

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA E MEDICINA LEGAL

IMUNOLOGIA (MED 194) 2000.2 MS

ELISA

ELISA ou **Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay** é o método imunológico atualmente mais usado tanto na prática médica como também em pesquisa. O uso gradativamente generalizado deste método se deve:

1. Alta Sensibilidade
2. Especificidade
3. Versatilidade
4. Fácil execução
5. Reagentes de fácil obtenção
6. Uso de pequenas quantidades de reagentes (ex. antígeno)
7. Uso opcional de equipamentos (Espectrofotometro)
8. Baixo custo

Como todo método imunológico tem por objetivo tornar visível ou possível de leitura a reação do antígeno com o anticorpo. Na reação básica o antígeno é fixado a um suporte sólido onde o anticorpo é adicionado para reagir e em seguida um anticorpo secundário ligado a uma enzima é adicionado. Após as lavagens necessárias a reação positiva é visualizada com a adição do substrato da enzima e uma substância cromógena.

O método ELISA pode ser **direto** ou de **captura**. Estes tipos podem ser ainda preparados para fornecer resultados de tipo **qualitativo, semi quantitativo e quantitativo**.

Substitui com grande vantagem o método de Radio imuno ensaio.

É usado para diagnóstico de doenças como também para dosagem de antígeno, anticorpo e outras substâncias que ocorrem em diminutas concentrações como é o caso das citocinas.

Material básico:

1. Placa de microtitulação plástica (96 poços)
2. Antígeno
3. Soro
4. Anticorpo secundário ligado a enzima (Peroxidase, Fosfatase Alcalina, etc.)
5. Substrato enzimático (H_2O_2 , p-nitro fenil fosfato)
6. Cromógeno (OPD-ortofenilenodiamino)
7. Tampão
8. Espectrofotometro (opcional)

Procedimentos:

a) método direto qualitativo

1. Sensibilizar a placa de microtitulação colocando em cada poço 100 ul de antígeno (1 a 10 ug) e incubando 1-3 horas a 37 °C.
2. Lavar a placa
3. Adicionar a dois poços um soro controle negativo e a outros dois um soro controle positivo (ambos em uma concentração padronizada ex. 1/100
4. Adicionar aos outros poços (em duplicata) os soros testes na mesma diluição.
5. Incubar 1 hora
6. Lavar 3 vezes com Salina tamponada com Fosfatos (PBS)
7. Adicionar o anticorpo secundário na diluição padronizada (Ex. Soro de Coelho anti IgG humana ligado a Peroxidase)
8. Incubar 1 hora
9. Lavar 3 vezes com PBS e adicionar a solução reveladora composta de Água oxigenada e OPD.
10. Incubar por 20 minutos e interromper a reação adicionando 20 ul de Acido Sulfurico 8N.
11. Fazer a leitura visual comparando com os controles negativos e positivos anotando os resultados positivos apresentando coloração castanha e os negativos sem coloração.

b) método semi quantitativo

Neste método, em vez de se usar apenas 2 poços onde se coloca o soro numa concentração definida, usa-se 6 ou mais poços onde se coloca o soro em diluições seriadas. O resultado é expresso como soro positivo até a diluição de: 1/X (ex. 1:640)

c) método quantitativo

Neste método usa-se um soro com concentração conhecida de anticorpos (3 a 4 concentrações conhecidas) como controle e as densidades óticas lidas em um espectrofotometro são usadas para traçar uma curva padrão (D.O. versus Concentração) As concentrações dos soros testes são determinadas comparando as DO obtidas com a curva.

ELISA de captura:

Neste tipo usa-se um anticorpo monoclonal específico contra uma determinada substância para sensibilizar a placa. A reação vai determinar a presença de um antígeno ou de uma substância no soro teste. O resultado pode ser também apenas qualitativo, semi quantitativo e quantitativo. A dosagem de citocinas, por exemplo, é feita por este método.