

PROTÓTIPO DE PLATAFORMA MECÂNICA PARA EXAMES IMUNOENZIMÁTICOS ELISA

Alexandre Gabriel Simas [Bolsista PIBIC CNPq], Fábio Kurt Schneider [Orientador],
Thiago Bassani [Colaborador], Hugo Vieira Neto [Colaborador]

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial
Campus Curitiba
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR
Avenida Sete de Setembro, 3165 - Curitiba/PR, Brasil - CEP 80230-901

simas061287@gmail.com, fabioks@utfpr.edu.br, thiago.bassani@gmail.com, hvieir@utfpr.edu.br

Resumo - Este artigo compila o escopo do desenvolvimento de uma plataforma mecânica de baixo custo para ensaios imunoenzimáticos ELISA. A plataforma, que consiste em uma mesa XY, teve como princípio alcançar singularmente cada um dos poços de uma microplaca, que estão dispostos de maneira matricial na mesma. São apresentados os resultados parciais do protótipo juntamente ao material utilizado. Sugere-se futuramente a utilização de sensores de posição, e também foto-sensores para verificar a fluorescência das amostras nos poços. Em suma, para continuar o desenvolvimento dessa plataforma, esse projeto deve ser testado pela comunidade acadêmica, a fim de obter a realimentação de sugestões, validando assim o sistema.

Palavras-chave: Exame ELISA, Plataforma mecânica, Microplaca, Fluorescência.

Abstract - This paper aims at developing a low-cost mechanical platform for immunoenzyme ELISA assays. This platform, which consists in a XY table, is able to access each well in the microtiter plate, which are placed in matrix configuration. The partial results presented are the design prototype and the used materials. Further enhancements include the use of position sensors, and also photo-sensors to measure the fluorescence of the samples in the wells. Summarizing, in order to continue the development of the platform, this project must be used by the academic community, in order to get feedback suggestions and validate the system.

Key-words: ELISA assay, Mechanical platform, Microtiter plate, Fluorescence.

INTRODUÇÃO

A técnica de ensaio por imunoabsorção por ligação enzimática (*Enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA) é um teste imunoenzimático que detecta a presença de anticorpos e antígenos encontrados no plasma sanguíneo. Essa técnica utiliza plataformas proprietárias de elevado custo para executar exames sanguíneos, tornando-se um equipamento de difícil acesso.

Nos testes ELISA é comumente empregado o uso de placas de microtitulação, também chamadas de microplacas. Essas se caracterizam por possuírem uma superfície inerte com poços ao modelo de uma matriz. No interior desses poços são colocadas amostras de fluidos corpóreos cujas quantidades de antígeno é que se deseja determinar. Na sequência coloca-se uma quantidade conhecida de anticorpo específico capaz de se ligar ao antígeno de interesse. Esse anticorpo conecta-se à enzima da amostra de plasma sanguíneo a ser examinado, e por último é adicionada uma substância indicadora com características dependentes do complexo antígeno-anticorpo para que seja possível quantificar a presença do complexo a partir da análise do indicador presente. Este caso aborda também o teste ELISA baseado em fluorescência, que utiliza energia luminosa para fazer o indicador ser levado a um estado excitado. O processo de retorno da molécula indicadora para o estado não excitado é geralmente acompanhado pela emissão de fótons de fluorescência. Desta forma, o complexo

antígeno/anticorpo fluorescerá indicando a quantidade de antígenos na amostra através de correlação com a magnitude observada de fluorescência. Os ensaios ELISA tem grande impacto no diagnóstico de doenças e vírus (HIV, por exemplo), determinando a concentração de anticorpos no soro sanguíneo.

No presente artigo apresentam-se os resultados preliminares de uma plataforma mecânica de baixo custo destinada a ensaios imunoenzimáticos ELISA, com a finalidade de futura utilização para pesquisa.

MATERIAIS E MÉTODOS

A plataforma mecânica foi inspirada na necessidade de atender o acesso individual a cada um dos poços da placa de microtitulação, apresentada na figura 1. Como esta possui seus poços distribuídos de maneira matricial e igualmente espaçados, desenvolveu-se então uma mesa de deslocamento em direções ortogonais aqui denominadas XY para que seja possível alcançar singularmente cada poço da microplaca.

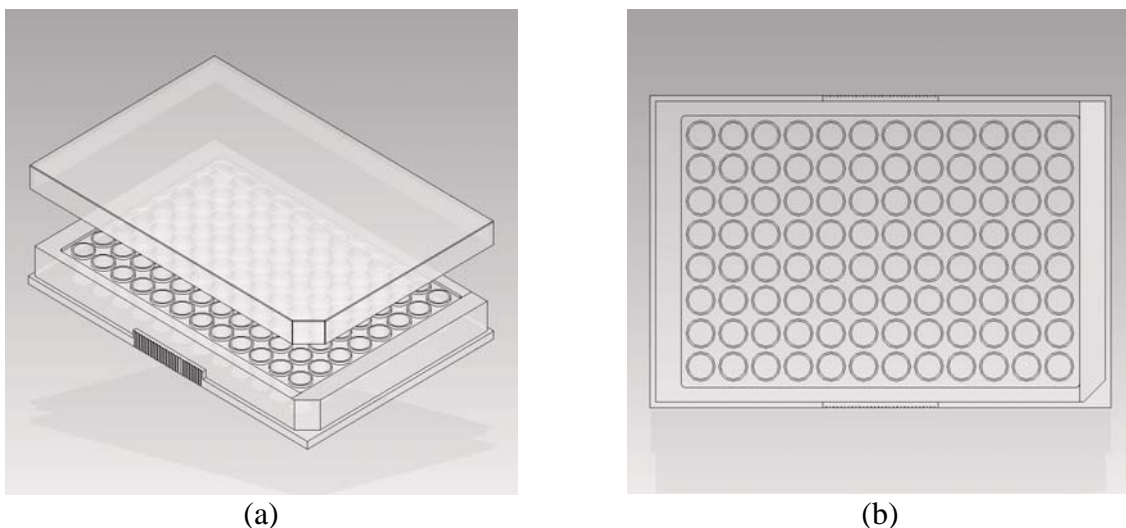


Figura 1. (a) Microplaca e respectiva tampa em vista isométrica; (b) microplaca em vista superior formando uma matriz composta por 96 poços.

Mesa XY. A mesa XY é um aparato que provê movimentos horizontais ao longo dos eixos X e Y em um dado plano, enquanto sua base permanece imóvel. Comumente essas mesas são motorizadas, promovendo movimento linear e posicionamento de alta precisão ao longo dos eixos de deslocamento.

Para o protótipo de plataforma mecânica utilizamos duas mesas de deslocamento linear, ou seja, apenas movimentos ao longo de um eixo, Iigus DryLin® SHT-12-AWM-200 [2] que utilizam um sistema de fuso roscado para o deslocamento do carro principal, conforme ilustra a figura 2. As mesas passaram pela modelagem de um *software* de desenho auxiliado por computador (*computer-aided design* – CAD). Ao acoplar ortogonalmente uma mesa acima da outra é possível obter deslocamento e posicionamento ao longo dos eixos X e Y.

Para promover a automação do movimento das mesas lineares foram utilizados motores de passo Akiyama® AK56H/3-1.8 [3] (figura 3) e *drivers* de controle de motor de passo Akiyama® AKDMP5-3.5A [4]. Os motores foram dimensionados para mover o carro principal das mesas lineares.

Para conectar o motor à mesa linear foram necessárias duas partes: (i) flange para conexão do motor à mesa linear e manter ambos ao mesmo nível; (ii) conexão flexível

ligando o eixo do motor ao fuso principal da mesa, compensando também possíveis efeitos de desalinhamento entre os eixos.

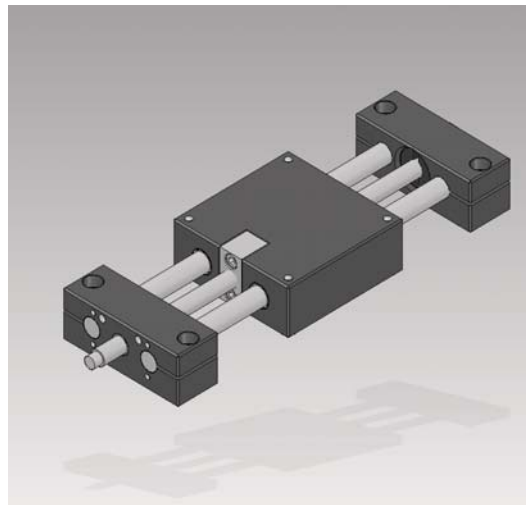
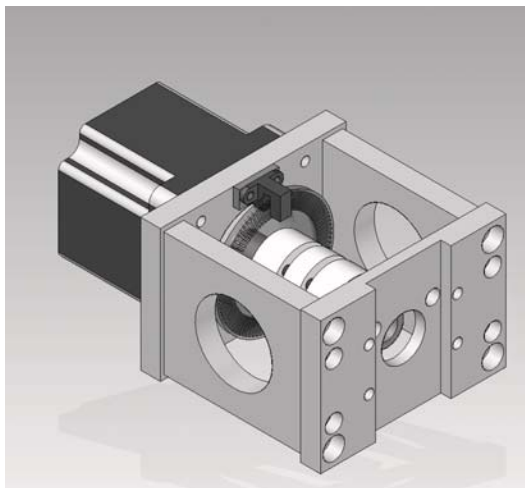
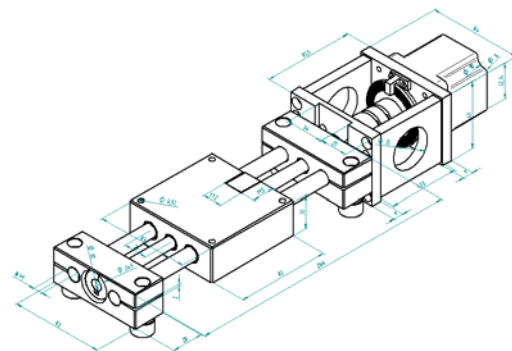


Figura 2. Modelo CAD da mesa linear SHT-12-AWM-200



(a)



(b)

Figura 3. (a) Modelo CAD da flange e conexão flexível montados com o motor; (b) O mesmo conjunto montado com a mesa linear em desenho CAD 2D cotado em vista isométrica.

Controle. O conjunto de mesas lineares é controlado em malha aberta através de um microcontrolador ATmega328 fabricado pela Atmel [5]. Através desse microcontrolador enviam-se ondas quadradas pelo gerador de PWM (*pulse width modulation*) onde cada pulso representa um passo a ser executado pelo *driver*. O *driver* por sua vez executa os passos transferindo energia para os motores de passo. Dessa forma, pode-se controlar em malha aberta a posição da micro-placa.

RESULTADOS

Alguns resultados parciais obtidos em relação ao desenvolvimento do protótipo de plataforma mecânica para exames imunoenzimáticos ELISA são o projeto CAD do sistema, apresentado na figura 4, e algumas peças submetidas à usinagem.

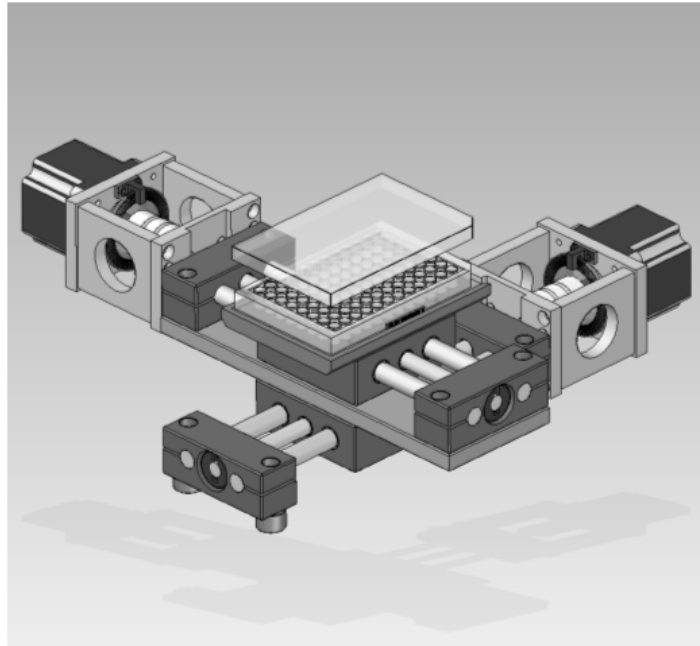


Figura 4. Sistema mecânico da plataforma de exames ELISA juntamente com a microplaca acoplada acima do sistema.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Propõe-se três trabalhos futuros: (i) inserir um sistema de micropipetas para que seja possível dosar as amostras de sangue na matriz de poços da microplaca utilizando o sistema de coordenadas XY proposto; (ii) A inserção de um sensor óptico que possibilite a detecção automática dos poços cuja amostra respondeu fluorecendo ao estímulo luminoso específico; (iii) Por fim, utilizar o sistema desenvolvido para ensaios imunoenzimáticos ELISA como plataforma de pesquisa para a comunidade acadêmica, que proverá realimentação através de sugestões após testes, validando assim o sistema.

REFERÊNCIAS

- [1] CLARK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *J. gen. Virol.* 34, p. 475-483, 1977.
- [2] TECHNOMIC. DryLin® - Drive engineering. Disponível em: <<http://www.igus.com.br/wpck/default.aspx?PageNr=2361>>. Acesso em 24 ago. 2010.
- [3] AKIYAMA. Data Sheet AK56H3-18. Disponível em : <http://www.akiyama.com.br/site/download.php?file=_files/aky-a7-ak56h3-18.pdf>. Acesso em 24 ago. 2010.
- [4] AKIYAMA. Data Sheet AKDMP5-3.5A. Disponível em: <http://www.akiyama.com.br/site/download.php?file=_files/Manual%20%20AKDMP5-3.5%20A.pdf>. Acesso em 24 ago. 2010.
- [5] ATMEL. ATmega328 - site do fabricante. Disponível em: <http://www.atmel.com/dyn/products/product_card.asp?PN=ATmega328P>. Acesso em 24 ago. 2010.