

Metoda: ELISA

Studentka: Leona Ložonská, 2. ročník – Zdravotní laborant

Školitelé: Ing. Tomáš Vlas

Ústav imunologie a alergologie FN Plzeň

Princip: ELISA (z anglického Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je analytická metoda, která pomocí imunochemické reakce s enzymatickou detekcí umožňuje stanovení různých antigenů nebo protilátek. Tato metoda má řadu variant, avšak všechny jsou založeny na stejném principu – reakci antigenu s protilátkou.

Neznámé množství antigenu v patientském séru je imobilizováno na pevném nosiči, polystyrénové mikrotitrační destičce, buď nespecificky nebo specificky. 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.

Mezi každým krokem bývá destička promyta čistícím roztokem, který odplaví všechny proteiny (protilátky), které se specificky nenavázaly. Po posledním promývacím kroku se do mikrotitrační destičky přidá enzymatický substrát, který vyvolá viditelné zbarvení. Intenzita zbarvení koreluje s koncentrací prokazovaných protilátek nebo antigenu. Poté se zbarvení odečítá spektrofotometricky.

Uplatnění metody: Protože se ELISA využívá ke kvantitativnímu vyhodnocení antigenů nebo přítomnosti protilátky ve vzorku, má mnoho využití. Je to užitečná metoda pro stanovení nízkých koncentrací sérových protilátek, které jsou pod detekční mezí nefelometrických metod. Tato metoda také slouží ke stanovení cytokinů, detekci markerů virových či mikrobiálních činitelů.

Úskalí metody: Pokud se tato metoda provádí bez automatizace, jde o velice precizní a časově náročnou metodu, kdy se musí dodržovat časy promytí i inkubace, jinak by mohlo dojít ke znehodnocení vzorku. Také je potřeba dodržovat výměnu špiček po každém pipetování, protože je zde velké riziko kontaminace vzorků.

Přístrojové vybavení: V současné době většina laboratoří využívá ELISA procesory, které jsou reagenčně otevřené, což znamená, že je v nich možné zpracování souprav od různých výrobců. Tyto ELISA procesory obsahují pipetovací blok, kde dochází k ředění vzorků a jejich následnému pipetování do mikrotitračních destiček, blok pro promývání i inkubaci nebo přidávání reagensů. ELISA procesor také sám odečítá a vyhodnocuje výsledky.

V menších laboratořích se můžeme setkat pouze s tzv. ELISA-readrem. Je to upravený spektrofotometr, který umožňuje měření barevné reakce při různých vlnových délkách či odečítání z mikrotitračních destiček.

Odběr a transport: Pro vyšetření vzorku touto metodou je nutné odebrat 5 - 8 ml séra do zkumavky s gelem bez antikoagulační přísady. Po odběru se krev nechá cca 30 - 60 minut stát v pokojové teplotě a odebere se vysrážený krevní koláč. Poté následuje odstředování vzorku na 5 minut při 4 000 otáčkách za 1 minutu. Výsledné separované sérum se dává do prázdné zkumavky.

Transport do laboratoře by měl být rychlý, nejlépe však 20 minut po odběru, aby se krev srazila v místě odběru.