

Bagé, RS / Dezembro, 2023

A necessidade da etapa de bloqueio em ensaios de ELISA

Wanessa Araújo Carvalho⁽¹⁾, Nicole Tafnes de Brito Silva Honório⁽²⁾, Clarissa Vidal de Carvalho⁽³⁾, Robert Domingues⁽⁴⁾, Márcia Cristina de Azevedo Prata⁽⁵⁾ e Emanuelle Baldo Gaspar⁽⁶⁾

⁽¹⁾ Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾ Bolsista PIBIC CNPq Embrapa Pecuaría Sul, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. ⁽³⁾ PIBIC CNPq Embrapa Gado de Leite, Universidade Federal Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾ Analista, Embrapa Pecuaría Sul, Bagé, RS. ⁽⁵⁾ Pesquisadora, Embrapa Gado de Leite, Bagé, RS. ⁽⁶⁾ Pesquisadora, Embrapa Pecuaría Sul, Bagé, RS.

Resumo – O ensaio imunoenzimático (ELISA) é um teste imunológico, realizado em fase sólida (placa) por meio de várias etapas sequenciais, rotineiramente utilizado para diagnóstico de doenças humana ou animal. Após a sensibilização da placa, pode ser feita a etapa de bloqueio, com a adição de alguma macromolécula com a finalidade de bloquear os sítios de ligação inespecíficos. A soroalbumina bovina (BSA) e o leite desnatado são os dois agentes bloqueadores mais comumente utilizados. A maioria dos testes de ELISA utiliza a etapa de bloqueio, apesar da literatura demonstrar que esta etapa pode ser dispensável. O objetivo deste trabalho foi testar a necessidade da etapa de bloqueio com BSA ou leite desnatado, em um teste de ELISA indireto para pesquisa de IgG antiextrato de larvas de carrapatos (ELC). A adição da etapa de bloqueio não alterou significativamente os valores de absorvância, com três diluições diferentes de antígeno adsorvido à placa, nem com sete diferentes diluições de soro (analito). Recomenda-se que, ao padronizar um novo teste de ELISA para pesquisa de anticorpos bovinos, seja incluída na análise a necessidade ou não de bloqueio, já que ao eliminar uma das etapas, pode-se encurtar o tempo de ensaio e baratear o custo de execução da técnica.

Termos para indexação: ensaio imunoenzimático; imunidade humoral; teste diagnóstico.

The need for the blocking step in ELISA assays

Abstract – Most ELISA tests use the blocking step, although the literature shows that this step may be unnecessary. The objective of this study was to test the need for the blocking step with BSA or skimmed milk in an indirect ELISA test for IgG anti-tick larvae extract (TLE). The addition of the blocking step did not significantly change the absorbance values, with three different dilutions of antigen adsorbed to the plate, nor with seven different dilutions of serum (analyte). We recommend that, when standardizing a new ELISA for the search for bovine antibodies, the need for blocking be included in the

Embrapa Pecuaría Sul
BR 153, Km 632,9.
Caixa postal 242
96401-970 - Bagé - RS
Tel/Fax: (53) 3240-4650
www.embrapa.br/pecuaria-sul
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente
Marcos Flávio Borba
Secretário-executivo
Gustavo Trentin
Membros
Gustavo Martins da Silva, Graciela Olivella Oliveira, Marco Antonio Karam Lucas, Ana Cristina Mazzocato, João Carlos Pinto Oliveira, Magda Vieira Benavides, Márcia Cristina Teixeira da Silveira, Lisiane Bassols Brisolara

Edição executiva
Gustavo Trentin
Revisão de texto
Felipe Rosa

Normalização bibliográfica
Graciela O. Oliveira (CRB-10/1434)
Projeto gráfico
Leandro Sousa Fazio
Diagramação
Daniela Garcia Collares
Publicação digital (2023): PDF

Todos os direitos reservados à Embrapa.

analysis, as by eliminating one of the steps, the assay time can be shortened and the cost of carrying out the test can be reduced.

Index terms: enzyme immunoassay; humoral immunity; diagnostic test.

Introdução

O ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês *enzyme linked immunosorbent assay*) surgiu no início dos anos 1970, como uma evolução do teste de radioimunoensaio, desenvolvido em 1960, a princípio para detecção de insulina (Yalow; Berson, 1960). Tanto o ELISA quanto os radioimunoensaios são testes imunológicos (ou sorológicos), ou seja, dependem do reconhecimento de moléculas por anticorpos específicos. Testes imunológicos revolucionaram o diagnóstico de doenças, pois, devido à alta especificidade da ligação antígeno-anticorpo podem, virtualmente, ser utilizados para detecção de qualquer patógeno. Além do uso no diagnóstico de doenças humanas ou veterinárias, estes testes possuem várias outras aplicações, tais como, diagnóstico de doenças de plantas, detecção de substâncias contaminantes ou alergênicas em alimentos, exames antidoping, dosagem de proteínas séricas, entre outros (Gaspar et al., 2015).

Nos testes de ELISA as reações ocorrem em uma fase sólida, sendo a mais comum a placa de 96 poços de poliestireno, de fundo chato. Na primeira etapa do teste, o antígeno (ELISA indireto) ou o anticorpo de captura (ELISA sanduíche) é adsorvido na placa em tampão apropriado para cada substância. A segunda etapa envolve, normalmente, a adição do analito, por exemplo, soro, plasma, outros fluidos corporais, sobrenadante de cultura de células, etc. Na terceira etapa utiliza-se o anticorpo analito-específico, marcado com uma enzima e, finalmente, procede-se a revelação da reação, com cromógeno. Entre as etapas, a placa é lavada em tampão, normalmente acrescido de um detergente neutro. Dependendo da configuração do teste, mais etapas podem ocorrer (Crowther, 2008). Comumente, a primeira etapa, de adsorção, é feita *overnight* e as demais etapas por uma ou duas horas a 37 °C, o que faz com que o teste seja laborioso e demorado. Ademais, a maioria dos protocolos envolvem a adição de uma etapa de bloqueio, entre a primeira e a segunda etapa do teste. Esta visa bloquear os sítios de ligação remanescentes na fase sólida do teste (placa) de forma a evitar a ligação inespecífica dos componentes subsequentes à placa, evitando ou diminuindo a ocorrência de resultados falso-positivos. (Esser, 1991; Crowther, 2008). Por outro lado, a realização desta etapa acrescenta pelo menos mais uma hora de incubação, aumenta o gasto com reagentes e, ainda, pode aumentar a incerteza do teste ocasionada por erros de pipetagem.

Idealmente, o agente bloqueador deve ser grande o suficiente para estabelecer ligações estáveis à superfície da

placa, mas pequeno o suficiente para “cabem” nos espaços deixados entre os componentes do teste (antígeno ou anticorpo). Tipicamente, macromoléculas neutras são utilizadas para este propósito (Esser, 1991). Dentre estas macromoléculas, é comum o bloqueio ser realizado com soroalbumina bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) ou com leite desnatado, sendo que este, além de ser muito mais barato, pode ser melhor agente bloqueador que a BSA (Vogt Junior et al., 1987). Outras proteínas podem ainda ser utilizadas com a finalidade de bloqueio (Lange et al., 1992; Vogt Junior et al., 1987; Johnson et al., 1984).

O uso de tampões com detergente pode interferir com propriedades físico-químicas das proteínas utilizadas como bloqueadores e polissorbato 20, comercialmente conhecido com Tween 20 (Esser, 1991), que é o detergente mais comumente utilizado em ELISA e que interfere no módulo de cisalhamento elástico de BSA mais do que outros surfactantes, tais como Triton X-100 ou Triton X-405 (Vaidya; Narváez, 2014). Além disso, já foi demonstrado que a etapa de bloqueio é desnecessária em *Western blotting* e *dot blotting*, quando polissorbato 20 é adicionado ao tampão de lavagem (Mohammad; Esen, 1989). Também já foi demonstrado que a etapa de bloqueio com BSA pode ser dispensada em testes de ELISA de captura (Ahirwar et al., 2015) e em outras configurações de teste imunológico, por exemplo, baseado em fluorescência microfluídica (Li et al., 2009, 2011). Ademais, BSA pode sofrer variação conforme o lote ou o fabricante e algumas BSAs podem reagir inespecificamente com componentes do teste, promovendo resultados falso-positivos (Xiao; Isaacs, 2012). Tanto BSA (Miura et al., 2005) quanto leite em pó desnatado (Abernethy et al., 2010; Cakebread et al., 2018) podem conter IgG bovina, o que já é um problema em qualquer teste de ELISA, porém é agravado quando o analito é IgG bovina, pois há aumento na possibilidade de reação falso positivo, por adsorção direta desta subclasse de imunoglobulina à placa.

Recentemente, a equipe das Embrapa Pecuária Sul e Gado de Leite padronizou um teste de ELISA para detectar a resposta humoral de IgG antiextrato de larva de carrapatos (ELC) em bovinos (dados não mostrados). Neste trabalho, o teste previamente padronizado, foi utilizado como modelo para verificar a necessidade da etapa de bloqueio. Para isso, foram utilizados soro de animais “naive” e de animais com respostas intermediárias e fortes contra EGL em um teste de ELISA indireto. As placas foram adsorvidas com diferentes concentrações de ELC ou foram testadas diferentes diluições dos soros teste. Bloqueio com BSA ou leite desnatado foi comparado com a ausência de bloqueio em placas de poliestireno duas marcas distintas, sendo a marca A indicada para a alta ligação de biomoléculas maiores que 10 kDa que possuam grupos iônicos e/ou regiões hidrofóbicas e a marca B indicada para a ligação de proteínas e biomoléculas que possuam características hidrofílica/hidrofóbica.

Material e métodos

Antígeno

Fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) foram coletadas de animais doadores e mantidas a 28 °C com umidade relativa de 70-80% por 3 dias (BOD) para oviposição. Os ovos coletados foram mantidos por mais 40 dias, nas mesmas condições, para eclosão das larvas. As larvas foram coletadas e anestesiadas por exposição à temperatura de -20 °C por 10 minutos. Em seguida, um número estimado de 20.000 larvas, proveniente de 1g de ovos, foi macerado em gral/pistilo, com 500 µL de solução salina tamponada (PBS, do inglês *phosphate buffer saline*). Foram adicionados mais 2,5 ml de PBS e o material foi sonificado três vezes por um minuto, com intervalo de um minuto, a 40% da frequência máxima do sonificador (20 kHz), sobre gelo. Em seguida, o material foi centrifugado (14.000 g/30 min a 4 °C) para remoção do pellet. Foram adicionados 15 µL de coquetel inibidor de protease e fosfatase (SigmaAldrich) ao sobrenadante, que constitui o extrato de larvas de carrapatos (ELC). O ELC foi mantido até o uso em temperatura de -20 °C. A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Banco de soros

O banco de soros utilizado para esse teste foi composto por nove amostras diferentes, com perfis de resposta humoral ao ELC conhecido. Três soros são de animais negativos (-), três de animais com resposta intermediária (++) e três de animais altamente respondedores ao ELC (+++). Os animais eram provenientes de um experimento no qual os bezerros foram separados de suas mães ao nascimento e alimentados com colostro em pó (The Saskatoon Colostrum Company) produzido e embalado no Canadá, que é uma região livre de carrapatos *R. microplus*. Foram realizadas três infestações artificiais seriadas com larvas de carrapatos nestes animais e a resposta humoral ao ELC foi determinada por ELISA (dados ainda não publicados). Esse experimento foi registrado na Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite sobre o número de protocolo 1055060418.

ELISA (do inglês, *enzyme lynked immunossorbent assay*)

Foram realizados testes de ELISA com variação na concentração de antígeno adsorvido na placa ou dos soros, comparando-se o bloqueio com albumina

sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumine*), leite desnatado ou sem bloqueio, conforme detalhado a seguir.

ELISA com variação na quantidade de antígeno adsorvido

Placas das marcas A e B foram adsorvidas com 0,1; 1 ou 10 µg/poço de ELC diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,5 (SigmaAldrich) a 4 °C, *overnight*, 100 µL/poço. Em seguida as placas foram incubadas com 200 µL/poço de BSA (Promega) 2% ou leite desnatado (Oxoid) 5% diluídos em PBS por uma hora a 37 °C. Na placa controle, sem bloqueio, os poços foram mantidos úmidos pela adição de PBS. Na etapa seguinte foi adicionado 100 µL/poço de soro de animais sabidamente negativos, positivos fracos ou positivos fortes, diluídos a 1/200 em PBS acrescido de polissorbato 20 (Tween ® 20) à concentração de 0,05% (PBS-T) por 1 hora a 37 °C. Foram adicionados controles só com cada um dos soros (em poços sem antígeno) e só com antígeno (sem soro). O anticorpo secundário, produzido em ovinos anti-IgG bovina e conjugado com peroxidase, foi diluído a 1/20.000 em PBS-T e as placas foram incubadas com 100 µL/poço por uma hora a 37 °C. Finalmente, as placas foram incubadas com OPD (o-fenilenediamina) (Sigmafast™) diluído conforme instruções do fabricante e, após 15 minutos, a reação foi parada pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 3M. Entre cada uma das etapas as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-T. Finalmente procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de placas em 492 nm.

ELISA com variação na quantidade de antígeno adsorvido

Placas Corning® high binding ou Nunc® Maxi-Sorp™ foram adsorvidas 1 µg/poço de ELC diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,5 (Sigma-Aldrich) a 4 °C, *overnight*, 100 µL/poço. Em seguida foram incubadas com 200 µL/poço de BSA (Promega) 2% ou leite desnatado (Oxoid) 5% diluídos em PBS por uma hora a 37 °C. Na placa controle, sem bloqueio, os poços foram mantidos úmidos pela adição de PBS. Na etapa seguinte foi adicionado 100 µL/poço de soro de animais sabidamente negativos, positivos fracos ou positivos fortes nas diluições 1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600; 1/3200 e 1/6400 em PBS-T por uma hora a 37 °C. Foi adicionado controle sem soro.

O anticorpo secundário, produzido em ovinos anti-IgG bovina e conjugado com peroxidase, foi diluído a 1/20.000 em PBS-T e as placas foram incubadas com 100 µL/poço a 37 °C. Finalmente, as placas foram incubadas com OPD (o-fenilenediamina) (Sigmafast™) diluído conforme instruções do fabricante e, após 15 minutos, a reação foi parada pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 3M. Entre cada uma das etapas as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-T. Finalmente procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de placas em 492 nm.

Análises estatísticas

Os dados brutos de absorbância obtidos para cada uma das amostras foram, inicialmente, corrigidos por remoção da absorbância média dos controles negativos para cada um dos testes (sem soro ou sem antígeno). A partir destes dados corrigidos foram realizados testes de two-way ANOVA (efeitos do tipo de bloqueio, do grau de positividade e da interação) seguido de testes de Tukey ($\alpha = 0,05$) para comparação entre os três tipos de bloqueio.

Resultados e discussão

Placas de plástico de 96 poços são as mais comumente utilizadas para a execução de testes de ELISA, sendo que os espectrofotômetros para leitura já estão adaptados para este formato. Embora policarbonato e polipropileno possam ser utilizados na confecção das placas, as mais comuns são de poliestireno. Estes materiais inertes permitem a ligação de uma ampla variedade de biomoléculas por meio de múltiplas interações moleculares fracas formando uma ligação estável (Esser, 1991). Porém, diferentes tratamentos podem ser realizados nestas superfícies plásticas, para melhorar a capacidade de ligação. Neste trabalho foram usadas placas de poliestireno duas marcas distintas, sendo a marca A indicada para a alta ligação de biomoléculas maiores que 10 kDa que possuam grupos iônicos e/ou regiões hidrofóbicas e a marca B indicada para a ligação de proteínas e biomoléculas que possuam características hidrofílica/hidrofóbica.. As placas *high binding* são apropriadas para ligação de biomoléculas médias a grandes que possuem grupos iônicos ou regiões hidrofóbicas. Por outro lado, as placas MaxiSorp® são otimizadas para a ligação de biomoléculas hidrofílicas (informações disponibilizadas pelos fabricantes). Aqui, os valores

de absorbância nos dois tipos de placas não foram muito diferentes, provavelmente porque o antígeno adsorvido no primeiro passo do teste é um extrato (de larvas de carrapatos), composto por uma ampla variedade de proteínas (Untalan et al., 2005), tanto com características hidrofóbicas, quanto hidrofílicas. A adsorção às placas foi feita overnight a 4 °C, pois, embora a adsorção máxima ocorra com cerca de 2 horas, para estabilização são necessárias pelo menos 6 horas (Thermo..., 2011). Embora estes tempos sejam dependentes de temperatura, não é conveniente aumentar muito a temperatura nesta etapa, pois pode haver desnaturação das proteínas do extrato antigênico, o que mudaria sua configuração dos epítomos (Abbas, 2012), dificultando a ligação aos anticorpos presentes no soro teste (analito).

Na primeira bateria de testes avaliou-se a adsorção de 0,1; 1 ou 10 µg/poço de ELC diluído em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9.6). Nesta bateria os soros teste foram diluídos a 1/200. Não houve diferença significativa na absorbância dos poços testados sem bloqueio, com BSA ou com leite desnatado em nenhuma das concentrações de antígeno (ELC) adsorvidas. Nem nas placas *high binding* (figura 1a), nem nas placas MaxiSorp® (figura 1b). Outra análise que podemos fazer é a razão entre as absorbâncias dos soros positivos/soros negativos. Na padronização de um teste, o ideal é que esta razão seja pelo menos 2, ou seja, os positivos tenham absorbância duas vezes maior que os negativos (Crowther, 2008). Isso é particularmente importante para testes de pesquisa de anticorpos, já que animais, ainda que negativos para o antígeno estudado, estão constantemente produzindo anticorpos para uma ampla variedade de antígenos e estes anticorpos podem se ligar inespecificamente à placa (sem dependência do antígeno adsorvido à placa). Por isso a absorbância dos poços nos quais o analito é proveniente de animais negativos raramente ficará próxima de zero. Neste trabalho, foi possível observar que as razões dos soros positivos intermediários (++) ou positivos fortes (+++) com os soros negativos ficaram muito próximas, independentemente da adição da etapa de bloqueio ou do tipo de bloqueio (BSA ou leite desnatado) para todas as concentrações de antígeno testadas (tabela 1).

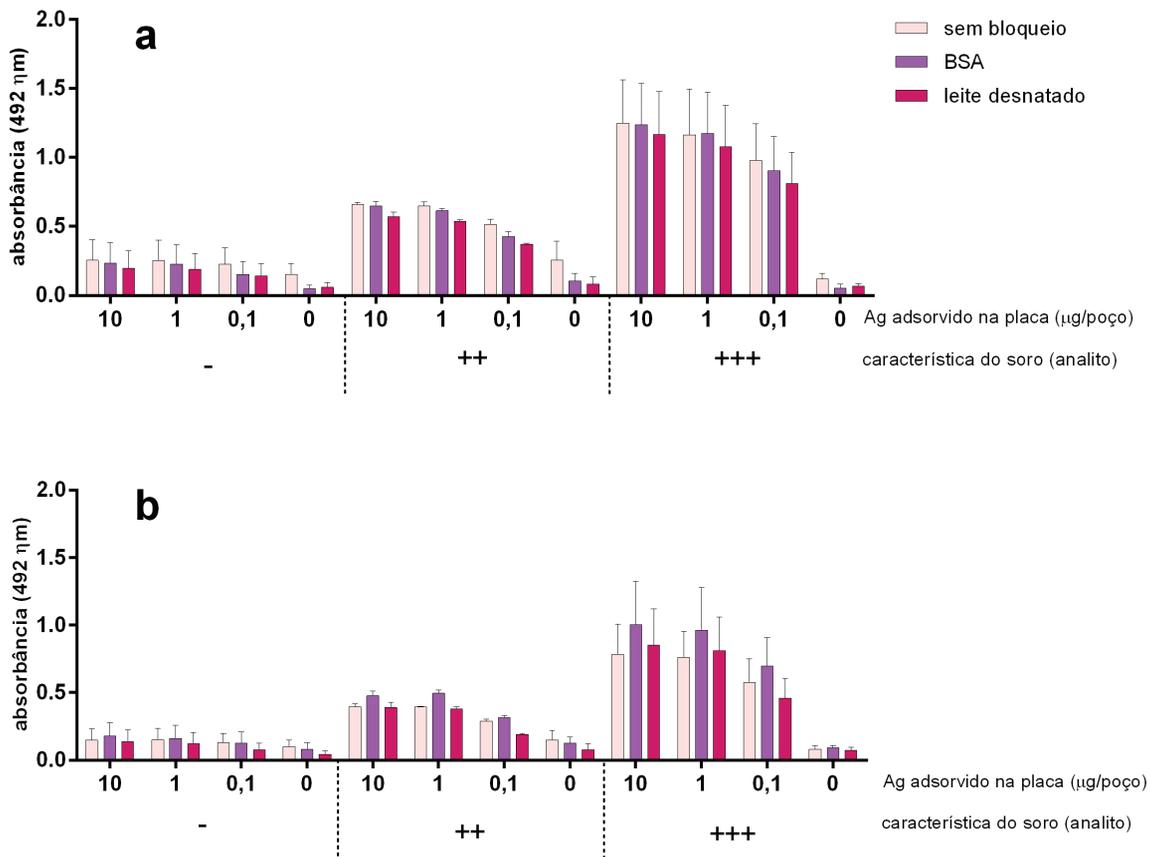


Figura 1. ELISA para detecção de IgG antiextrato de larvas de carrapatos (ELC) no soro de animais não respondedores (-) (animais naïve para infestação por carrapatos, alimentados ao nascimento com colostro proveniente de região livre de carrapatos); respondedores intermediários (++) ou respondedores fortes (+++) expostos controladamente à infestação por carrapatos, selecionados a partir de um banco de soros. As concentrações antígeno (Ag) adsorvido na placa foram de 10; 1; 0,1 ou 0 µg de ELC/poço. (a) placas da marca A e da marca B, sendo de sendo a marca A indicada para a alta ligação de biomoléculas maiores que 10 kDa que possuam grupos iônicos e/ou regiões hidrofóbicas e a marca B indicada para a ligação de proteínas e biomoléculas que possuam características hidrofílica/hidrofóbica.

Tabela 1. Razão entre a absorbância no soro positivo e no soro negativo. Placas *high binding* ou Maxisorp®. Quanto mais escuro o tom de verde, maior a razão.

	Marca A						Marca B					
	++			+++			++			+++		
[Ag]	SB	BSA	LD	SB	BSA	LD	SB	BSA	LD	SB	BSA	LD
10	2.24	2.25	2.27	4.05	4.02	4.30	2.19	2.14	2.10	4.03	4.16	4.11
1	2.25	2.24	2.27	3.88	4.03	4.20	2.16	2.40	2.25	3.90	4.35	4.35
0.1	2.01	2.17	2.05	3.62	4.20	4.11	1.86	1.95	1.77	3.39	3.83	3.57

*[Ag] = concentração do antígeno (ELC) em µg/poço; SB = sem bloqueio; BSA = bloqueio com soroalbumina bovina; LD = bloqueio com leite desnatado. Animais expostos controladamente à infestação por carrapatos, selecionados a partir de um banco de soros com positividade intermediária (++) ou forte (+++).

Na segunda bateria de testes, manteve-se a concentração de antígeno (ELC) constante (1 µg/poço) e variou-se a diluição do analito (soro teste), por meio de diluição seriada, na base dois, de 1/100 até 1/6400. Da mesma forma, não houve diferença significativa na comparação sem bloqueio ou bloqueado com BSA ou leite desnatado. Tanto nas placas *high binding* (figura 2a) quanto nas placas

Maxisorp™ (figura 2b). As razões dos soros positivos intermediários (++) ou positivos fortes (+++) com os soros negativos também ficaram muito próximas, independentemente da adição da etapa de bloqueio ou do tipo de bloqueio (BSA ou leite desnatado) para todas as concentrações de antígeno testadas (tabela 2).

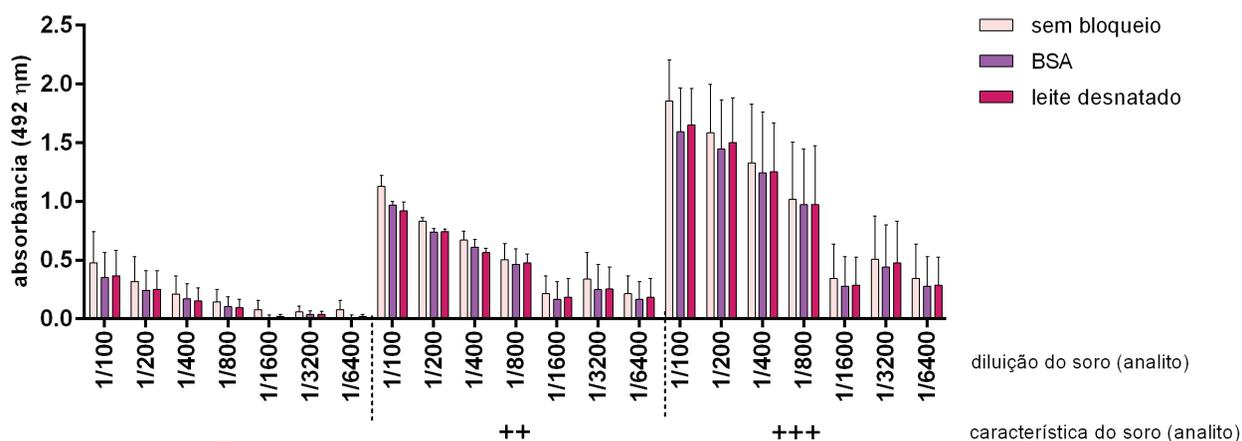


Figura 2. ELISA para detecção de IgG antiextrato de larvas de carrapatos (ELC) no soro de animais não respondedores (-) (animais naïve para infestação por carrapatos, alimentados ao nascimento com colostro proveniente de região livre de carrapatos); respondedores intermediários (++) ou respondedores fortes (+++) expostos controladamente à infestação por carrapatos, selecionados a partir de um banco de soros. Os soros foram diluídos na base dois, de 1/100 até 1/6400 em placas da marca A.

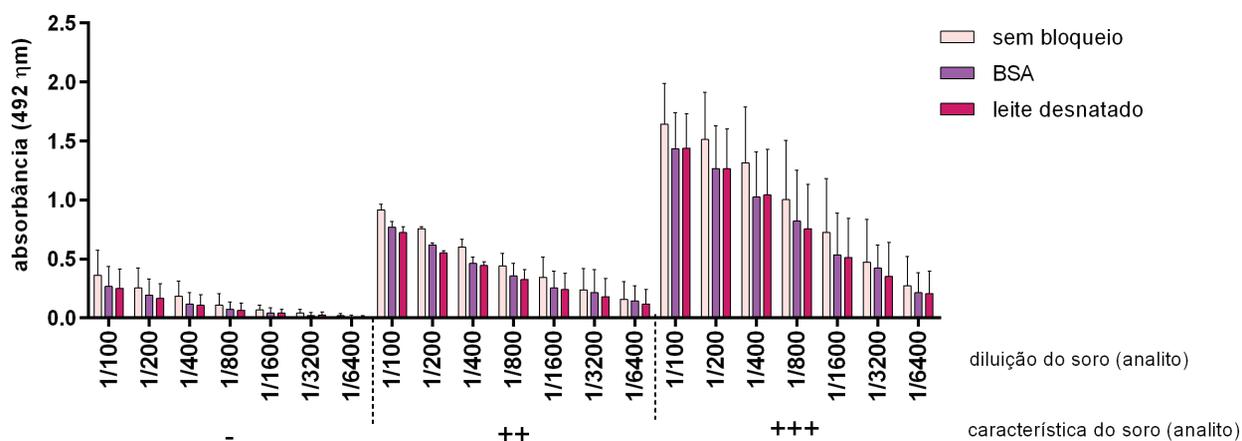


Figura 3. ELISA para detecção de IgG antiextrato de larvas de carrapatos (ELC) no soro de animais não respondedores (-) (animais naïve para infestação por carrapatos, alimentados ao nascimento com colostro proveniente de região livre de carrapatos); respondedores intermediários (++) ou respondedores fortes (+++) expostos controladamente à infestação por carrapatos, selecionados a partir de um banco de soros. Os soros foram diluídos na base dois, de 1/100 até 1/6400 em placas da marca B.

Tabela 2. Razão entre a absorbância no soro positivo e no soro negativo. Placas *high binding* ou Maxisorp®. Quanto mais escuro o tom de verde, maior a razão.

dil soro	Costar® high binding						Nunc® Maxisorp™					
	++			+++			++			+++		
	SB	BSA	LD	SB	BSA	LD	SB	BSA	LD	SB	BSA	LD
1/100	2.14	2.26	2.15	3.40	3.55	3.66	2.25	2.30	2.32	3.90	4.01	4.31
1/200	2.23	2.30	2.35	4.04	4.17	4.43	2.50	2.37	2.40	4.76	4.44	5.01
1/400	2.47	2.42	2.52	4.58	4.47	5.08	2.58	2.47	2.57	5.29	4.85	5.36
1/800	2.46	2.50	2.82	4.56	4.60	5.18	2.73	2.46	2.53	5.68	4.86	5.05
1/1600	2.60	2.71	2.76	4.37	4.49	5.06	2.86	2.32	2.37	5.44	4.06	4.23
1/3200	2.78	2.23	2.42	3.85	3.34	3.88	2.65	2.41	2.18	4.59	3.88	3.49
1/6400	1.77	2.07	2.22	2.51	2.84	2.98	2.42	2.02	1.95	3.58	2.54	2.71

**dil soro = diluição do soro; SB = sem bloqueio; BSA = bloqueio com soroalbumina bovina; LD = bloqueio com leite desnatado. Animais expostos controladamente à infestação por carrapatos, selecionados a partir de um banco de soros com positividade intermediária (++) ou

A etapa de bloqueio é recomendada na maioria dos testes de ELISA (Crowther, 2008). O objetivo desta etapa é promover a “cobertura” dos sítios de ligação da placa onde o componente primário (substância adsorvida à placa na primeira etapa) não aderiu (Esser, 1991). Vários agentes bloqueadores podem ser utilizados (Lange et al., 1992; Johnson et al., 1984; Vogt Junior et al., 1987), mas BSA e leite desnatado figuram-se entre os mais utilizados, até porque são facilmente disponíveis e, no caso do leite desnatado, bastante acessível financeiramente, além de poder ser até mais eficaz que BSA (Vogt Junior et al., 1987). Em 2015, porém, Ahirwar e colaboradores (2015) demonstraram que a etapa de bloqueio com BSA não é necessária. Eles usaram um modelo de ELISA sanduíche, no qual as placas foram adsorvidas inicialmente com anticorpos de captura anti-IgG e IgE humanas, IgG de coelho e concanavalina A (ConA). Em nenhum dos casos houve necessidade de bloqueio com BSA. Eles demonstraram que as lavagens com PBS-T subsequentes à etapa de bloqueio na verdade removem a BSA da placa e este seria o motivo pelo qual o bloqueio não faz diferença no resultado final.

Aqui, foi testada a necessidade de bloqueio usando antígeno de carrapato e soro de bovinos negativos, positivos intermediários e positivos fortes. Além de BSA também testamos leite desnatado. Para testes de diagnóstico de resposta imunológica em bovinos, estes agentes bloqueadores têm ainda uma outra possível desvantagem. Alguns lotes de BSA podem conter anticorpos bovinos, assim como o leite desnatado, uma vez que as imunoglobulinas são secretadas no leite das vacas (Abernethy et al., 2010). Isso poderia levar à ligação inespecífica de IgG na placa e, como o anticorpo secundário reconhece Fc de IgG bovina, poderia se ligar inespecificamente a esta IgG, que não necessariamente está relacionada ao antígeno. Porém, no caso em análise isso não aconteceu, uma vez que os valores de absorbância com e sem bloqueio foram similares. Uma possível explicação é que o suporte plástico das placas já poderia ter sido saturado com o antígeno adicionado na primeira etapa, ou que a quantidade de IgG na BSA ou no leite desnatado estivesse abaixo do limite de detecção da técnica.

Conclusões

No teste de ELISA indireto para pesquisa de IgG anti-ELC a etapa de bloqueio mostrou-se desnecessária. Desta forma, recomenda-se que, ao padronizar um novo teste de ELISA para pesquisa de anticorpos bovinos, seja incluída na análise a necessidade ou não de bloqueio, já que ao eliminar uma das etapas, pode-se encurtar o tempo, baratear o custo de execução da técnica e diminuir chances de possíveis vieses.

Referências

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2012. 558 p.
- ABERNETHY, G.; OTTER, D. Determination of immunoglobulin G in bovine colostrum and milk powders, and in dietary supplements of bovine origin by protein G affinity liquid chromatography: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 93, n. 2, p. 622-627, Mar./Apr. 2010.
- AHIRWAR, R.; BARIAR, S.; BALAKRISHNAN, A.; NAHAR, P. BSA blocking in enzyme-linked immunosorbent assays is a non-mandatory step: a perspective study on mechanism of BSA blocking in common ELISA protocols. **RSC Advances**, v. 5, n. 121, p. 100077-100083, Nov. 2015.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, May 1976.
- CAKEBREAD, J.; HODGKINSON, A.; WALLACE, O.; CALLAGHAN, M.; HURFORD, D.; WIELICZKO, R.; HARRIS, P.; HAIGH, B. Bovine milk derived skimmed milk powder and whey protein concentrate modulates *Citrobacter rodentium* shedding in the mouse intestinal tract. **PeerJ**, v. 6, p. e5359, July 2018.
- CROWTHER, J. R. **The ELISA guidebook**. Totowa: Humana, 2008. 421 p. (Methods in molecular biology, v. 149).
- ESSER, P. Blocking agent and detergent in ELISA. **Nunc Bulletin**, v. 6, n. 9, p. 1-4, 1991.
- GASPAR, E.; MINHO, A. P.; dos SANTOS, L. R.; YOSHIHARA, E. Embrapa pecuária Sul. **Diagnóstico veterinário por ensaio imunoabsorvente ligado à enzima**: revisão atualizada. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2015. 28 p. (Embrapa Pecuária Sul. Documentos, 145).
- JOHNSON, D. A.; GAUTSCH, J. W.; SPORTSMAN, J. R.; ELDER, J. H. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. **Gene Analysis Techniques**, v. 1, n. 1, p. 3-8, Jan. 1984.
- LANGE, R.; BOCKLAGE, H.; SCHNEIDER, T.; KÖLMEL, H. W.; HEESEMANN, J.; KARCH, H. Ovalbumin blocking improves sensitivity and specificity of immunoglobulin M immunoblotting for serodiagnosis of patients with erythema migrans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 229-232, Jan. 1992.
- LI, P.; NARAYANAN, R.; SHERRY, A. J.; CORTES, J. A.; MARCHESSEAU, A.; ANAGNOSTOPOULOS, C.; FAGHRI, M. A blocking-free microfluidic fluorescence heterogeneous immunoassay for quantitative detection of human C-reactive protein. **Proceedings of the ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition**, v. 12, p. 439-443, Nov. 2009.
- LI, P.; SHERRY, A. J.; CORTES, J. A.; ANAGNOSTOPOULOS, C.; FAGHRI, M. A blocking-free microfluidic fluorescence heterogeneous immunoassay for point-of-care diagnostics. **Biomed Microdevices**, v. 13, n. 3, p. 475-483, June 2011.
- MOHAMMAD, K.; ESEN, A. A blocking agent and a blocking step are not needed in ELISA, immunostaining dot-blots and western blots. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n. 1, p. 141-145, Feb. 1989.
- MIURA, H.; KITANO, M.; YONEYAMA, A.; KUWAHARA, A.; MORIYAMA, K.; KITAJIMA, S. IgG heterophile antibody causes false positivity for CA19-9, which is overcome with bovine immunoglobulin. **The Japanese Journal of Clinical Pathology**, v. 53, n. 12, p. 1103-1108, Dec. 2005.
- THERMO Scientific Pierce assay development technical handbook. Waltham: Thermo Fisher Scientific, 2011. 73 p. Disponível em: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602127-Assay-Development-Handbook.pdf>. Acesso em: 16 nov. 2023.
- UNTALAN, P. M.; GUERRERO, F. D.; HAINES, L. R.; PEARSON, T. W. Proteome analysis of abundantly expressed proteins from unfed larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 2, p. 141-151, Feb. 2005.
- VAIDYA, S. V.; NARVÁEZ, A. R. Understanding interactions between immunoassay excipient proteins and surfactants at air-aqueous interface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 285-294, Jan. 2014.
- VOGT JUNIOR, R. F.; PHILLIPS, D. L.; HENDERSON, L. O.; WHITFIELD, W.; SPIERTO, F. W. Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates. **Journal of Immunological Methods**, v. 101, n. 1, p. 43-50, July 1987.

XIAO, Y.; ISAACS, S. N. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)-not all BSAs are alike. **Journal of Immunological Methods**, v. 384, n. 1-2, p. 148-151, Oct. 2012.

YALOW, R. S.; BERSON, S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. **Journal of Clinical Investigation**, v. 39, n. 7, p. 1157-1175, July 1960.



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA
E PECUÁRIA