:

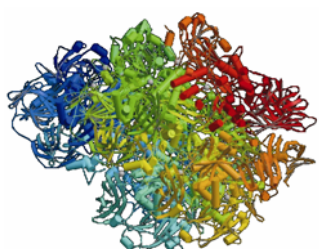
ClNa	8,5gr
Tween 20	0,5mL
Agua destilada	1000mL

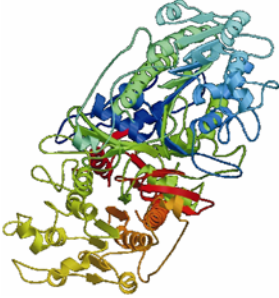
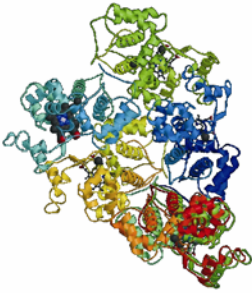
Conjugados.

La enzima escogida como marcador debe unirse fácilmente a antígenos y anticuerpos, encontrarse en estado puro a un precio razonable y tener un sustrato cromogénico o fluorogénico conveniente y de fácil preparación. Las enzimas más utilizadas son fosfatas alcalina, peroxidasa de rábano y β-galactosidasa; a continuación se muestra una tabla con las ventajas y desventajas de cada una así como los sustratos que se emplean con cada una de ellas.

Las operaciones de marcado o conjugación, llevan implícitas dos etapas:

- Purificación de los anticuerpos a partir de un antisuero bruto mediante una precipitación generalmente salina de las proteínas del antisuero, seguida de una diálisis y purificación de la fracción de anticuerpos mediante filtración molecular, cromatografía o separación en gradiente de densidad mediante ultracentrifugación. Finalmente, se suele concentrar los anticuerpos purificados y ajustarlos a una dosis de 1mg/mL.
- Marcado de los anticuerpos con la enzima mediante el uso de un agente puente que normalmente suele ser el glutaraldehído o el del m-periodato sódico (apenas existen diferencias entre ellos en cuanto a los resultados finales).

		VENTAJAS	DESVENTAJAS
β-galactosidasa		<ul style="list-style-type: none"> • Incrementa su tasa de reacción en presencia de alcoholes. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sufre inhibición inducida por anticuerpos. • Tetrámero de 300kDa. • Frecuentemente causa impedimento estérico.
		SUBSTRATOS	
		Producto insoluble	Producto soluble
			<ul style="list-style-type: none"> • MUG (fluorescente) <ul style="list-style-type: none"> ☑ λ_{em}=440nm • AMPGD (luminiscente)

		VENTAJAS	DESVENTAJAS
Fosfatasa alcalina		<ul style="list-style-type: none"> • Estable cuando se almacena y manipula adecuadamente. • Puede almacenarse a +4°C durante más de 6 meses. • Disponible como enzima libre o como conjugado. • Más estable que la peroxidasa. • Pequeño tamaño (\approx 86kDa). • Amplia variedad de sustratos comerciales disponibles. 	<ul style="list-style-type: none"> • Se inactiva por agentes quelantes, la acidez y los fosfatos orgánicos. • Menor relación de conjugación que la peroxidasa. • Necesita tampones específicos. • Puede causar impedimento estérico. • Más cara que la peroxidasa.
		SUBSTRATOS	
		<p>Producto insoluble</p> <ul style="list-style-type: none"> • BCIP/NBT 	<p>Producto soluble</p> <ul style="list-style-type: none"> • p-NPP: <ul style="list-style-type: none"> ☑ Amarillo: $\lambda=405-410\text{nm}$ • 4-MUP (fluorescente) <ul style="list-style-type: none"> ☑ $\lambda_{\text{ex}}=360\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}}=440\text{nm}$ • AMPPD (luminiscente)
		VENTAJAS	DESVENTAJAS
Peroxidasa		<ul style="list-style-type: none"> • Estable cuando se almacena y manipula adecuadamente. • Puede almacenarse a +4°C durante más de 6 meses. • Disponible como enzima libre o como conjugado. • Bastante barata. • Pequeño tamaño (\approx 40kDa). • Relación de conjugación 4:1. • No causa impedimento estérico. • Amplia variedad de sustratos comerciales disponibles. 	<ul style="list-style-type: none"> • Incompatible con bastantes estabilizantes (azida sódica, etc.). • La peroxidasa endógena y algunos metales interfieren en su actividad.
		SUBSTRATOS	
		<p>Producto insoluble</p> <ul style="list-style-type: none"> • TMB: <ul style="list-style-type: none"> ☑ Azul: $\lambda=650\text{nm}$ ☑ Amarillo: $\lambda=450\text{nm}$ • DAB • 4CN 	<p>Producto soluble</p> <ul style="list-style-type: none"> • TMB: <ul style="list-style-type: none"> ☑ Azul: $\lambda=650\text{nm}$ ☑ Amarillo: $\lambda=450\text{nm}$ • ABTS: <ul style="list-style-type: none"> ☑ Azul verdoso: $\lambda=405-410\text{nm}$ • OPD <ul style="list-style-type: none"> ☑ Amarillo: $\lambda=490\text{nm}$ • HPPA (fluorescente) <ul style="list-style-type: none"> ☑ $\lambda_{\text{ex}}=320\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}}=404\text{nm}$ • HPA (fluorescente) • Luminol (quimioluminiscente glow) • Polifenoles (quimioluminiscente flash) • Esteres de acridina (quimioluminiscente flash) • Luciferina (bioluminiscente glow)

Actualmente existe otra posibilidad para sustituir el conjugado anti-especie para la detección de IgGs y es la utilización de proteína A o G marcadas con peroxidasa.

Una vez se disponga del conjugado debe ser conservado hasta el momento de su utilización; esta conservación se suele realizar mediante liofilización, congelación a -70°C o filtrado estéril y conservación a -20°C mezclado con igual volumen de glicerol bidestilado estéril.

La búsqueda de la concentración óptima de uso depende ligeramente del tipo de ELISA empleado; para cualquier ELISA que utilice anti-anticuerpos conjugados, se suele probar diferentes diluciones del conjugado (desde 1:100 hasta 1:2000) frente a sucesivas diluciones de antisuero en placas tapizadas con antígeno a concentración idónea. Aquella dilución del conjugado que produzca menor reacción inespecífica (menor color de fondo o "background") con muestras negativas e implique una clara distinción de las muestras positivas, será la óptima. La elección de una concentración de conjugado óptima va completamente ligada a planteamientos económicos en los que se ha de procurar el mayor ahorro del conjugado aún a costa de aumentar el tapizado.

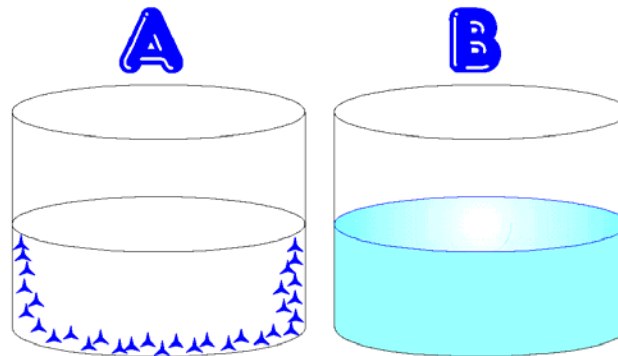
La elección del sustrato es de gran importancia para la estandarización del método ELISA y hay que tener varios factores en cuenta, como son sensibilidad, especificidad, repetibilidad, facilidad de lectura y complejidad de preparación, así como estabilidad después de la parada de la reacción.

Hoy en día existen muchas variaciones en cuanto a los sustratos y, por lo tanto, el método de detección de los complejos antígeno-anticuerpo y así tenemos sistemas de detección colorimétricos, fluorescentes y luminiscentes que a continuación pasamos a desarrollar:

- **Colorimetría.** Los ensayos colorimétricos dan un producto de reacción coloreado que absorbe luz en el espectro visible, siendo la densidad óptica (DO) del mismo proporcional a la cantidad de producto medido.

Para todos los ensayos enzimáticos, la etapa final es la adición del sustrato enzimático, el cual da lugar a productos de reacción solubles o insolubles y es elegido por su rendimiento cuantitativo de producto de reacción. Para ensayos colorimétricos, la tasa de desarrollo de color es proporcional, dentro de un cierto rango, a la cantidad de conjugado enzimático presente.

Tanto la peroxidasa como la fosfatasa alcalina, tienen sustratos que dan productos de reacción coloreados solubles. La decisión de qué sustrato es el mejor para cada tipo de ensayo, depende de la sensibilidad deseada, los requerimientos de tiempo y el sistema de detección que se vaya a utilizar. Para ensayos que necesitan ser muy sensibles, el sustrato ideal debe producir color intenso con una tasa de reacción muy rápida; sin embargo, para ensayos que requieren un rango dinámico amplio, son deseables sustratos que den producto de reacción en un período de tiempo largo (15-30 minutos) y den un rango de intensidad de color amplio, dependiendo de la cantidad de muestra presente. Para ensayos que se vayan a parar (se vaya a añadir a la reacción, tras una cantidad de tiempo definido, un inhibidor químico que pare el desarrollo de color y permita la detección dentro de un período razonable de tiempo), es necesario la utilización de un sustrato que tenga una tasa de reacción "lenta" (15-30 minutos hasta su finalización); sin embargo, cuando se vayan a realizar ensayos cinéticos de la reacción, debería usarse un sustrato que tenga una tasa de reacción "rápida" (5 minutos o menos).



Aunque muchos son los factores que afectan la medida de la actividad enzimática (temperatura, pH, fuerza iónica, composición del tampón, reducción del sustrato, formación de productos inhibidores, feedback por formación del producto final, desnaturalización de la enzima y, en algunos casos, exposición a la luz), los que más afectan al ensayo, hoy en día, son el tiempo de reacción, la temperatura y la exposición a la luz.

Antes de leer la DO y/o tras la adición de la solución de parada, es importante mezclar completamente el contenido de los pocillos para asegurar el cese por completo de la reacción (ensayos de punto final solamente) y la total dispersión del producto de color. La precisión del ensayo puede ser drásticamente mejorada añadiendo este simple paso al protocolo. El efecto físico que la agitación de la placa antes de la lectura tiene en la DO resultante es muy importante. Los colorímetros de microplaca solamente leen el centro exacto del pocillo, lo cual implica que una placa no agitada tendrá pocillos que se asemejarán más al formato "A" de la figura, ya que, debido a que la disolución del producto de la reacción es lenta, si no es mecánicamente agitada o mezclada, el producto coloreado de la reacción estará concentrado en la superficie del pocillo (donde la enzima está localizada) y el lector no estará midiendo la verdadera DO del pocillo. Cuando sí se mezcla, el producto coloreado es completamente homogeneizado en el pocillo (formato "B" de la figura), y el lector detectará la verdadera DO del pocillo.

Hay varias formas de realizar esta mezcla: hay agitadores de microplaca para 2-4 placas a la vez, de tal manera que esas placas puedan ser agitadas en grupo antes de ser introducidas en el lector; hoy día, muchos, si no la mayoría, de los lectores de microplaca llevan incorporados agitadores que permitan que las placas sean homogeneizadas justo antes de ser leídas. Ambos métodos (agitadores internos o externos), cuando son usados correctamente, pueden tener efectos positivos en la precisión del ensayo.

- **Fluorescencia.** Los inmunoensayos de fluorescencia (ELFIA) son una simple variación de los colorimétricos; la enzima convierte el sustrato en un producto de reacción que emite fluorescencia cuando es excitado a una determinada longitud de onda, siendo las unidades relativas de fluorescencia (fotones de luz emitidos) proporcionales a la cantidad de producto analizado.

En comparación con los métodos colorimétricos, los ensayos de fluorescencia son ligeramente más sensibles y, lo que es más importante, amplían el rango de medida, en oposición al límite de 2,0-4,0 DO impuesto en los ensayos colorimétricos.

Un sustrato fluorogénico es elegido por la cantidad de luz emitida tras su excitación, la cual debería ser proporcional a la cantidad de conjugado enzimático presente. El sustrato debería ser estable a temperatura ambiente y en presencia de luz. Asimismo, el producto de la reacción enzima-sustrato debería tener distintas longitudes de onda de emisión y de excitación, ya que el sustrato, por sí mismo, no debería ser fluorescente.

Los ensayos fluorimétricos están sujetos a distintos problemas que reducen o aumentan la señal inespecíficamente. La detección por fluorescencia es susceptible a cambios en el pH, temperatura, concentración iónica, concentración de detergente, secado, y a la matriz sólida, lo cual puede conducir a distorsión de luz, un elevado background, y fenómenos de "apagamiento" y/o "blanqueamiento". El fenómeno de "light scattering" (dispersión de luz) está ocasionado porque la luz emitida rebota cuando entra en contacto con moléculas, partículas en suspensión o la superficie de la microplaca. Por esta razón, es importante eliminar las burbujas que se puedan formar en los pocillos y utilizar reactivos químicos de elevado grado de pureza. Las placas negras opacas y las tiras de la más alta calidad están diseñadas para reducir esta dispersión de luz, ya que absorben la luz que rebota en la superficie del pocillo y solamente se mide la luz dirigida hacia el detector.

El "background" (fluorescencia de fondo) y/o la autofluorescencia son el principal problema para la realización de ensayos en placas de 96 pocillos. Las fuentes de este background son los propios componentes de la muestra (hemoglobina, bilirrubina, partículas de celulosa, drogas), los componentes de los diluyentes (iones metálicos), el material de la placa (tipo de plástico utilizado) y la contaminación variable (partículas de polvo, huellas digitales). El background puede ser eliminado de tres formas: mediante el diseño del ensayo (dilución de la muestra para ensayos homogéneos y filtrado de los reactivos a través de una membrana de 0,45µm para ensayos heterogéneos), mediante la instrumentación y mediante una estricta limpieza. El fenómeno de "apagamiento" ("quenching") se caracteriza por una reducción

inespecífica de la señal y es causado por la absorción de la emisión por el oxígeno disuelto, por lo que los reactivos pueden ser desgasificados antes de su utilización para eliminar este efecto. El fenómeno de "blanqueamiento" ("bleaching") o "decoloración" ("fading") está también caracterizado por una reducción en la señal, pero está causado por un exceso en el tiempo de excitación. Actualmente, no suele ser un problema debido a la baja energía y corto tiempo de excitación de los fluorímetros actuales.

Otras interferencias que pueden distorsionar las lecturas de fluorescencia incluyen las variaciones de temperatura, la estabilidad de la fuente de luz y el ancho de la banda de excitación. La fluorescencia aumenta cuando disminuye la temperatura, por lo que es importante mantenerla constante en cada ensayo y entre diferentes ensayos, ya que, pequeñas variaciones de un ensayo a otro, pueden ocasionar cambios en la sensibilidad del mismo.

Muchos de los plásticos usados para fabricar placas y tiras son autofluorescentes; por ello, es importante elegir una placa que esté fabricada específicamente para fluorescencia. Estas placas normalmente son negras (aunque las blancas pueden ser usadas para compuestos fluorescentes que emitan luz a longitudes de onda más altas), ya que se reduce significativamente el background (no son autofluorescentes y absorben la luz dispersada) y se eliminan, prácticamente, las contaminaciones cruzadas. Estas placas negras pueden tener fondo opaco o transparente. Las de fondo transparente se utilizan normalmente para ensayos fluorescentes basados en células, lo cual permite su visualización durante el crecimiento de las mismas, al mismo tiempo que reducen la transmisión de luz lateral o la contaminación cruzada durante la detección. Con la llegada de los fluorímetros para placas de 96 pocillos, que son capaces de efectuar lecturas desde el fondo o desde la parte superior del pocillo, estas placas han permitido aumentar la versatilidad asociada con el diseño del experimento, p.e., usando una placa de fondo transparente, se puede realizar un ensayo doble en el que se utilice un anticuerpo marcado con peroxidasa (detectado colorimétricamente con TMB) para la primera parte del ensayo, y otro anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina (detectado fluorimétricamente con 4-MUP) para la segunda parte.

• **Luminiscencia.** Al igual que la fluorescencia, la luminiscencia es una variación del método estándar de ELISA. Una enzima transforma un sustrato en un producto que emite fotones en lugar de dar color visible. La luminiscencia se describe como la emisión de luz por parte de una sustancia, que regresa desde un estado electrónicamente excitado a su estado original. Las diferentes formas de luminiscencia difieren, precisamente, en la forma en que se alcanza dicho estado excitado:

- × **Fotoluminiscencia:** la excitación se alcanza mediante luz de una determinada longitud de onda, es decir, igual que en la fluorescencia.
- × **Bioluminiscencia:** la excitación se alcanza mediante la utilización de un compuesto que emite luz al ser degradado, por ejemplo, luciferina o luciferasa.
- × **Quimioluminiscencia:** la excitación se alcanza mediante una reacción química.

Actualmente, es el método disponible más sensible debido a la posibilidad de multiplicación y amplificación de la señal. Las reacciones de luminiscencia se miden en RLU (Unidades Relativas de Luz), que son típicamente proporcionales a la cantidad de muestra presente.

El sustrato luminiscente debe ser estable a temperatura ambiente durante todo el período que dure el ensayo, y debe ser elegido por su baja luminiscencia de fondo en estado basal ("background"), por su capacidad para producir luz intensa en estado activado, por su capacidad de emitir luz estable durante un período prolongado de tiempo (minutos) y por su disponibilidad comercial (calidad y consistencia).

Existen dos métodos de detección de luminiscencia:

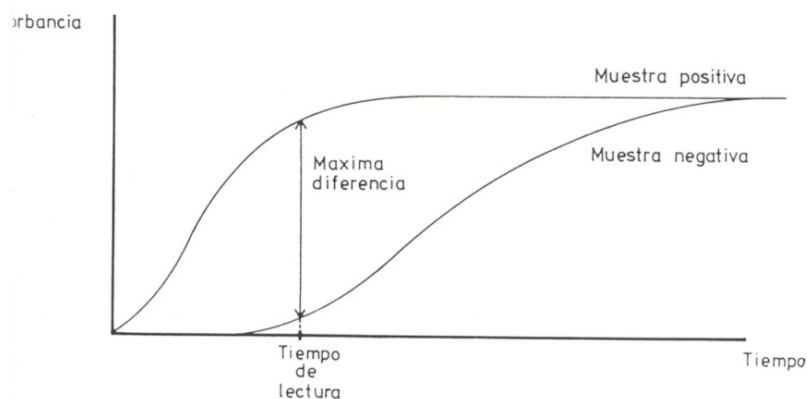
- × **FLASH:** es inestable en la Naturaleza y alcanza una intensidad máxima de luz en segundos o milisegundos, por lo que es necesario comenzar la reacción mientras los reactantes están frente al sistema de detección (fotomultiplicador). Es de capital importancia que el intervalo de tiempo transcurrido entre la adición de los reactivos y el proceso de detección sea siempre constante.
- × **GLOW:** consiste en una serie de estados transitorios secuenciales que originan una señal constante. La luz emitida, a diferencia del color o la fluorescencia, no se acumula, por lo que la ésta debe ser intensa y la reacción enzimática prolongada para obtener suficiente señal.

Los aspectos positivos de este tipo de luminiscencia son: la reacción puede ser iniciada fuera del aparato de detección, por lo que se elimina la necesidad de dispensación interna y mezcla dentro del propio lector, la simplicidad del procedimiento, la elevada sensibilidad, la posibilidad de incrementar la señal y que el procedimiento es muy adecuado para sistemas de placas de 96 pocillos. Además, este tipo de reacción luminiscente puede ser medido usando un luminómetro, capturando la imagen en una película fotográfica o mediante sistemas de análisis de imagen.

Aunque en teoría estas reacciones son estables durante al menos 20 minutos, los resultados entre pocillos y entre diferentes placas son más homogéneos cuando el tiempo de incubación enzima-sustrato es corto (se recomienda efectuar un período de estabilización de 2 minutos tras la adición del sustrato y entonces leer inmediatamente las placas).

Elegir la mejor placa para luminiscencia es crucial para desarrollar un ensayo fiable, y ésta ha de estar diseñada específicamente para luminiscencia. Habitualmente son blancas y opacas, con el fondo transparente u opaco; ambas versiones están diseñadas para reducir contaminación cruzada y el background ocasionado por la composición de la resina blanca. Las placas con fondo transparente se utilizan habitualmente para ensayos luminiscentes basados en células, tales como ensayos de proliferación celular, ya que permiten la visualización de las células durante su crecimiento y también previenen de la transferencia lateral de luz entre pocillos durante el paso de detección. También son útiles para ensayos dobles con un producto colorimétrico para un primer análisis y otro luminiscente para un segundo.

Finalmente, se debe optimizar el tiempo de incubación, realizándose lecturas seriadas hasta encontrar el óptimo, que será aquel en el que se encuentre mayor diferencia de color entre positivos y negativos de referencia. Las reacciones enzimáticas colorimétricas siguen curvas del tipo del que se muestra en la gráfica para muestras positivas y negativas, por lo que existe un tiempo de lectura para el cual la diferencia colorimétrica entre muestras positivas y negativas es máximo.



Variación de la absorbancia en función del tiempo para muestras positivas y negativas y tiempo óptimo de lectura o parada de la reacción.

Lectura e interpretación de los resultados.

La lectura de los resultados puede ser valorada tanto visual como colorimétricamente. A simple vista, pueden ser leídos ciertos ensayos rutinarios en los que no haga falta una cuantificación y no se presenten abundantes casos dudosos (el ojo humano no es capaz de discernir una variación de 0,1 de densidad óptica) ya que dicha lectura visual tendrá el inconveniente de la subjetividad y el de diagnosticar equivocadamente los casos límite. No obstante, evita la adquisición de aparatos relativamente costosos como son los lectores de microplacas.

Una de las grandes ventajas de la técnica ELISA es la posible automatización de la lectura y, por lo tanto, su objetividad. Dicha automatización se puede conseguir con un simple colorímetro o espectrofotómetro de cubeta o con sofisticados equipos de lectura automática de microplacas.

Los resultados finales de la lectura colorimétrica se reflejan numéricamente mediante valores de absorbancia o densidad óptica que se obtendrán a la longitud de onda más adecuada para la coloración final alcanzada.

Aplicaciones del ELISA.

- Patología Animal
 - Enfermedades producidas por parásitos
 - ↳ Babesias y tripanosomas
 - ↳ *Toxocara canis*
 - ↳ *Toxoplasmosis*
 - ↳ Triquinosis
 - Enfermedades producidas por Micoplasmas
 - Enfermedades producidas por bacterias
 - ↳ *Mycobacterium tuberculosis*
 - ↳ Brucelas
 - ↳ Enterotoxinas *Vibrio cholerae*
 - ↳ Estreptococos
 - ↳ Salmonelas
 - Enfermedades producidas por virus
 - ↳ Enfermedad de Aujeszky
 - ↳ Enfermedad de Newcstle
 - ↳ Fiebre aftosa
 - ↳ Leucemia felina
 - ↳ Peste porcina africana
 - ↳ Peste porcina clásica
 - ↳ Rinotraqueitis infecciosa
 - ↳ Rotavirus
 - ↳ Artritis vírica
 - Otras aplicaciones
 - ↳ Hormonas
 - ⊙ Gonadotropina coriónica
 - ⊙ Progesterona
 - ⊙ Testosterona
 - ⊙ Hormonas tiroideas
 - ↳ Cuantificación de inmunoglobulinas
 - ⊙ IgG
 - ⊙ IgE
 - ⊙ IgA
 - ↳ Inmunopatología
 - ⊙ Anticuerpos anti-DNA
 - ⊙ Factor reumatoide
 - ⊙ Inmunocomplejos circulantes
- Patología Vegetal
 - Enfermedades producidas por virus
 - ↳ En frutales
 - ⊙ PPV
 - ⊙ CLSV
 - ⊙ TRSV
 - ↳ En cítricos
 - ⊙ CTV
 - ↳ En patata
 - ⊙ PLRV
 - ⊙ PVY
 - ⊙ PVX
 - ⊙ PVA
 - ⊙ TRV
 - ↳ En cereales
 - ↳ En guisante
 - ↳ En lúpulo
 - ↳ En soja
 - ↳ En ornamentales
 - ↳ En plantas hortícolas
 - Enfermedades producidas por bacterias
 - Enfermedades producidas por Micoplasmas
 - Enfermedades producidas por hongos

Para descargar el archivo pdf sobre la optimización de todos los parámetros de un ELISA pinche sobre el link correspondiente:

- [Optimización de la elección de la superficie de la placa.](#)
- [Optimización del tapizado de la placa con la proteína/anticuerpo de interés.](#)
- [Optimización del paso de bloqueo de los sitios de unión inespecíficos.](#)
- [Optimización de los pasos de lavado para la eliminación de las uniones inespecíficas.](#)
- [Optimización del método de detección: colorimetría, luminiscencia y/o fluorescencia.](#)