

ELISA

Guia de Aula Prática

Rita Maia

Fundamentos da Técnica

- Definição:

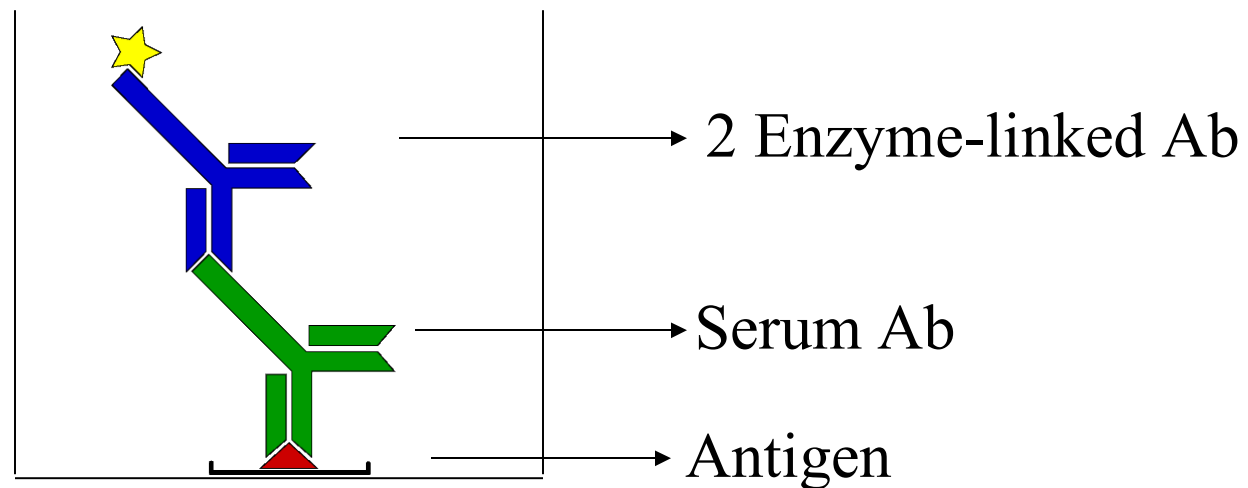
Método que combina a especificidade de um anticorpo com a sensibilidade de um ensaio simples enzimático.

- Princípio:

Reação Antígeno-Anticorpo

Fundamentos da Técnica

- Componentes:
 - ♦ Anticorpo ou Ag ligado
 - ♦ Enzima ativa
 - ♦ Substrato
 - ♦ Produtos solúveis (cor)

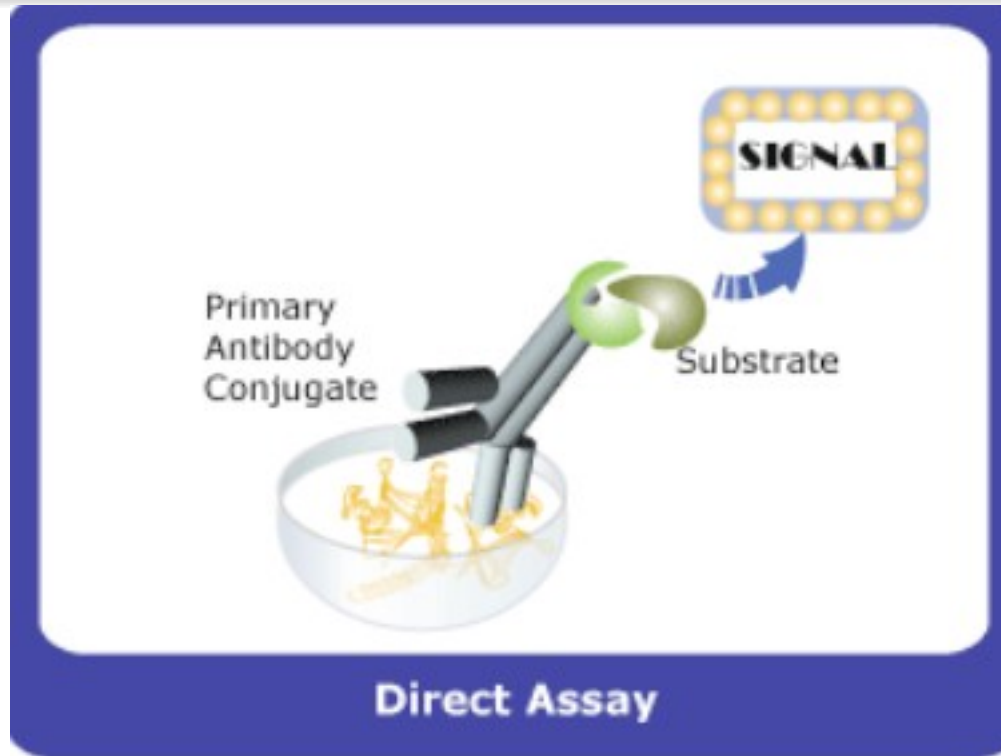


Fundamentos da Técnica

Comuns: enzimas que convertem um substrato sem cor num produto de cor

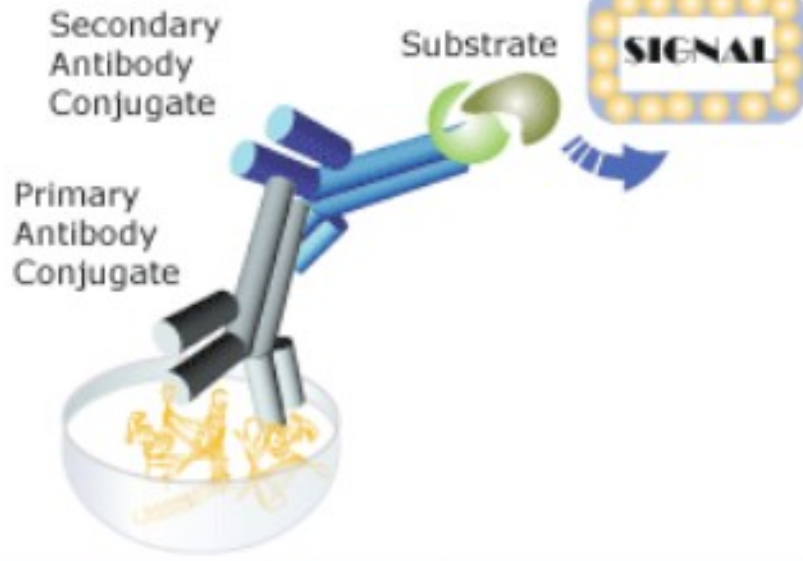
| Enzima | Substrato | Cor |
|--------------------|-----------------------------|---------|
| Fosfatase alcalina | P-nitrofenil-fosfato (pNPP) | Amarelo |
| Peroxidase | ABTS | Verde |
| Peroxidase | OPD | Laranja |
| Peroxidase | TMB | Azul |

Tipos de ELISA



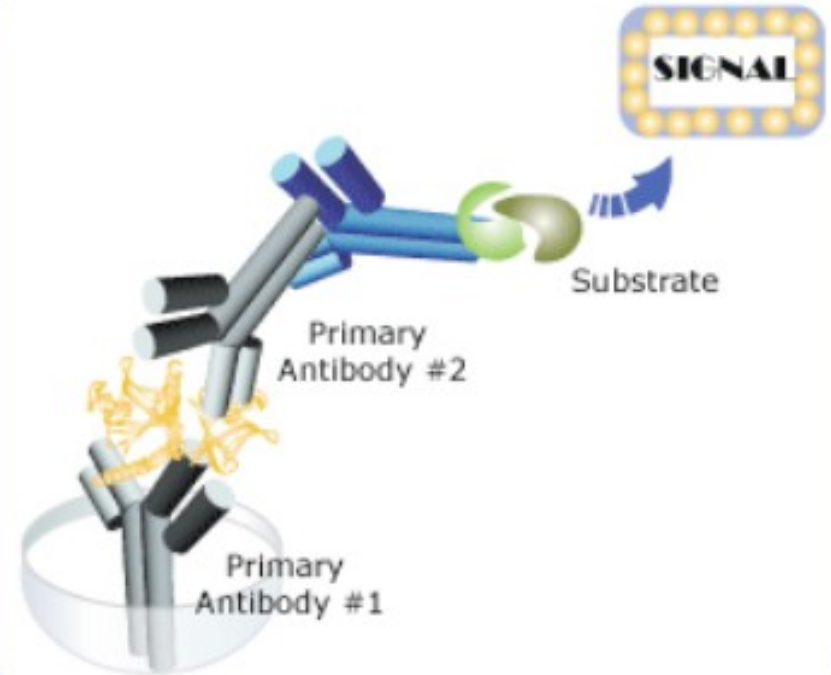
1. Direto

Tipos de ELISA



Indirect Assay

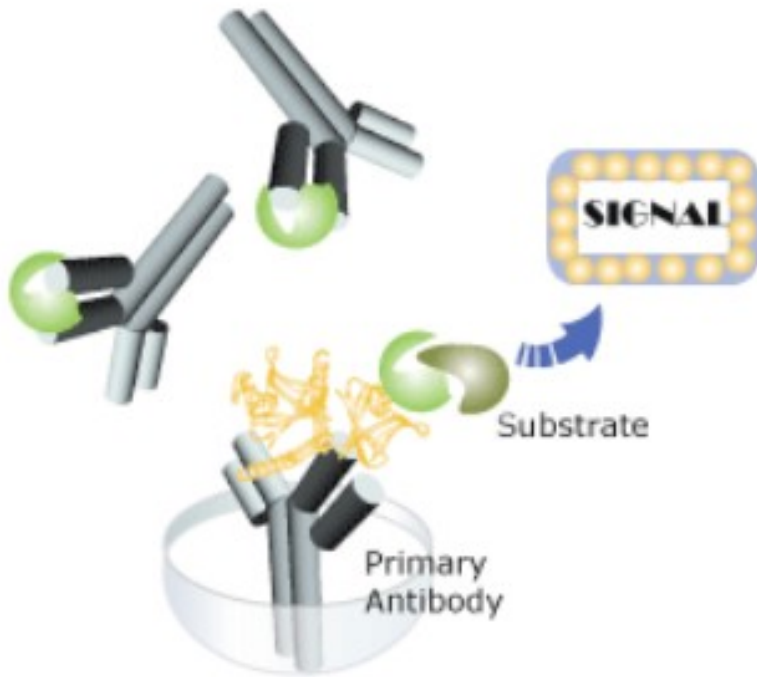
2. Indireto



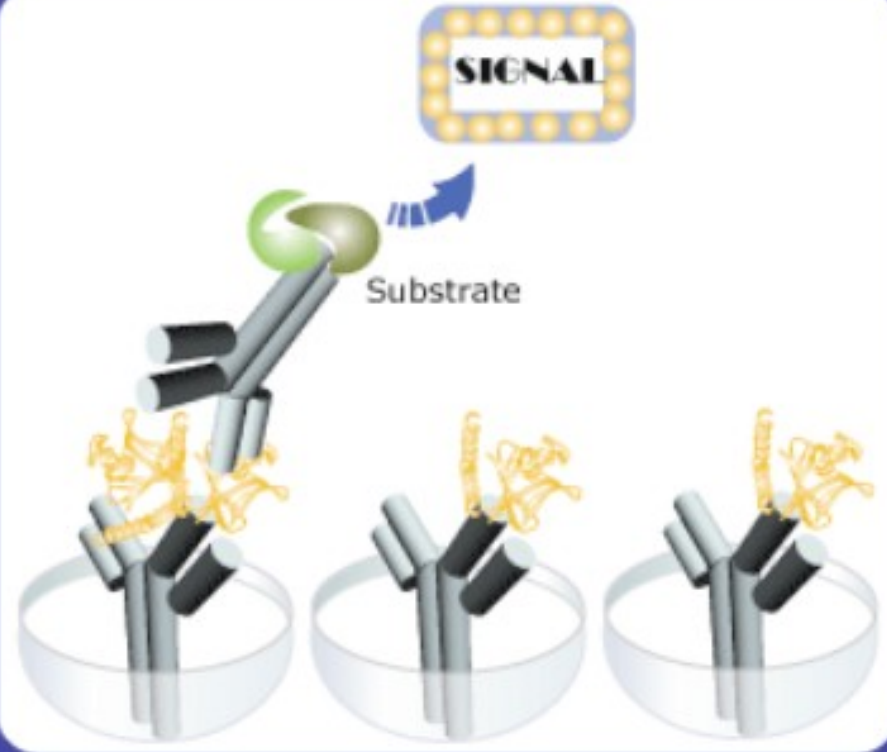
Capture Assay Sandwich

3. Sanduiche

Tipos de ELISA



Competitive Assay



Multiplex Assay

4. Competitivo

5. Multiplex

Uso Diagnóstico

- Identificar se o animal está com a doença:
 - ◆ Presença do patógeno - Ag
 - ◆ Título do mesmo
- Determinar se o animal tem Ac:
 - ◆ Teve a doença (IgM, IgG ou IgA)
 - ◆ Se está protegido:
 - Título de anticorpos (vacina ou exposição)

Muito utilizado: Titulação

O Que é?

Titulação é um método para testar a diluição serial de uma amostra (ex. soro)

Como funciona?

Determina a quantidade relativa de Ac na diluição serial de uma amostra

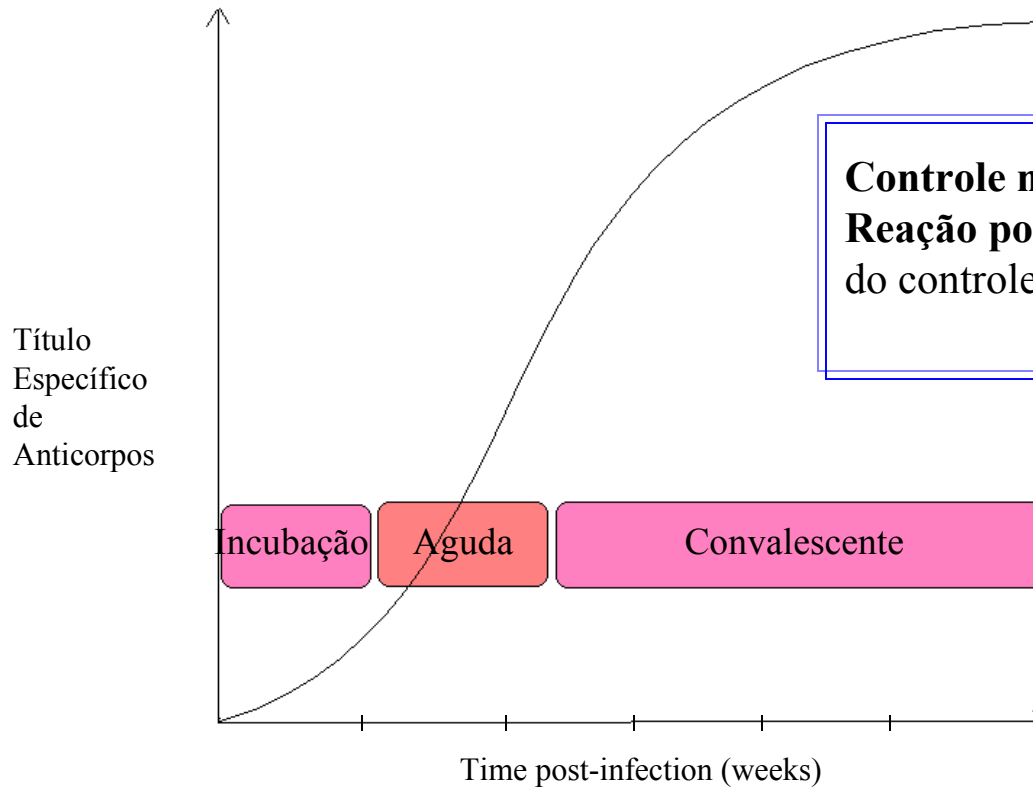
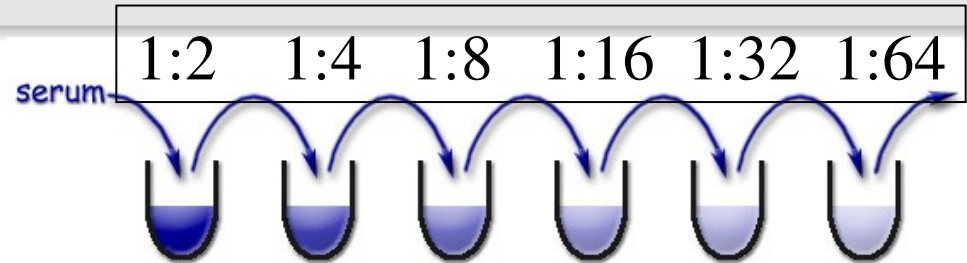
Quais testes sorológicos podem utilizar titulação ?

- ✓ Immunofluorescência
- ✓ Aglutinação
- ✓ Fixação do Complemento
- ✓ Soro Neutralização
- ✓ Inibição da Hemaglutinação

Como interpretar?

A maior diluição em que o anticorpo ainda consegue ser detectado é o **Título de Anticorpo**

Como diferenciar doença de saúde ?



Controle negativo: soro antes da exposição
Reação positiva: duas vezes a absorvância do controle negativo

Método direto: sem título

- Utiliza-se a amostra sem diluições
- Adiciona-se os reagentes
- Faz-se a leitura

Método: A Arte de Pipetar



Para coletar a amostra:

- Ajusta o volume desejado
- Pressiona até atingir a primeira parada
- Libera lentamente até voltar totalmente à posição inicial

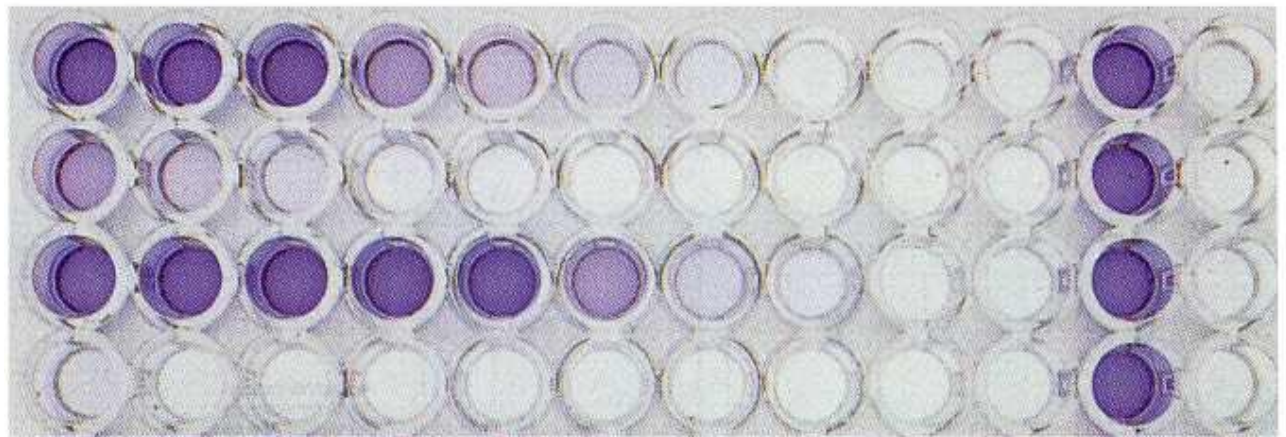
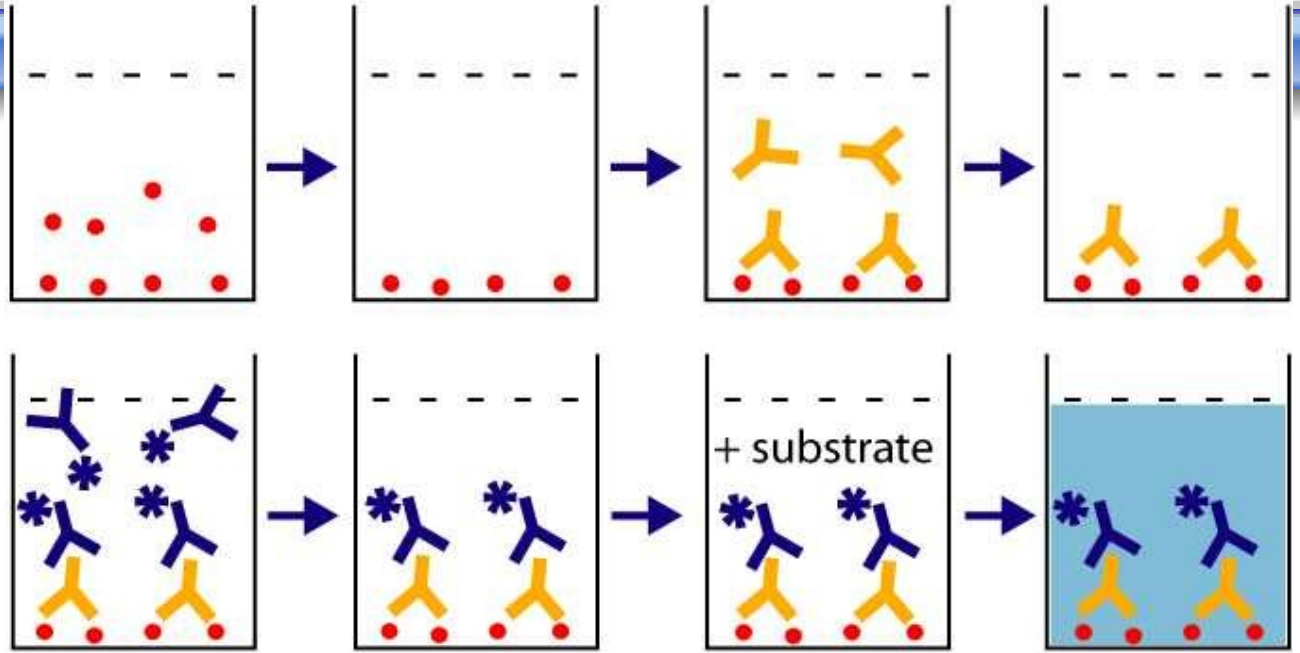
Para liberar a amostra:

- Pressiona até passar da primeira parada e sentir a segunda parada

Resumo da Prática em Grupo

1. Definir grupos;
2. Ir ao laboratório de Viroses;
3. Adicionar o anticorpo primário;
4. Adicionar anticorpo secundário;
5. Fazer leitura no leitor.

Prática



Protocolo da Prática

Determine os poços da sua equipe

Marque tubos de diluição

Controle (+)
Controle (-)
Cut off (CO)
Amostra

Adicione 1.000uL do diluente (serum diluent) em cada tubo

Adicione 10uL de cada amostra em seu tubo respectivo

Lembrem-se de Trocar as ponteiras

Misture bem

Transfira 100uL de cada controle CO e amostra para cada poço

Lembrem-se de Trocar as ponteiras

Incube por 30 minutos
37o C

Protocolo da Prática

Após incubação

Lave 6 vezes com Wash Buffer

Lavagem: coloca o líquido com a Piceta e remove invertendo a placa de uma só vez. Na última vez, inverta a placa e bata com firmeza sobre papel para remover excesso de líquidos

Adiciona 100uL Conjugado HRP anti-IgG-humano em cada poço

Cubra a placa e incube mais 30 minutos 37°C

Protocolo da Prática

Lave 6 vezes
com Wash Buffer

Adicione 100uL
TMB em cada
poço

Incube 10 min
em T.A.

Formar uma
coloração AZUL

Adicione 100uL
Stop Solution
em cada poço

Lavagem: coloca o líquido com a Piceta e remova invertendo a placa de uma só vez. Na última vez, inverta a placa e bata com firmeza sobre papel para remover excesso de líquidos

