

Editorial

Neste mês abordaremos as principais características da metodologia ELISA.

www.centerlab.com

Elisa

O método ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay/ Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima) é um teste imunológico que permite a detecção, qualitativa e quantitativa, de um antígeno ou um anticorpo através de reações enzimáticas. A enzima mais utilizada nestas provas é a peroxidase, responsável em catalisar a reação de desdobramento da água oxigenada (H_2O_2) em H_2O mais O_2 .

A metodologia ELISA se baseia na interação específica que ocorre entre antígeno (Ag) e anticorpo (Ac). Esta especificidade permite a captura da molécula desejada a partir de uma placa com poços sensibilizados com a proteína capaz de se ligar ao analito de interesse presente na amostra. Quando se adquire um kit de ELISA, a microplaca já vem sensibilizada, ou seja, com estas proteínas aderidas à parede da mesma. O procedimento padrão inicial é então aplicar as amostras em estudo na placa, para ocasionar uma coloração, que resultará da reação imunológica.

Segue abaixo, de forma resumida, um esquema geral do procedimento realizado em um ensaio feito para detectar um Ac específico:

1. Sensibilização (Utiliza-se uma placa com poços onde estão aderidos os antígenos de interesse).
2. O soro teste é adicionado na placa, permitindo que os anticorpos específicos liguem-se aos antígenos.
3. Após um período de incubação, a placa é lavada para retirar os anticorpos não ligados.
4. Para detectar os anticorpos ligados aos antígenos é adicionado um reagente marcado com enzima, conhecido como conjugado. Após um período de incubação, a placa é lavada para retirar os conjugados não ligados.
5. É adicionado um substrato cromogênico para detectar a presença da ligação antígeno-anticorpo.

6. Por fim, é adicionada uma solução de parada (H_2SO_4).

7. Leitura fotométrica.

A intensidade da cor desenvolvida pelo substrato é proporcional à quantidade de anticorpos (específicos para o antígeno) presente no soro. A cor medida, em absorbância, pela leitora de microplacas (leitora ELISA) ou pelo equipamento automático utilizado, permite a obtenção do resultado em concentração da proteína presente na amostra. Denominamos este tipo de leitura de quantitativa.

Um outro tipo de leitura que pode ser realizada é a leitura qualitativa, que fornece um resultado "positivo" ou "negativo". Neste caso, também podem ser definidas as amostras "duvidosas" ou "indeterminadas", que devem ser novamente realizadas com uma metodologia diferente para confirmação.

Para obter resultados exatos e confiáveis, as lavagens para retirar os anticorpos, o conjugado e o substrato em excesso, devem ser realizadas cuidadosamente. A velocidade com que a solução de lavagem é dispensada e aspirada da microplaca deve ser controlada, constante e uniforme em todos os poços de reação, porque quando dispensada rapidamente ela pode destruir as ligações já ocorridas. Por outro lado, baixas velocidades de lavagem, não serão eficientes para retirar os agentes que não se ligaram durante o processo, o que pode resultar em altos valores de absorbância.

Os erros mais comuns que ocorrem no ELISA são: (a) erros durante a diluição das amostras, preparação dos reagentes e reconstituição dos calibradores e controles; (b) utilização de ponteiros já utilizados, mal adaptados, obstruídos ou sujas; (c) pipetagem incorreta e inadequada das amostras e dos reagentes; (d) não pipetagem das amostras e dos reagentes; (e) contaminação cruzada de amostras e reagentes;

Elisa

(f) “destruição” do fundo do poço sensibilizado durante a pipetagem; (g) falta de manutenção nos equipamentos; (h) utilização de equipamentos não calibrados; (i) utilização de reagentes de diferentes lotes; e (j) contaminações.

Algumas precauções devem ser tomadas para evitar a contaminação durante a realização de um ensaio: não utilizar reagentes de diferentes lotes, pipetar com cuidado para não espirrar amostra ou reagente de um poço para outro, não reutilizar ponteiros, utilizar frascos limpos e secos para a preparação dos reagentes, não utilizar água de má qualidade, não utilizar produtos vencidos, armazenar os reagentes na temperatura adequada e retornar os reagentes para 2 a 8°C imediatamente após o uso.

Esta metodologia possui diversas aplicações nas mais variadas áreas e, dentre os vários testes imunoenzimáticos, o tipo não competitivo, conhecido como sanduíche, é bastante utilizado como método de triagem no laboratório clínico.

Os testes imunoenzimáticos são muito utilizados na área de análises clínicas, por apresentarem as seguintes vantagens: simplicidade de execução, alta sensibilidade e especificidade, conveniência como métodos de triagem, reagentes de fácil obtenção, uso de pequenas quantidades de reagentes (ex. antígeno), uso opcional de equipamentos e baixo custo.

Referências:

FERREIRA, A. W; ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico laboratorial das doenças infecciosas e auto imunes. 2ª Ed. Editora Guanabara Koogan. 2001.

Site: <http://www6.ufrgs.br/favet/imunovet/testimun/elisa.htm>
Acesso em: 05/2009.

Site: <http://www.micronal.com.br/artigostecnicos/elisa.htm>

Acesso em: 05/2009.

Site: <http://www.portal.ufba.br/>

Acesso em: 05/2009.

Confira os equipamentos e os produtos que a Centerlab oferece da linha ELISA!

Produtos de qualidade que garantem confiabilidade e segurança na realização dos exames e liberação dos resultados!

Consulte nossa linha completa de testes Elisa!



Linha Labtest

Anti-HBc
Anti-HBc IgM
Anti-HBe
Anti-HBs
Chagas
CMV IgG
CMV IgM
HBeAg
HBsAg
HCV
HIV-1+ 2
HSV 1 IgG
HSV 2 IgG
HSV IgM
Rubéola IgG
Rubéola IgM
TOXO IgG
TOXO IgM



Fale Conosco

É proibida a cópia, divulgação ou reprodução deste conteúdo sem autorização prévia e formal da equipe de Assessoria Científica - Centerlab-MG.

MATRIZ - MG: Av. Nossa Senhora de Fátima, 2343, Carlos Prates, BH - CEP 30.710-020 - TEL:(31) 2128-6000

FILIAL - ES: Av. Fernando Ferrari, 3.357, Jabour - Vitória - CEP 29.075-053 - TEL:(27) 3327-4266

MSN: assessoriacenterlab@hotmail.com

E-mail: assessoria@centerlab.com.br