

Metoda: ELISA

Kristýna Přibilová, Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, 2. ročník

Školitelé: Ing. Vlas Tomáš

Princip: Elisa, známá také jako EIA je analytická metoda, která pomocí imunochemické reakce s enzymatickou detekcí umožňuje stanovit v neznámém vzorku koncentraci antigenu nebo protilátky. Indikátorem imunoanalytické metody je enzymový konjugát. Podle povahy substrátu je možné reakce detekovat spektrofotometricky, nefelometricky, fluorometricky a luminometricky.

Lze ji rozdělit na přímou, nepřímou, heterogenní (vyžadující separaci volné a vázané frakce analytu) nebo homogenní (nevyžadující separaci). Heterogenní ELISA může být kompetitivní (se značenou protilátkou nebo se značeným antigenem) nebo nekompetitivní (se značenou protilátkou) tzv. sandwich.

ELISA využívá dvou základních vlastností imunoglobulinů. Za prvé je to schopnost vázat se na povrch plastů (např. polystyrenu) a v druhém případě schopnost vázat enzymy na Fc fragmenty imunoglobulinových molekul.

Reakce probíhá tak, že protilátka je navázaná na pevnou fázi a po kompetitivní reakci s antigenem se v neznámém vzorku ustaví rovnováha. Nenavázaný konjugát je odstraněn z reakční směsi promytím a konjugát vázaný na pevné fázi je inkubován s enzymovým substrátem a změřen.

Při nespecifické reakci se antigen zakotví pomocí adsorpce na povrch destičky, při specifické se antigen zachytí na jinou protilátku, specifickou pro daný antigen. Po imobilizaci antigenu se přidá detekční protilátka a ta vytvoří komplex s antigenem. Detekční protilátka je většinou kovalentně vázána na enzym, nejčastěji peroxidázu nebo alkalickou fosfatázu.

Uplatnění metody: Je užitečná pro stanovení buď protilátky proti konkrétnímu patogenu nebo se detekují přímo prionové, virové, bakteriální a parazitární antigeny, kdy antigen lze detekovat v séru, tkáních, mozkomíšním moku, stolici a slinách. Používají se i ke stanovení cytokinů, detekci markerů virových či mikrobiálních činitelů.

Úskalí metody:

Pokud provádíme tuto metodu bez automatizace musíme dbát na dodržování času promytí a inkubace a je potřeba vyměňovat špičku po každém pipetování, jinak by došlo ke kontaminaci vzorků.

Přístrojové vybavení: Základním vybavením pro ELISA metody je tzv. ELISA-reader. Je to modifikovaný spektrofotometr, který umožňuje měření barevné reakce při různých vlnových délkách a je upravený na možnost odečítání z mikrotitračních destiček. V současné době se v laboratoři pracuje spíše s ELISA procesory, které obsahují pipetovací blok na ředění vzorků a jejich aplikaci do mikrotitračních destiček, přidávání vlastních reagensů, blok pro promývání, inkubaci a odečítání včetně vyhodnocení. Tyto systémy jsou buď reagenční otevřené, to znamená, že je možné v nich zpracovávat soupravy od různých výrobců, anebo jsou reagenční uzavřené – možné zpracovat pouze jedním výrobcem.

Odběr a transport: Pro vyšetření vzorku musíme odebrat 5-8 ml séra do zkumavky s gelem bez antikoagulační přísady. Po odběru necháme krev stát po dobu 30-60 minut v pokojové teplotě a odere

se vysrážený krevní koláč. Poté se vzorek odstředí na 5 minut při 4000 otáčkách za minutu. Separované sérum dáváme do prázdné zkumavky.

Transport by měl být co nejrychlejší, nejlépe 20 minut po odběru, aby se krev stihla srazit v místě odběru.