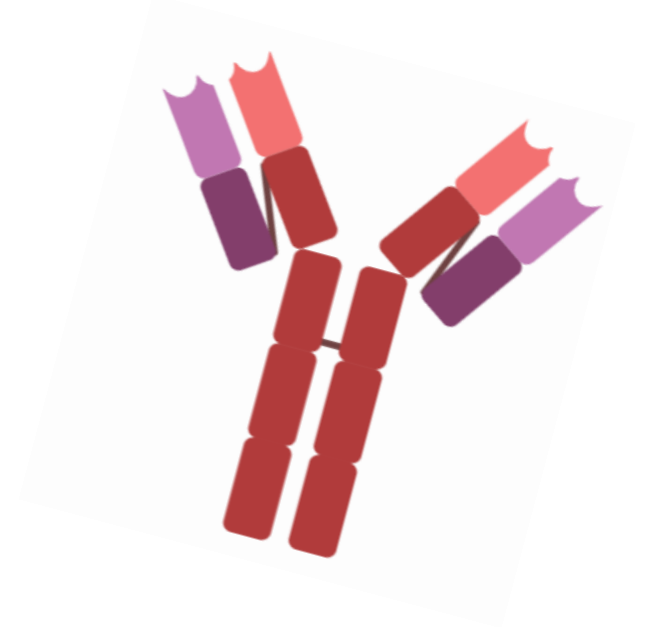


ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

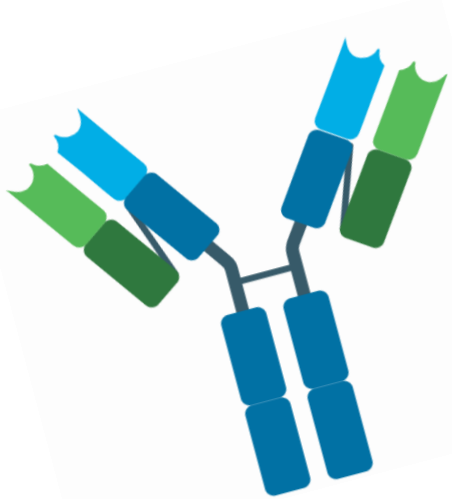
ELISA

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Paulo Rafael Cardoso de Sousa

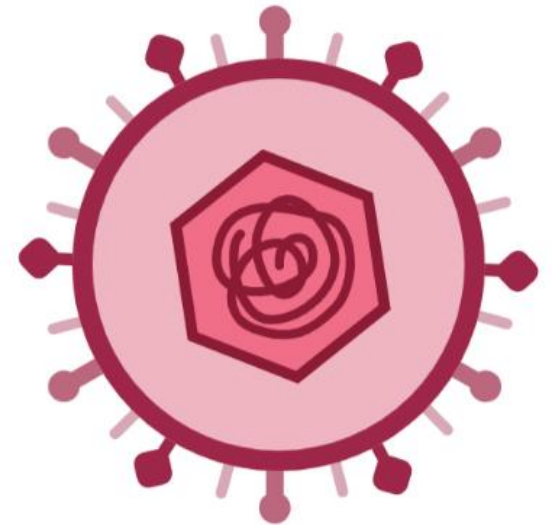


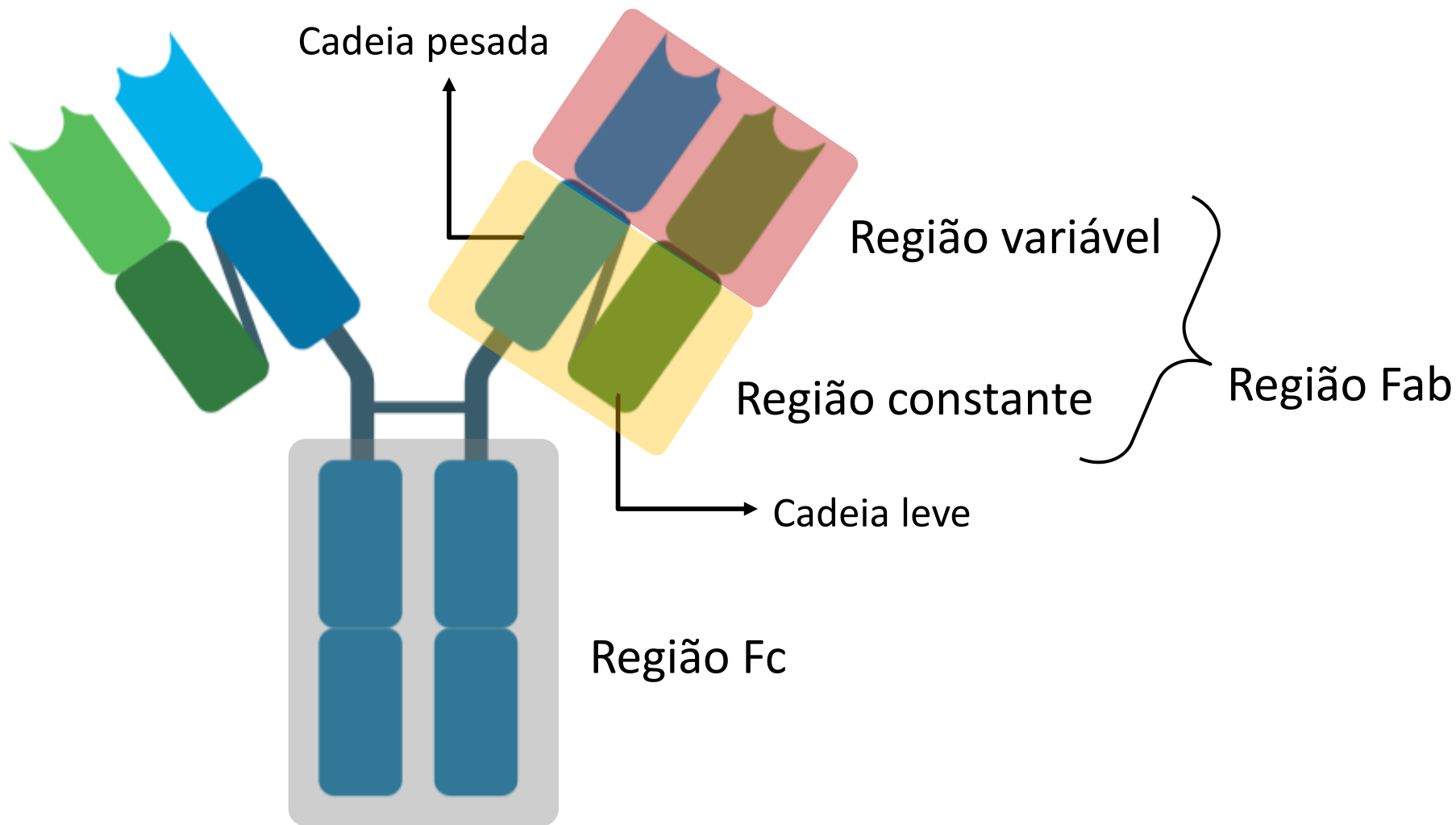
INTRODUÇÃO

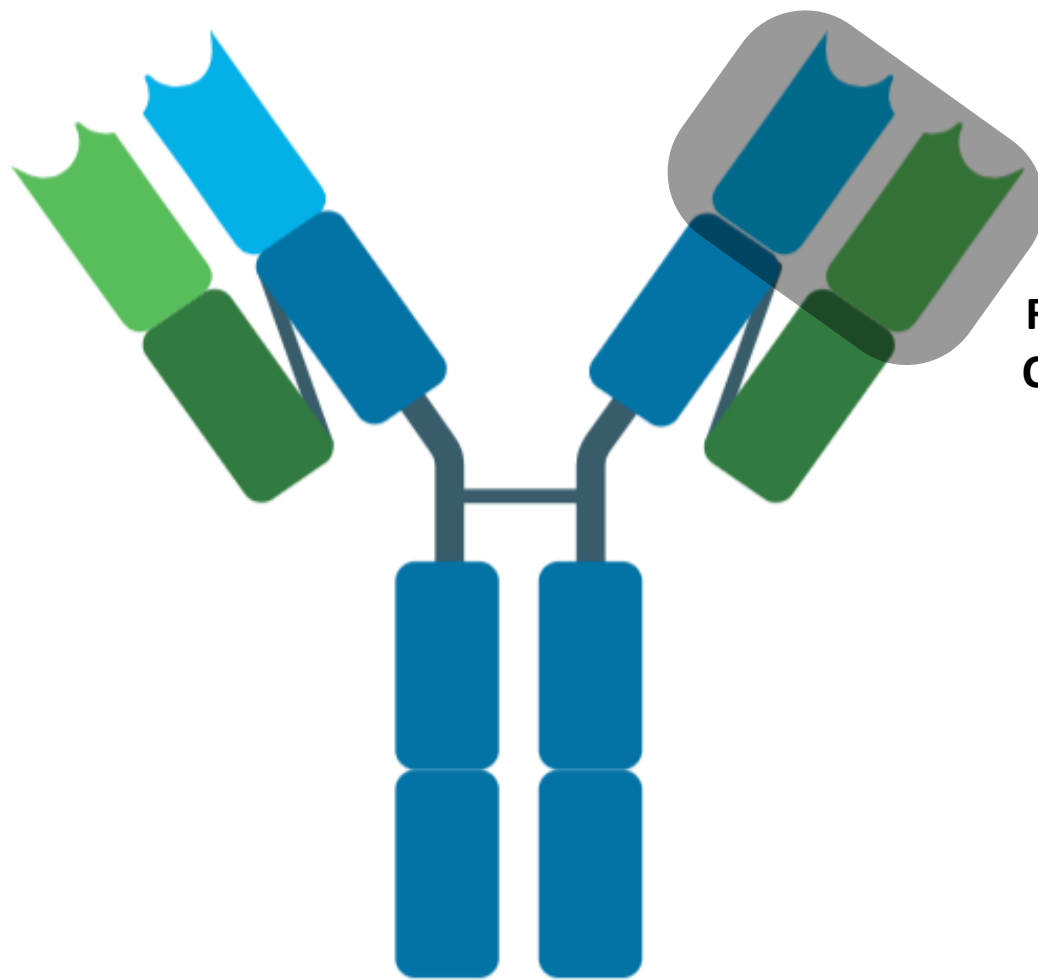


Anticorpos são proteínas produzidas pelos vertebrados em resposta à exposição a estruturas estranhas – os antígenos.

Antígenos são substâncias reconhecidas pelos anticorpos.

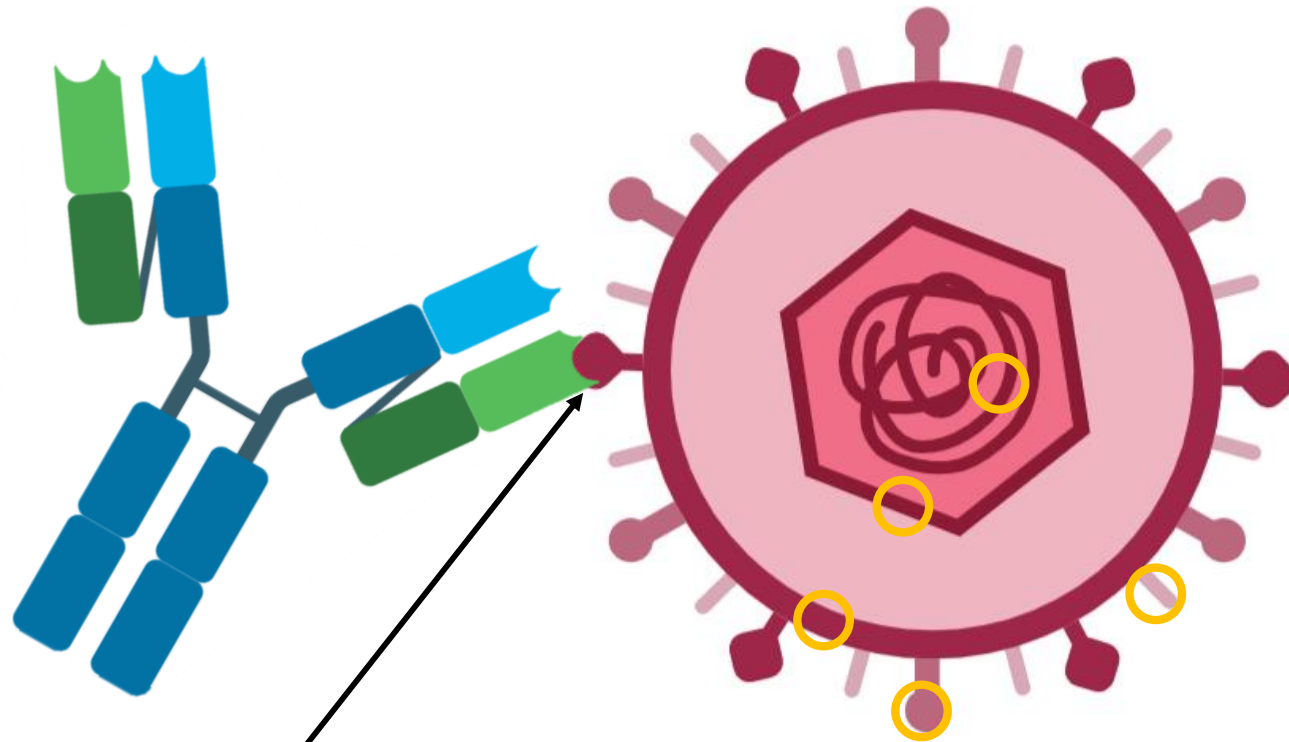






Região hipervariável

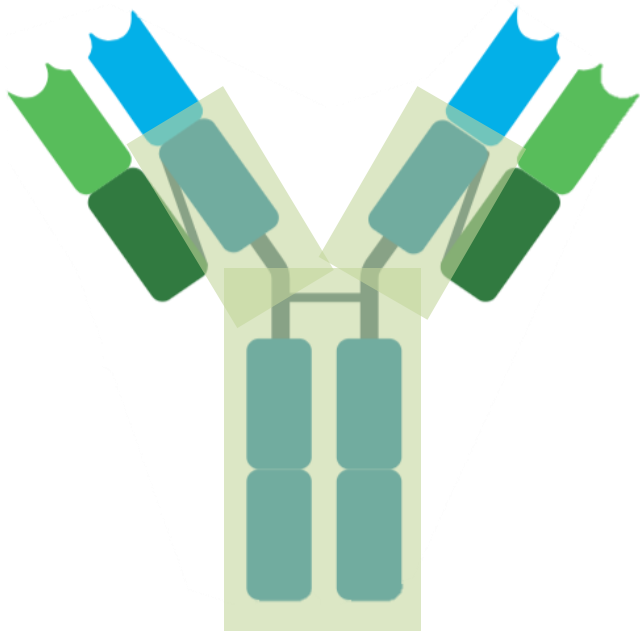
Região de Determinação de Complementariedade (CDR)



Local de ligação do Antígeno

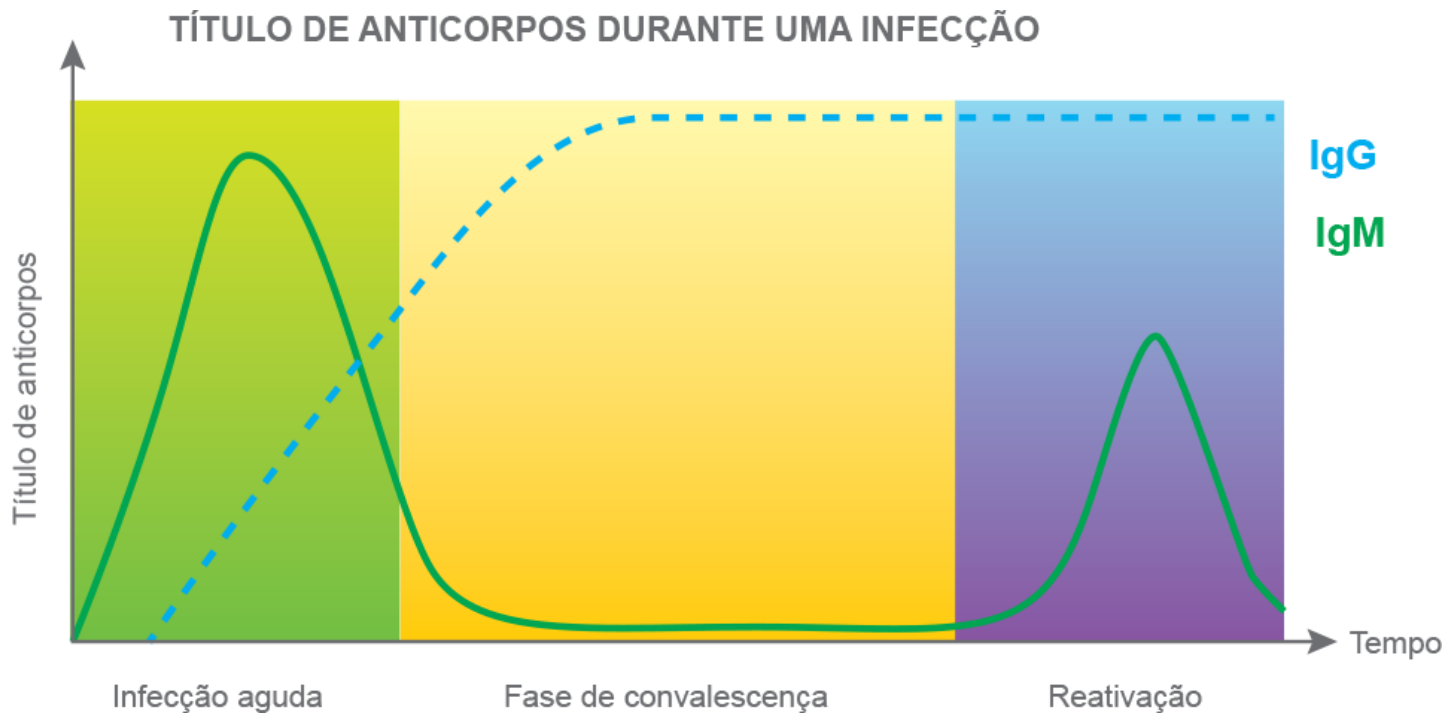
Determinante ou epítipo

Metabólitos intermediários, açúcares, lipídios, hormônios, e macromoléculas tais como carboidratos complexos, fosfolipídios, ácidos nucleicos e proteínas.



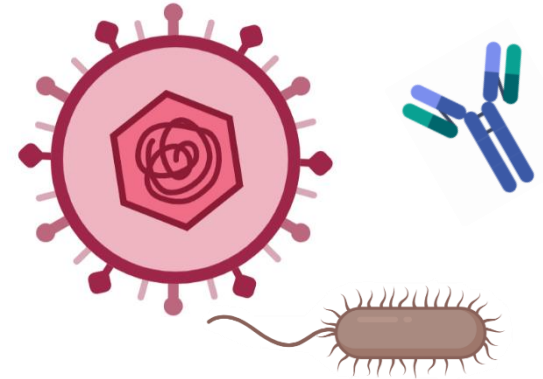
Classes de anticorpos:

IgA, IgD, IgE, IgG, IgM



ELISA

O método de ELISA foi desenvolvido em **1971** por Engvall e Perlmann.



O ELISA é uma técnica de ensaio em placa projetada para detectar e quantificar peptídeos, proteínas, **anticorpos** e hormônios.

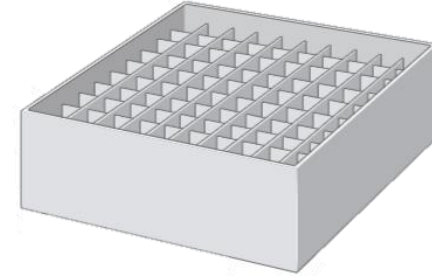


Homogêneo
x
Heterogênio

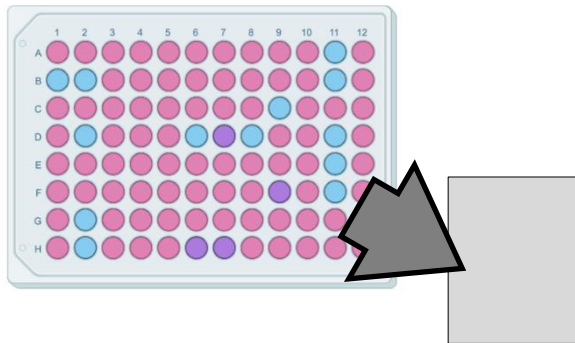
Pré-experimento



Transporte, recebimento e alicotagem das amostras



Padronização de identificação e armazenamento

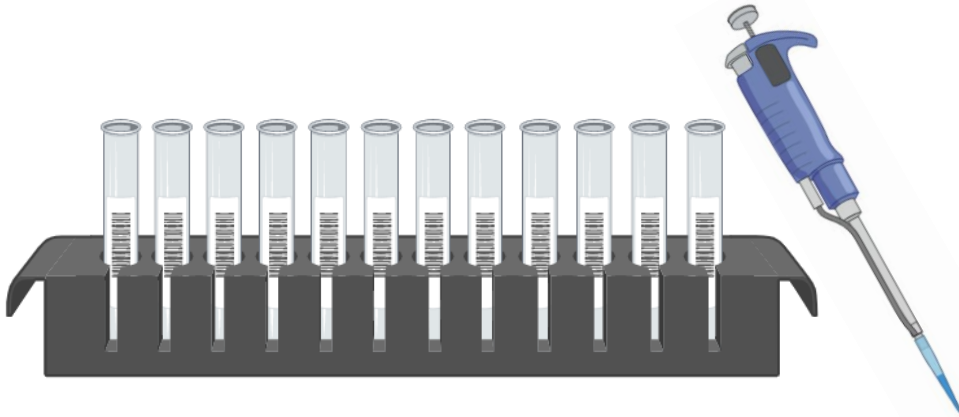


Mapa de localização das amostras na placa



Disponibilidade e restrição de acesso

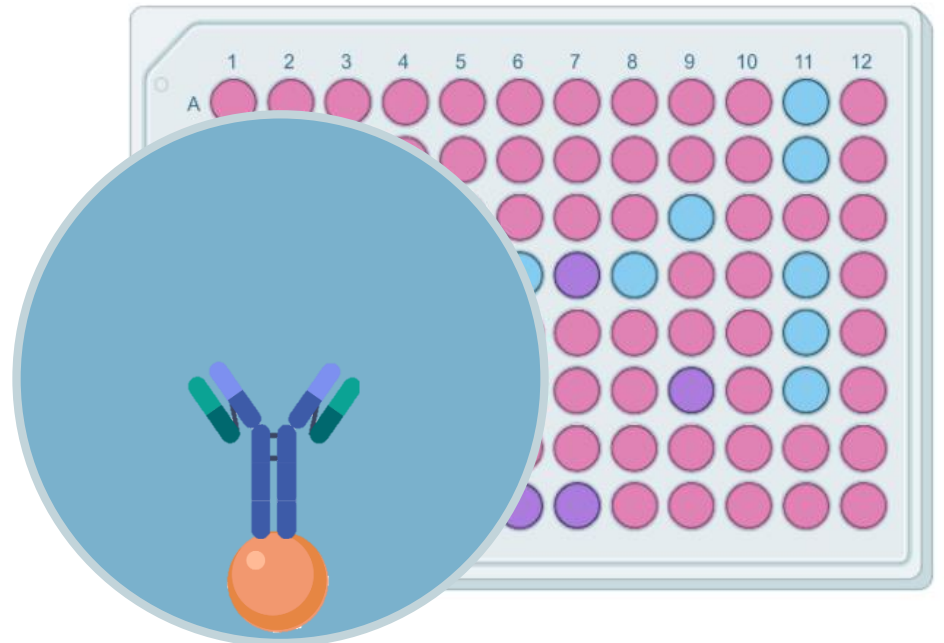
Procedimento – ELISA heterogêneo (Euroimmun)



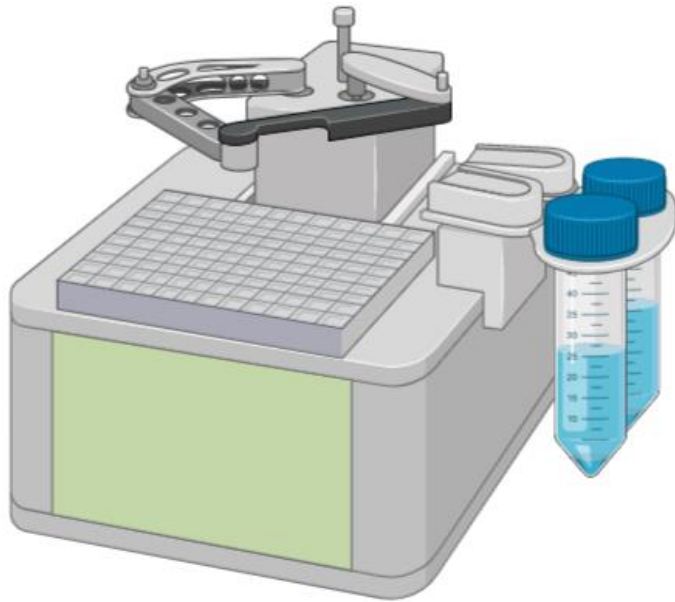
1. Tampão de amostra +
amostra (100:1)

2. Microplaca de 96 poços
com antígenos ou anticorpos
imobilizados.

3. Incubação



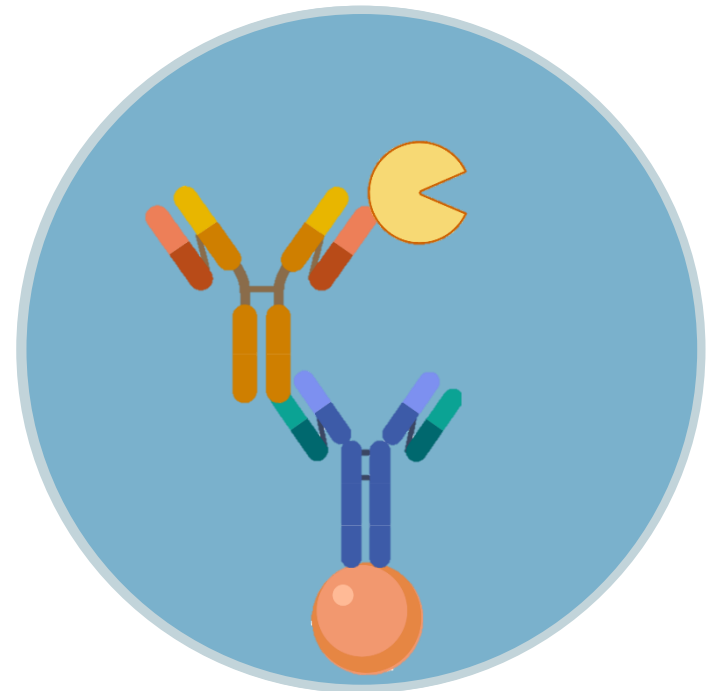
Procedimento – ELISA heterogêneo (Euroimmun)



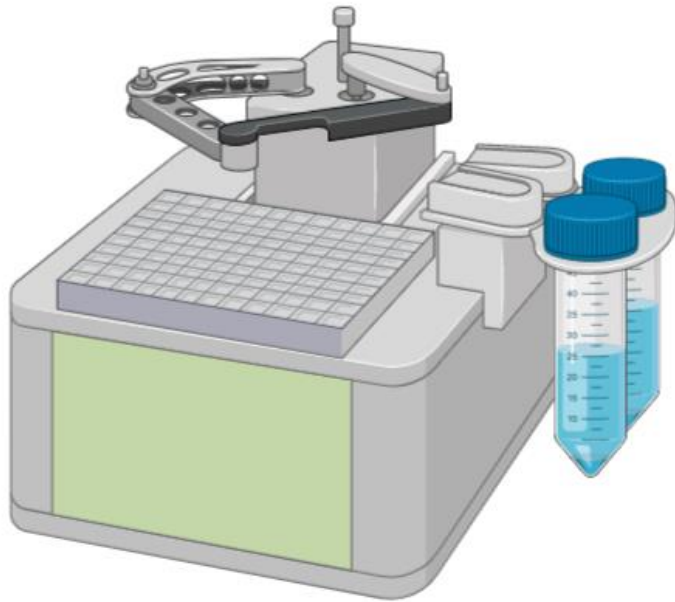
4. Primeira lavagem

5. Adição do conjugado enzimático + incubação

β -galactosidase, glicose-oxidase, peroxidase e fosfatase alcalina.



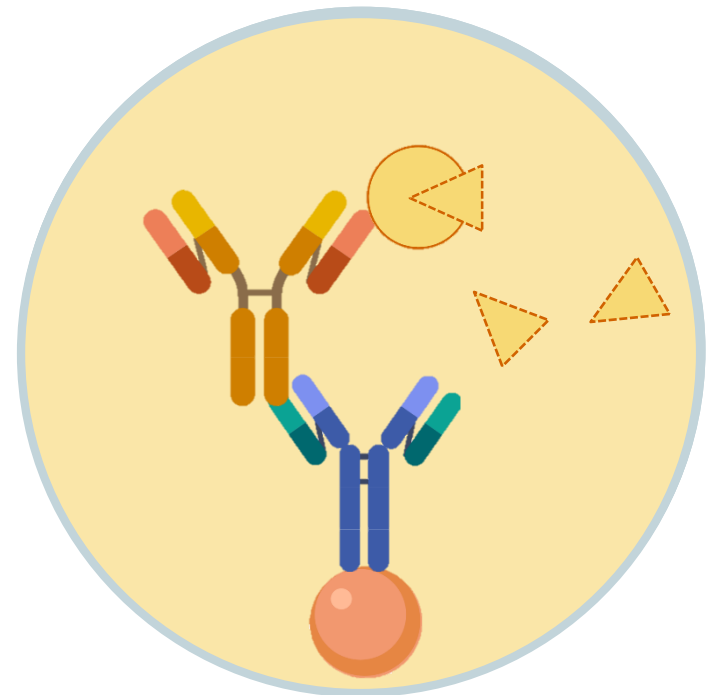
Procedimento – ELISA heterogêneo (Euroimmun)



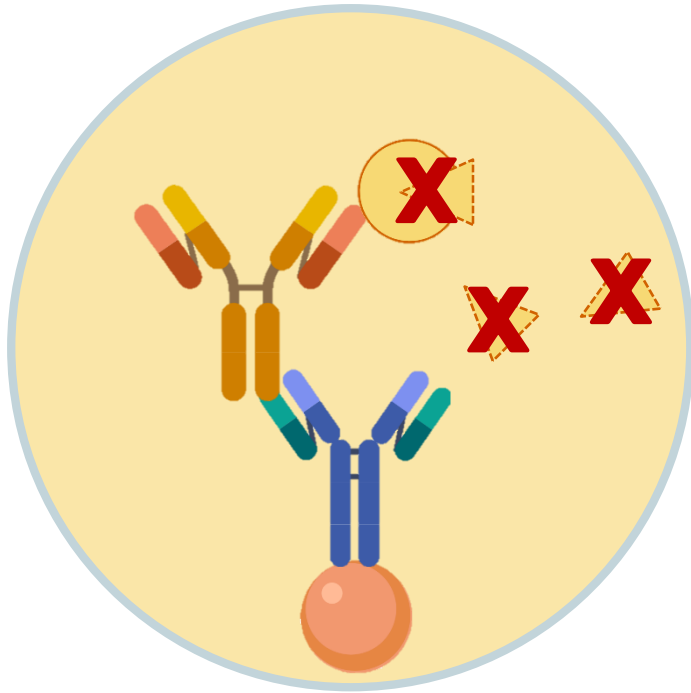
6. Segunda lavagem

7. Adição do substrato cromógeno + incubação

P-nitrofenil-fosfato, 5-ácido aminossalicílico e ortofenilenodiamina.



Procedimento – ELISA heterogêneo (Euroimmun)



8. Adição da substância de parada

NaOH, HCl ou H₂SO₄

9. Leitura (400 – 600 nm)



Resultados

PROJETO ZIKA EM FORTALEZA: RESPOSTAS DE UMA COORTE DE MULHERES ENTRE 15 A 39 ANOS

ID ELISA: 06CM (CHIKV IgM)												LOTE: E171023BM		
DATA: 01/11/2019												VALIDADE: 22/10/2018		
NOME KIT: Anti-Chikungunya virus ELISA IgM												CUT-OFF:		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A		5)A442	13)A441	21)G10	29)A457	37)C363	45)C441	53)G122	61)C408	69)A218	77)C507	85)A458		
B		6)A440	14)A438	22)G87	30)A378	38)C364	46)C263	54)G85	62)C10	70)A415	78)C212	86)A338		
C		7)A443	15)A433	23)G180	31)A310	39)C361	47)L156	55)G236	63)C476	71)A455	79)C553	87)A345		
D		8)A436	16)A444	24)C206	32)A349	40)C94	48)L132	56)G21	64)C380	72)A452	80)C202	88)G83		
E	1)G114	9)A447	17)C534	25)C207	33)C465	41)C170	49)L88	57)G60	65)C148	73)A405	81)C502	89)G71		
F	2)G204	10)G331	18)C597	26)C491	34)C247	42)C221	50)G201	58)G345	66)L169	74)A381	82)A437	90)G107		
G	3)G155	11)L14	19)A445	27)A453	35)C189	43)C488	51)G25	59)C219	67)L110	75)G112	83)A73	91)G273		
H	4)G166	12)A434	20)A431	28)A429	36)C218	44)C530	52)G338	60)C379	68)L130	76)C462	84)A396	92)G64		

Plate No.: 3 All All 1st

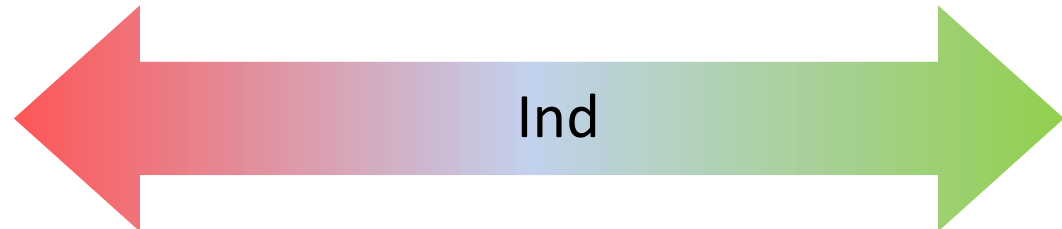
	1	2	3	4	5	6
A	1.537	1.699	2.250	2.202	-0.035	2.477
B	0.883	2.123	2.015	2.125	2.304	1.443
C	0.867	1.508	1.267	0.072	1.864	2.057
D	-0.004	2.075	2.207	0.961	1.932	1.664
E	0.115	1.613	2.241	2.002	2.234	1.977
F	1.605	-0.037	2.080	1.444	0.109	0.111
G	2.025	1.554	1.486	1.287	1.382	-0.010
H	1.778	1.896	0.045	1.713	2.152	1.563

Position
 ABS
 Quantitative
 Qualitative

$$\frac{\text{Cut-off 1}}{\text{Cut-off 2}} = M$$

M - 10% ← M → M + 10%

Neg

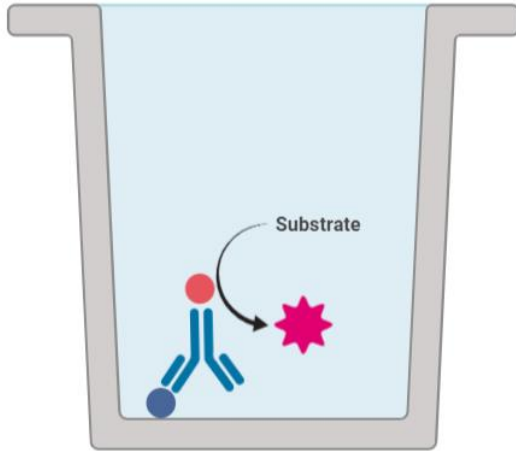


Ind

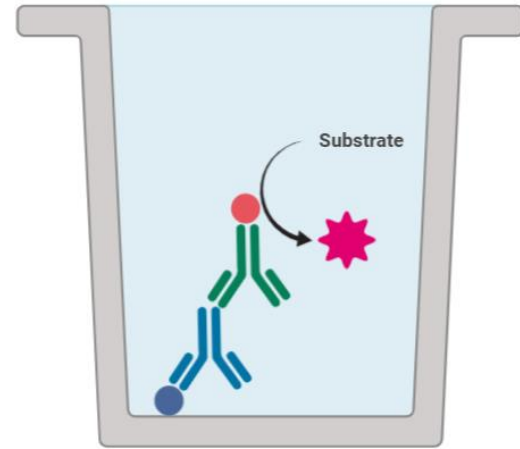
Pos

Tipos de ELISA

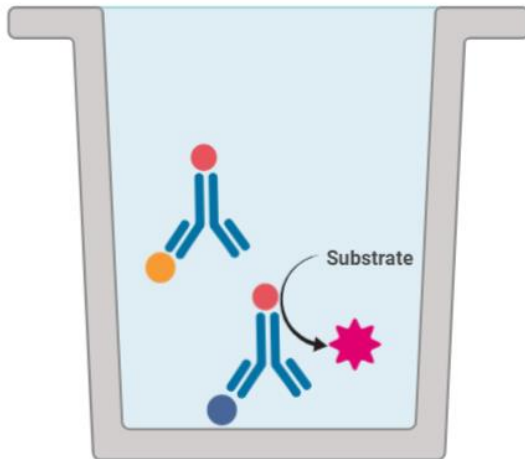
Direto



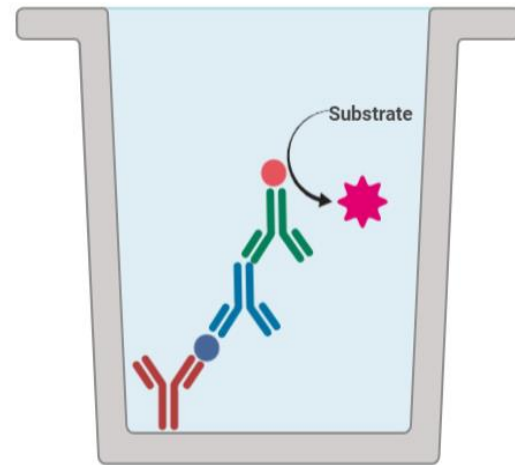
Indireto



Competição



Sanduíche



Possíveis erros

1. Uso de kits de empresas diferentes no mesmo estudo;
2. Ensaio de precisão;
3. Erro de equipe inexperiente;
4. Kits no limite máximo do prazo de validade;
5. Degradação de reagentes, erros em equipamentos e pipetagem;
6. Contato manual no fundo da microplaca sem luvas ou com luvas inadequadas;
7. Adaptações por falta de materiais;
8. Aerossóis e bolhas de ar;
9. Amostras com impurezas e armazenamento;
10. Cálculo incorreto dos resultados de abs, Cut-offs muito discrepantes.

