

# ELISA

Mgr. Nikola Kučeráková

# ELISA

## Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

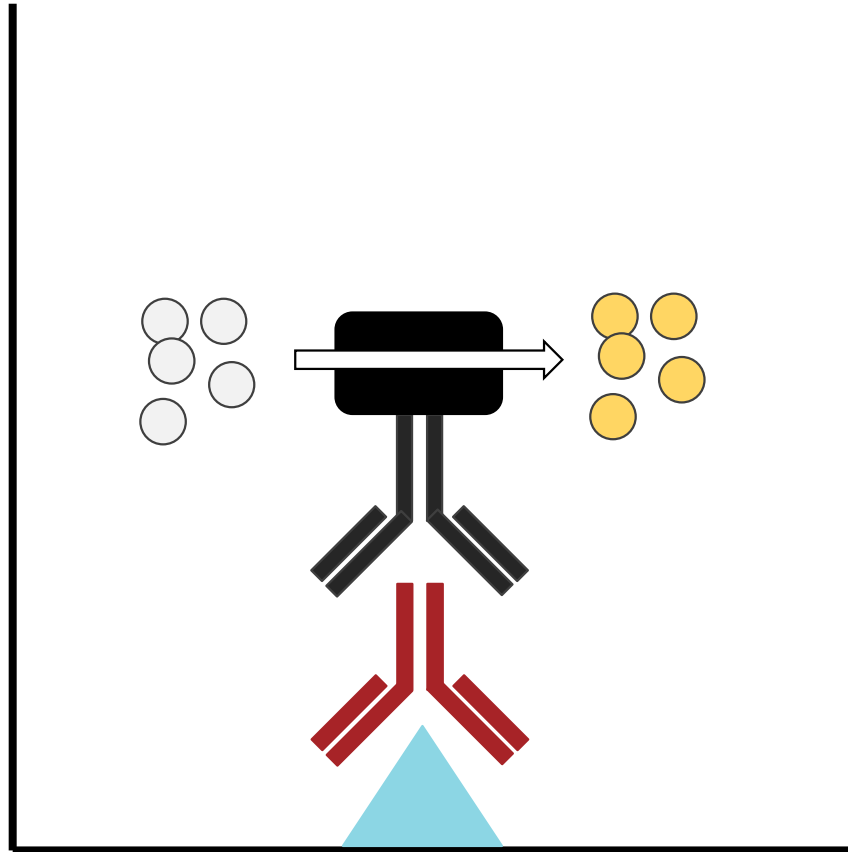
- kvantitativní stanovení analytu v neznámém vzorku
- má **vysokou citlivost a specificitu**
- ELISA patří do skupiny metod **EIA** (enzyme immunoassay), které používají **enzym** ke značení protilátky (nebo antigenu)
- Jeden z imunoreaktantů je zakotvený na pevnou fázi (immunosorbent), zpravidla stěny jamek mikrotitrační destičky
- Jeden z imunoreaktantů je značený enzymem (**Enzyme-linked**)
- enzym po přidání substrátu do reakční směsi katalyzuje reakci, na jejímž konci je **barevný produkt vhodný k fotometrické detekci**
- **heterogenní imunochemické stanovení** - vyžadují separaci volné a vázané frakce

# ELISA techniky

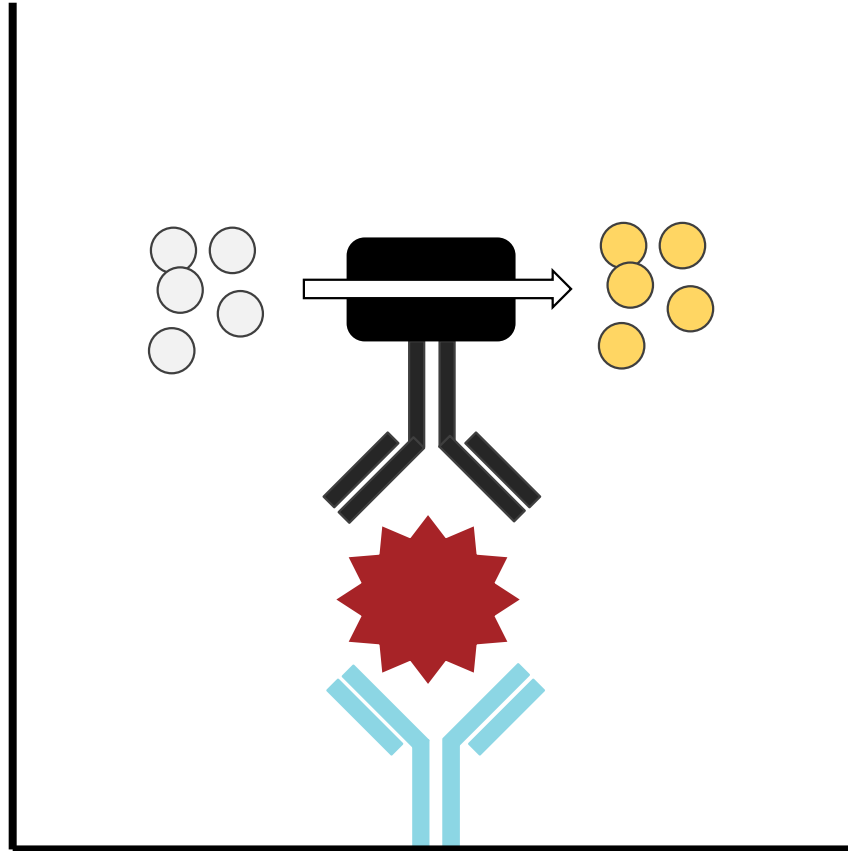
Pro správné provedení ELISA techniky:

- antigen nebo protilátka musí být navázán na povrch nosiče bez ztráty imunoreaktivity
- stabilita enzymů a také imunologická reaktivita konjugátu (komplex AbAg) musí být během reakce stabilní
- aktivita enzymů, které jsou použity při značkování, se nemůže přirozeně vyskytovat v analyzovaných biologických tekutinách

# Detekce protilátky



# Detekce antigenů



# Konjugáty

## Enzymy používané ke značení

- Protilátkový konjugát proti:
  - určité třídě Ig
  - Jinému epitopu antigenu
- konjugovaný s enzymem
  
- musí být stabilní
- struktura enzymu musí umožnit vytvoření kovalentní vazby s protilátkou či antigenem
- **Produkt enzymové reakce** musí být snadno detekovatelný i ve velmi nízkých koncentracích
- Křenová peroxidáza, alkalická fosfatáza,...

## Kompetitivní ELISA

## Nekompetitivní (sendvičová) ELISA

- **platí zde nepřímá úměra:** čím vyšší koncentrace analytu (neznačeného), tím nižší intenzita zbarvení (tím méně navázaného značeného antigenu)
- nejvíce používaná ELISA metoda
- **platí zde přímá úměra:** čím vyšší koncentrace analytu, tím vyšší intenzita zbarvení.

# Využití ELISA metod

- ELISA metody mají široké uplatnění ve zdravotnických laboratořích hlavně v **imunologii** a **infekční mikrobiologii** (méně v biochemii nebo hematologii), kde se používají pro stanovení např. infekčních agens nebo **protilátek**
- Nejčastěji jsou analyzovány vzorky séra, likvoru

## **Výhody:**

- jsou citlivé a specifické
- mají nízké pořizovací náklady na technickou instrumentaci

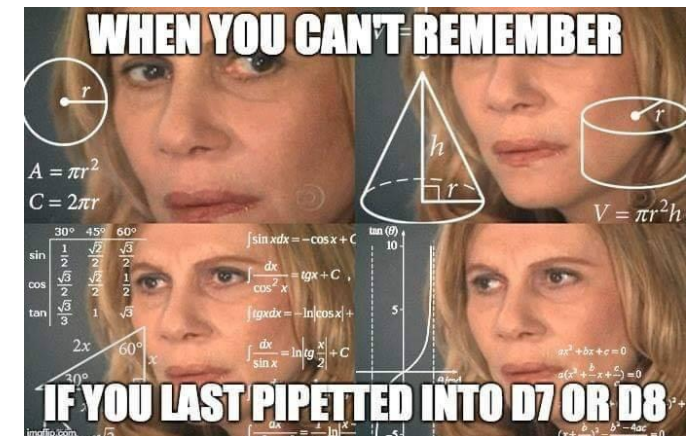
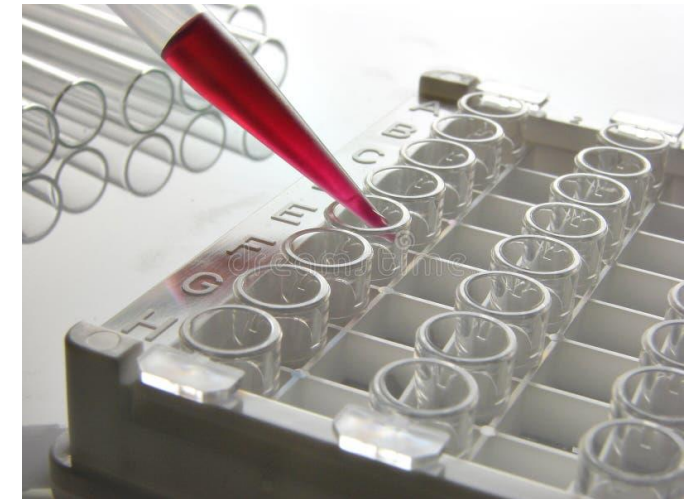
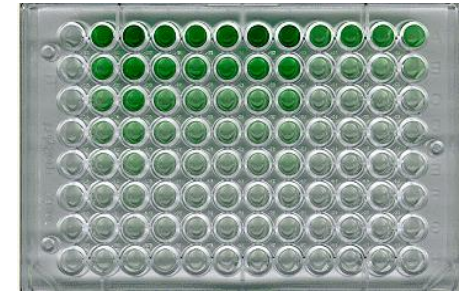
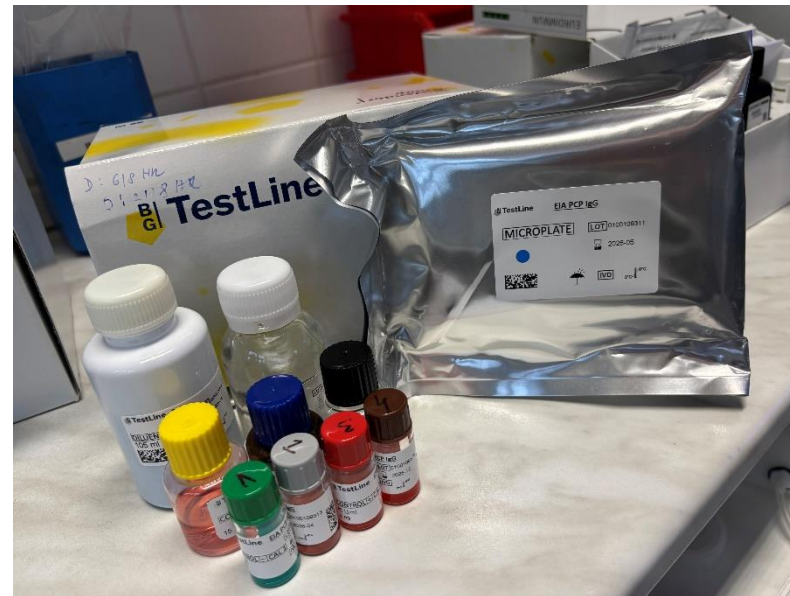
## **Nevýhody:**

- analýza vzorků pouze v sériích
- časová náročnost
- manuální pipetování



# Technická instrumentace

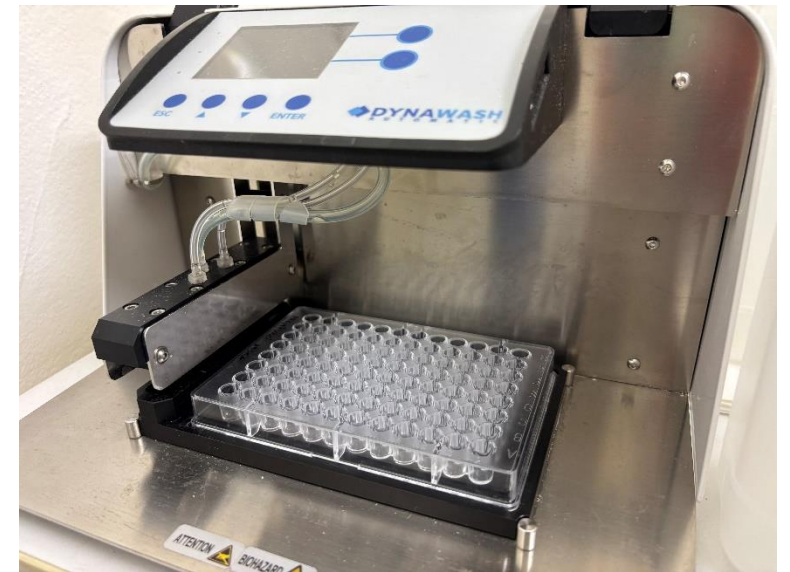
- Provádí se ve speciálních nádobkách uspořádaných do tzv. **mikrotitračních destiček**.
- Každá destička obsahuje 96 jamek uspořádaných ve 12 řadách po 8 jamkách.



# Technická instrumentace

## Promývání:

- osmikanálové pipety
- automatické ELISA promývačky



Pokud to metoda vyžaduje, lze **během inkubace** mikrotitrační destičku umístit **do třepačky**.

## Detekce:

- spektrofotometry - ELISA ready

# ELISA reader (spektrofotometr)

## Součásti vertikálního fotometru:

- **zdroj záření:** nejčastěji používá halogenová žárovka nebo xenonová výbojka.
- **Interferenční filtry:** jsou umístěny v posuvném držáku filtrů, obvykle se používá 6 filtrů (pro  $\lambda$  400-800 nm).
- **Optický systém:** se skládá z optických kabelů (světlovodiče), štěrbin a zrcadel pro vedení světelného paprsku ze zdroje do optického prostředí (jamka mikrotitrační destičky).
- **Detektor:** používají se fotodiody.

Rychlost měření je 5s (celá mikrotitrační destička – 96 jamek).

- **Kalibrační křivka:** Vztah mezi změřeným signálem (absorbancí) a koncentrací se určuje **kalibrací**. Obvykle se změří absorbance **6-ti standardních roztoků** o známé vzrůstající koncentraci a blank (slepý pokus, obsahuje vše kromě stanovované látky) při určité vlnové délce.

# ELISA automatická linka

Automatická linka provádí:

- automatické pipetování vzorků, reagensů, kalibrátorů a kontrol pomocí pipetovacího systému
- Má zabudovanou čtečku čárového kódu, což umožňuje automatickou identifikaci patientských vzorků.
- Linka má obvykle 3-4 místa pro umístění mikrotitračních destiček.
- Dále sestává z inkubátoru (místo pro inkubaci vzorků), promývačky a readeru mikrotitračních destiček.
- Transport destiček mezi jednotlivými částmi provádí pomocí robotického ramene.
- Systém provádí automatické ředění vzorků a je opatřen softwarem pro automatické vyhodnocení měření.





# ELISA automatická linka

## Výhody:

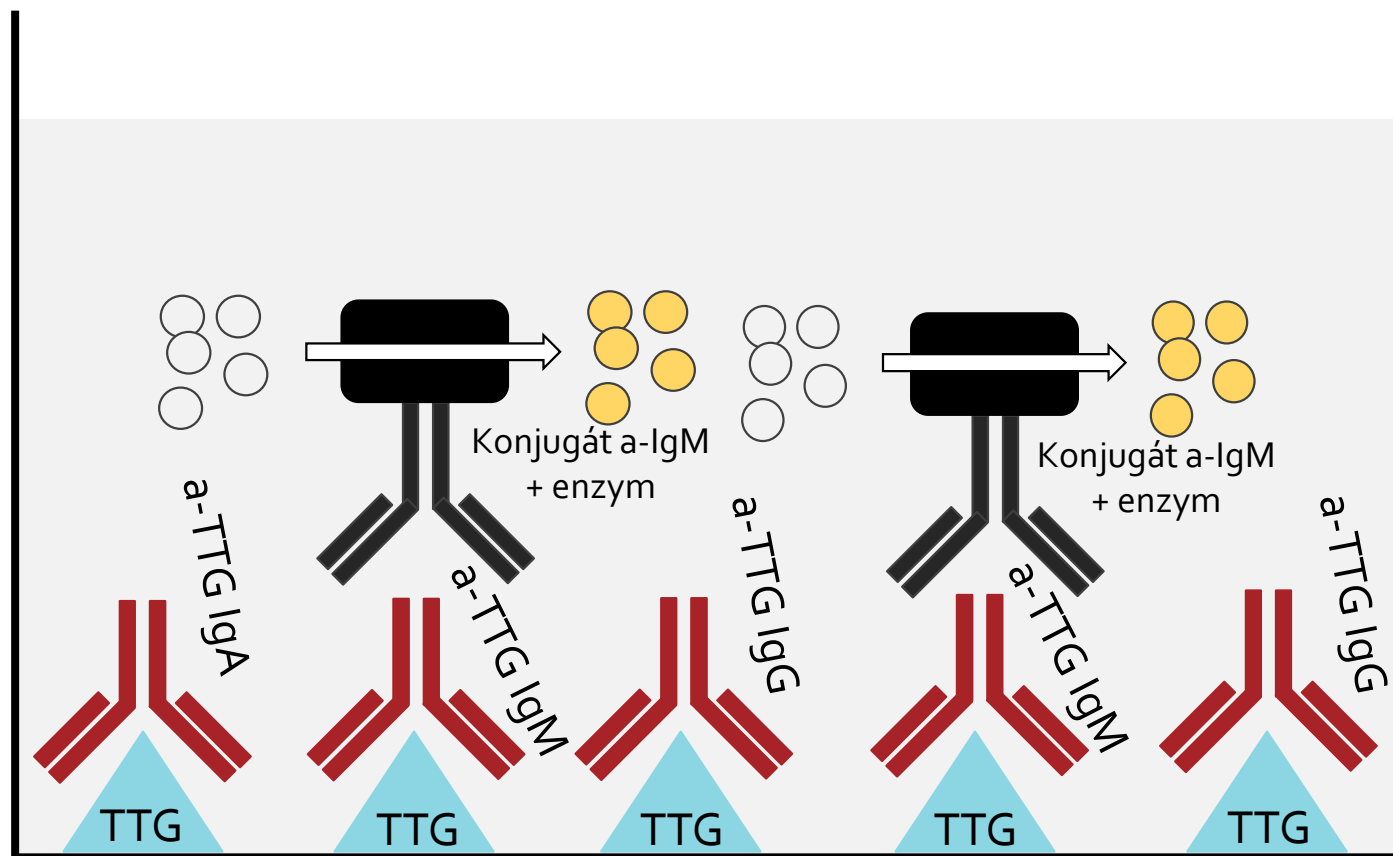
- čtení čárových kódů (zabránění záměny mezi vzorky)
- přesnost pipetování vzorků a reagensů
- vysoká kapacita přístroje

## Nevýhody:

- vyšší spotřeba používaných reagensů



Příklad:  
vyšetření  
protilátek IgM  
proti TTG



Děkuji za  
pozornost