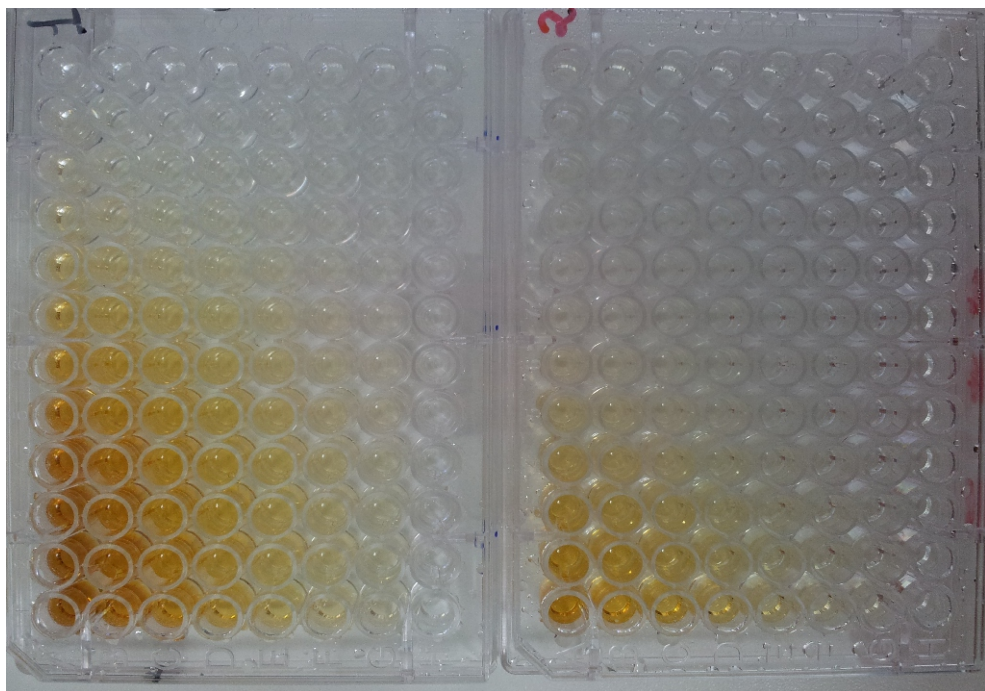


Diagnóstico Veterinário por Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima: Revisão Atualizada



ISSN 1982-5390

Novembro, 2015

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sul
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 145

Diagnóstico Veterinário por Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima: Revisão Atualizada

*Emanuelle Baldo Gaspar
Alessandro Pelegrine Minho
Lenita Ramires dos Santos
Eidi Yoshihara*

Embrapa Pecuária Sul
Bagé, RS
2015

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sul

BR 153, Km 603. Caixa postal 242
96401-970 - Bagé – RS
Fax: 55 53 3240-4650
<https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac>

Comitê Local de Publicações

Presidente: Cláudia Cristina Gulias Gomes
Secretária-Executiva: Graciela Olivella Oliveira
Membros: Estefanía Damboriarena, Fernando Flores Cardoso, Jorge Luiz Sant'Anna dos Santos, Lisiane Bassols Brisolará, Marco Antônio Karam Lucas, Naylor Bastiani Perez, Renata Wolf Suñé

Supervisor editorial: Comitê Local de Publicação
Revisor de texto: Comitê Local de Publicação
Normalização bibliográfica: Graciela Olivella Oliveira
Editoração eletrônica: Núcleo de Comunicação Organizacional
Foto da capa: Emanuelle Baldo Gaspar

1ª edição

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei N° 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Pecuária Sul

Diagnóstico veterinário por ensaio imunoadsorvente ligado a enzima : revisão atualizada /
Emanuelle Baldo Gaspar ... [et al.]. -- Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2015.
(Documentos / Embrapa Pecuária Sul, ISSN 1982-5390 ; 145)

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader
Modo de acesso: World Wide Web: <www.embrapa.br>
Título da página da Web (acesso em 31 ago. 2015).

1. Técnica imunoenzimática. 2. Teste Elisa. I. Gaspar, Emanuelle Baldo. II. Embrapa Pecuária Sul. III. Série.

CDD 636.0896925

© Embrapa 2015

Autores

Emanuelle Baldo Gaspar

Médica Veterinária, Doutora em Microbiologia e Imunologia, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul, Caixa Postal 242, BR 153 Km 633, CEP 96401-970 - Bagé, RS - Brasil

Alessandro Pelegrine Minho

Médico Veterinário, Dr. (D.Sc.), pesquisador da Embrapa Pecuária Sul, Caixa Postal 242, BR 153 Km 633, CEP 96401-970, Bagé, RS, - Brasil

Lenita Ramires dos Santos

Bióloga, Doutora em Imunologia, pesquisadora da Embrapa Gado De Corte Avenida Rádio Maia 830 CEP 79106-550, Campo Grande, MS - Brasil

Eidi Yoshihara

Médico Veterinário, Doutor em Ciência Animal,
pesquisador científico da Agência Paulista de
Tecnologia dos Agronegócios, Rod. Raposo Tavares,
Km 563, 19015-970 - Presidente Prudente, SP,
Caixa-postal: 298, Brasil

Apresentação

As publicações técnicas da Série Embrapa são importantes veículos de informação, destinadas a produtores, técnicos, empresários do agronegócio, pesquisadores, estudantes e público em geral interessados nas tecnologias desenvolvidas pela Empresa e seus colaboradores. Tratam-se de publicações com distintas características, objetivos e públicos-alvo, tais como: Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; Documentos; Circular Técnica; Comunicado Técnico; Sistemas de Produção; Livro e outros.

A Embrapa Pecuária Sul utiliza este veículo para comunicar suas tecnologias produzidas, recomendações, práticas agrícolas e resultados de pesquisa e desenvolvimento, direcionando ao público interessado informações ligadas à produção de forrageiras e pastagens, bovinocultura de corte e de leite e ovinocultura dos Campos Sul-brasileiros. É com satisfação que oferecemos mais esta obra, destacando recente trabalho desenvolvido pelo Centro da Embrapa, em Bagé, em benefício à sustentabilidade da pecuária sulina.

Esta publicação da Série Embrapa trata do método de diagnóstico por ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA- *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Este teste se destaca entre os métodos imunológicos desenvolvidos para detectar e/ou quantificar a concentração de antígenos ou anticorpos em uma amostra biológica. Além disso, o ELISA tem sido aplicado como teste diagnóstico para patologias de plantas e como teste de controle de qualidade em várias indústrias, como, por exemplo, para liberação de lotes de vacinas,

na detecção de alérgenos ou contaminantes em alimentos. Esta publicação busca incentivar o uso desta técnica em pesquisa científica e laboratórios, trazendo maior agilidade, especificidade e sensibilidade nas análises e diagnósticos em pecuária.

Esperamos que os leitores desfrutem deste Documento e sugerimos que, em caso de maior interesse no tema abordado ou necessidades de esclarecimentos, realizem o contato com nosso serviço de atendimento ao cidadão (SAC), acessando <https://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/> ou pelo fone (53) 3240-4650. A Embrapa terá o máximo prazer em atendê-lo.

Alexandre Varella
Chefe-Geral

Sumário

Introdução	09
Histórico	10
Princípio do Teste	11
Elementos Básicos do Teste.....	11
Suporte (Fase Sólida).....	11
Tempo de Incubação e Temperatura.....	11
Concentração e Volume.....	12
Controles.....	12
Bloqueio.....	13
Conjugado, enzima, substrato e cromógeno.....	13
Tampões e reagentes.....	15
Equipamentos.....	15

Tipos de Teste de ELISA	16
Interpretação de resultados	19
ELISA indireto em apenas uma diluição.....	20
Titulação por ELISA indireto.....	21
Lista de soluções comumente usadas em ELISA	23
Referências	25

Diagnóstico Veterinário por Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima: Revisão Atualizada

Emanuelle Baldo Gaspar
Alessandro Pelegrine Minho
Lenita Ramires dos Santos
Eidi Yoshihara

Introdução

O ensaio imunoabsorvente ligado a enzima, ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é um teste que se destaca entre os métodos imunológicos desenvolvidos para detectar e/ou quantificar a concentração de antígenos ou anticorpos em uma amostra biológica por conferir maior especificidade e sensibilidade que a maioria dos demais testes imunológicos (GAN; PATEL, 2013). Este teste tem sido amplamente utilizado como ferramenta diagnóstica tanto em medicina humana (GAN; PATEL, 2013) quanto veterinária (MADRUGA et al., 2001). Também é usado como teste diagnóstico para patologias de plantas e como teste de controle de qualidade em várias indústrias, como, por exemplo, para liberação de lotes de vacinas, na detecção de alérgenos ou contaminantes em alimentos (KRSKA et al., 2012) ou na avaliação do potencial alergênico de proteínas terapêuticas (ESTADOS UNIDOS, 2009). É um ensaio imunoenzimático, pois usa anticorpos como reagente e faz uso de enzimas ligadas a um dos reagentes.

Histórico

Em 1960 Rosalyn S. Yalow e Solomon Berson publicaram um trabalho descrevendo um teste de radioimunoensaio para detecção de insulina (YALOW; BERSON, 1960). Este tipo de teste, porém, apesar de ter o princípio parecido com ELISA, usa antígenos ou anticorpos com marcadores radioativos, apresentando riscos óbvios, tanto aos operadores quanto ao meio ambiente. A partir de então se iniciou a busca por formas de detecção de sinal que não envolvessem o uso de marcadores radioativos (LEQUIN, 2005).

No início dos anos 1970, a comunidade científica ainda via com ceticismo a possibilidade do uso de enzimas como marcadores, pois se imaginava que a adsorção da enzima ao antígeno ou anticorpo prejudicaria a interação específica antígeno-anticorpo (LEQUIN, 2005). Porém, ainda em 1971, dois grupos, um da Suécia (ENGVALL; PERLMANN, 1971) e outro dos Países Baixos (VAN WEEMEN; SCHUURS, 1971), provaram que o ceticismo da comunidade científica não tinha razão de ser e publicaram, independentemente, métodos de realização de EIE (*Enzyme Immuno Assay*)/ELISA. Para desenvolver os testes EIE/ELISA, estes cientistas usaram conhecimentos prévios, tais como a informação de que enzimas conjugadas a anticorpos e antígenos vinham sendo utilizadas com sucesso em análises histológicas (AVRAMEAS, 1969; AVRAMEAS; URIEL, 1966; NAKANE; PIERCE JUNIOR, 1967), demonstrando ser possível esta ligação sem o comprometimento do ensaio (LEQUIN, 2005).

Os avanços técnicos do ELISA levaram ao surgimento de equipamentos que aumentassem a eficiência do sistema e permitissem seu uso em larga escala. Estes equipamentos incluem pipetadores automáticos e multicanais, leitores e lavadores de microplacas. No início dos anos 1980, foi desenvolvido um sistema automatizado para realização de ELISA.

Princípio do teste

O ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) é um teste que permite a separação de alguns dos componentes da mistura da reação analítica pela adsorção de certos componentes por imobilização física em uma fase sólida (poço da placa, usualmente de poliestireno). Na sequência são adicionados vários reagentes em solução aquosa, que são incubados em diferentes passos, com lavagens entre cada um dos passos. Na etapa final do teste a reação da enzima ligada ao antígeno ou anticorpo, com seu substrato e cromógeno específico, promove uma mudança de cor no líquido final, que permite a mensuração da quantidade de analito. A leitura quantitativa é baseada na intensidade de luz absorvida por espectrofotometria. A sensibilidade do teste depende da amplificação de sinais durante a reação.

Elementos básicos do teste

Suporte (fase sólida)

A microplaca de 96 poços (12 x 8) é o suporte mais utilizado no teste de ELISA. Estas placas podem ser fabricadas com diferentes materiais, mas o mais comum são as placas de poliestireno. A qualidade da placa é determinada pela superfície interna do poço, que pode ser lisa ou tratada com película para aumentar a capacidade de adsorção de material à placa (MADRUGA et al., 2001). A escolha da placa depende do tipo de material que será adsorvido e normalmente é determinada na etapa de padronização de um novo teste, assim como a determinação de outros fatores relacionados à técnica (como a concentração de antígeno, tempo e temperaturas utilizados).

Tempo de incubação e temperatura

Para a adsorção inicial do antígeno ou anticorpo à placa, o tempo de incubação entre uma e quatro horas a 37 °C é suficiente, porém é bastante comum esta primeira etapa ser realizada com incubação "overnight" (12

horas) a 4 °C. Para as demais etapas, o tempo de incubação varia conforme a temperatura, ficando entre 30 a 60 minutos a 37 °C ou uma a duas horas a temperatura ambiente (MADRUGA et al., 2001).

Concentração e volume

A concentração da proteína (antígeno ou anticorpo) necessária para ser adsorvida à placa será inversamente proporcional ao grau de pureza da mesma, pois quanto mais pura a proteína, menos contaminantes serão adsorvidos à fase sólida do teste juntamente com a proteína de interesse e, portanto, menor a necessidade de proteína total a ser adsorvida. Cerca de 200 a 1.000 ng/mL de proteína são suficientes para testes com proteínas com alto grau de pureza (MADRUGA et al., 2001), como para preparações de proteínas recombinantes enquanto que até 15.000 ng/mL de proteína podem ser necessários ao se trabalhar com proteínas com graus médio ou baixo de pureza (MADRUGA et al., 2001), como ocorre para preparações de antígenos totais (extrato bruto ou lisado de patógeno, por exemplo). Além disso, outros fatores relacionados a características estruturais da proteína, tais como a exposição de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos ou hidrofílicos, também podem influenciar negativa ou positivamente na capacidade de adsorção e, conseqüentemente, na concentração ideal a ser utilizada.

Durante a reação, o volume de líquido utilizado em cada poço, em cada etapa, deve ficar entre 50 e 200 μ L (MADRUGA et al., 2001).

Controles

Recomenda-se, sempre que possível, a inclusão de amostras de controle positivo e negativo nos testes (MADRUGA et al., 2001). Amostras controle positivas podem ser obtidas previamente, como, por exemplo, pela injeção de animais com antígeno e obtenção de soros policlonais. Amostras controle negativas devem ser preferencialmente obtidas de regiões onde a doença em questão não ocorre (CROWTHER, 2000), por exemplo o controle negativo para febre aftosa com soro de bovinos de área livre da doença/sem vacinação. Também se deve utilizar um controle branco (sem revelação de

cor), que corresponde ao próprio diluente utilizado para as demais amostras/reagentes (p. ex.: PBS1x).

Bloqueio

Esta etapa tem por objetivo bloquear os sítios inespecíficos, ou seja, as áreas da placa onde não houve adsorção de antígeno ou de anticorpo na etapa inicial (MADRUGA et al., 2001), visando impedir a ligação de outras proteínas, de forma não específica, nestes sítios durante a realização do ensaio. Proteínas puras ou substâncias contendo alto teor de proteína são geralmente utilizadas como agente bloqueador (MADRUGA et al., 2001). Como exemplo, pode-se citar soroalbumina bovina, caseína, gelatina ou ainda leite desnatado ou soro.

Conjugado, enzima, substrato e cromógeno

Dá-se o nome de conjugado ao anticorpo ou antígeno marcados com uma enzima, que é a responsável por catalisar a reação que culminará na produção de cor (revelação) (MADRUGA et al., 2001). O uso de anticorpos conjugados a enzimas é bem mais comum que o uso de antígenos conjugados e, desta forma, quando o termo “conjugado” é usado subentende-se que este seja um anticorpo. Existe no mercado uma gama variada de anticorpos conjugados. Estes podem reconhecer especificamente uma determinada classe de anticorpos (por exemplo, anti-IgG de bovino, produzido em coelho, conjugado à peroxidase; anti-IgG de ovinos, produzido em coelho, conjugado à fosfatase alcalina) ou uma molécula específica (por exemplo, anticorpo anti-IFN- γ

A enzima mais comumente conjugada ao anticorpo é a peroxidase, mas outras enzimas como fosfatase alcalina, β -galactosidase e urease também podem ser utilizadas.

Em alguns casos, quando se deseja aumentar a sensibilidade do teste, pode-se utilizar um anticorpo ligado à biotina (dito conjugado biotinilado). A biotina é uma molécula proteica relativamente pequena (244.3 Daltons), que pode ser conjugada a muitas outras proteínas e outras moléculas sem alterar

significativamente sua atividade biológica. Ela interage especificamente com a avidina, uma proteína naturalmente encontrada em ovos, que é formada por quatro subunidades. Cada uma dessas subunidades pode interagir com uma molécula de biotina. Dessa forma, o uso do anticorpo biotilado permite a interação de um número maior de moléculas da enzima porque esta é acrescentada à reação conjugada à molécula de avidina. A conjugação avidina/enzima e a interação específica da avidina com a biotina aumenta a trama necessária para detecção do sinal, indicando, com maior sensibilidade, a interação antígeno/anticorpo (CROWTHER, 2000). O uso do anticorpo biotilado desta forma aumenta uma etapa no teste, pois é necessário haver uma incubação adicional com avidina conjugada à enzima (peroxidase, fosfatase alcalina, urease).

Após a etapa em que o anticorpo ou a avidina marcados com a enzima são adicionados ao teste, segue-se a última etapa do teste, chamada de revelação (MADRUGA et al., 2001). Nesta fase, são adicionados o substrato da enzima e o cromógeno. A enzima catalisa a reação do substrato, que reage com o cromógeno, culminando com a produção de cor.

Para cada enzima é utilizado um diferente substrato (MADRUGA et al., 2001). O substrato da peroxidase é o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), da fosfatase alcalina (FA) é o paranitrofenil fosfato (PNPP), da β-galactosidase é o O-nitrofenil-β-D galactopiranosidase (ONPG) e da urease é a ureia. Os cromógenos mais comuns em ELISA para peroxidase-H₂O₂ são ortofenileno diamina (OPD) e tetrametilbenzidina (TMB). Para a FA, o cromógeno é o próprio PNPP. Para a galactosidase é o ONPG e para a urease-ureia é o bromocresol.

O substrato e o cromógeno devem ser diluídos em tampões com pH apropriado. Algumas empresas oferecem os substratos e cromógenos em pastilhas já contendo os sais do tampão. Estas podem ser diluídas em uma quantidade fixa de água e estão prontas para uso.

No fim do tempo determinado para a reação, esta pode ser parada com substâncias apropriadas (MADRUGA et al., 2001) (H₂SO₄ para OPD e TMB,

carbonato de sódio para PNPP e ONPG e mertiolato para bromocresol), o que é importante, principalmente, se houver demora para a realização da leitura.

Tampões e reagentes

Os reagentes devem ser de qualidade elevada e alto grau de pureza (MADRUGA et al., 2001). A adsorção de proteínas às placas é comumente feita em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 ou PBS, pH 7-7,2. Para as etapas de lavagem habitualmente utiliza-se PBS-polissorbatato 20 (Tween® 20) (0,05 a 0,1%). O bloqueio normalmente é feito com leite desnatado (1 a 5%) ou BSA (0,25 a 2%), diluídos em PBS. O soro teste e o conjugado podem ser diluídos em PBS ou solução de bloqueio.

Equipamentos

A lavagem das placas pode ser feita manualmente, com pipeta multicanal ou pisseta, porém, o uso de um lavador automático de placas auxilia o trabalho (MADRUGA et al., 2001), principalmente quando a quantidade de amostras é grande. O número de lavagens costuma ser estabelecido entre duas e cinco, mas alguns testes exigem até dez lavagens entre as etapas. É importante, sempre após o uso do lavador automático, rinsar o aparelho com água destilada e deionizada, pois os sais do tampão de lavagem podem entupir os bicos do pente de lavagem.

Outro aparelho utilizado no teste, cujo uso é mandatório para a leitura das amostras é o espectrofotômetro de placas ou tiras, ou leitor de ELISA. A absorbância detectada pelo aparelho é proporcional à intensidade da cor produzida pela ação enzimática, que por sua vez é proporcional à reação antígeno-anticorpo ocorrida no poço. O ajuste do comprimento de onda (em nanômetros) utilizado para a leitura varia conforme o tipo de cor revelada pelo conjunto enzima-substrato-cromógeno utilizado.

Tipos de teste de ELISA

Existem diversos tipos de ELISA que variam conforme o material primeiramente aderido à placa (antígeno ou anticorpo) e ao material testado (antígeno ou anticorpo) (MADRUGA et al., 2001). O número de etapas também varia de um tipo para outro. Porém, todos os tipos de ELISA envolvem a ligação antígeno-anticorpo e são mensurados pela mudança de cor resultante da reação da enzima com seu substrato e cromógeno.

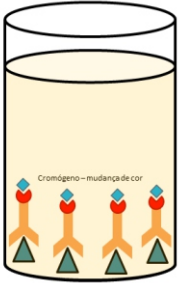
Durante o desenvolvimento de um novo teste é feita uma padronização para determinação da quantidade de reagentes a ser utilizada, além da validação do teste para se determinar a sensibilidade e especificidade do mesmo como método de diagnóstico. Testes de ELISA para diagnóstico de um conjunto de doenças veterinárias já foram aprovados e são comercializados como kits, enquanto que para algumas doenças, tais como anaplasmose e babesiose, embora padronizados para fins de pesquisa, os kits ainda não estão disponíveis. Quando os testes são disponíveis comercialmente, na forma de kits, a quantidade de cada material a ser incluída no teste já foi previamente determinada.

O tipo mais simples de ELISA é o teste direto, em que o antígeno é adsorvido à placa e utiliza-se um conjugado para revelar a reação. No teste indireto, as placas são adsorvidas com o antígeno e se pesquisa anticorpos no soro (ou outro fluido corporal) teste ou sobrenadante de cultura de células. Em seguida, coloca-se o conjugado para reconhecer o anticorpo teste. No ELISA sanduíche, o antígeno é capturado por um anticorpo fixado na placa e, posteriormente, identificado por outro anticorpo (conjugado). Este nome é utilizado justamente porque o antígeno é o “recheio” entre o sanduíche de anticorpos. Dois tipos de ELISA sanduíche estão demonstrados nos quadros abaixo. Já no ELISA competitivo existe competição entre amostras teste e reagentes conjugados com enzima. Neste tipo de teste, ao contrário do que ocorre nos demais, quanto menor a intensidade da cor produzida durante a reação, mais positivo o teste.




Os quadros a seguir exemplificam protocolos resumidos dos diferentes tipos de ELISA.

Quadro 1. Etapas do ELISA direto

1. Adsorção do antígeno (material a ser pesquisado)
2. Lavagem para eliminação de ligações fracas e de antígeno não ligado
3. Bloqueio (para ocupar os espaços livres do suporte)
4. Lavagem
5. Adição do conjugado. Quando há interação, haverá a formação de um complexo insolúvel. Neste caso o anticorpo conjugado é específico contra o antígeno estudado
6. Lavagem para a eliminação de reações fracas e conjugados não ligados
7. Revelação – adição de substrato e cromógeno. Quando ocorre a reação há mudança de cor no conteúdo do poço
8. Parada da reação
9. Leitura (no comprimento de onda adequado ao cromógeno usado)

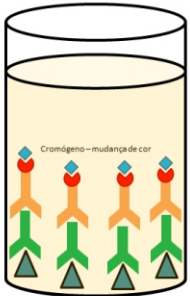


Este tipo de teste não é comumente usado em diagnóstico, mas pode ser usado para titulação do conjugado





 antígeno
 conjugado (anticorpo+enzima)
 substrato

Quadro 2. Etapas do ELISA indireto

1. Adsorção do antígeno
2. Lavagem para eliminação de ligações fracas e de antígeno não ligado
3. Bloqueio (para ocupar os espaços livres do suporte)
4. Lavagem
5. Adição da amostra teste (soro ou sobrenadante de cultura de células). Caso haja anticorpos contra o antígeno adsorvido na placa, estes interagirão de forma específica (reação positiva)
6. Lavagem para a eliminação de reações fracas e anticorpos não ligados
7. Adição do conjugado. Quando há reação, haverá a formação de um complexo insolúvel. Neste caso o conjugado é específico contra o anticorpo pesquisado (ex.: conjugado anti-IgG bovina, anti-IgM canina, etc.)
8. Lavagem para a eliminação de reações fracas e conjugados não ligados
9. Revelação – adição de substrato e cromógeno. Quando ocorre a reação há mudança de cor no conteúdo do poço
10. Parada da reação
11. Leitura (no comprimento de onda adequado ao cromógeno usado)



Exemplos: diagnóstico de anaplasmosse, babesiose, bronquite infecciosa das aves, tripanossomíase bovina, botulismo (detecção de anticorpos anti-toxina)

 antígeno
 anticorpo presente no soro teste ou sobrenadante de cultura de células
 conjugado (anticorpo+enzima)
 substrato

Quadro 3. Etapas do ELISA sanduíche de duplo anticorpo

1. Adsorção de anticorpo primário (anti-antígeno a ser pesquisado)
2. Lavagem para eliminação de ligações fracas e de anticorpo não ligado
3. Bloqueio (para ocupar os espaços livres do suporte)
4. Lavagem
5. Adição do antígeno a ser pesquisado (soro, sangue, extrato de microrganismo, etc.). Caso haja antígenos no material teste, estes interagirão de forma específica com o anticorpo primário
6. Lavagem para a eliminação de reações fracas e antígenos não ligados
7. Adição do conjugado. Quando há reação, haverá a formação de um complexo insolúvel. Neste caso o anticorpo conjugado é específico contra o antígeno pesquisado
8. Lavagem para a eliminação de reações fracas e conjugados não ligados
9. Revelação – adição de substrato e cromógeno. Quando ocorre a reação há mudança de cor no conteúdo do poço
10. Parada da reação
11. Leitura (no comprimento de onda adequado ao cromógeno usado)



antígeno



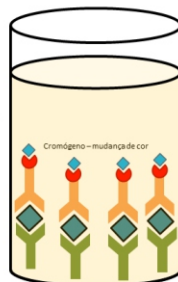
anticorpo primário (anti-antígeno a ser pesquisado)



conjugado (anticorpo+enzima)



substrato



Exemplo: este teste é bastante usado em pesquisa para a determinação da quantidade de citocinas em soro ou sobrenadantes de cultura de tecidos

Quadro 4. Etapas do ELISA sanduíche indireto de duplo anticorpo

1. Adsorção de anticorpo primário (anti-antígeno)
2. Lavagem para eliminação de ligações fracas e de anticorpo não ligado
3. Bloqueio (para ocupar os espaços livres do suporte)
4. Lavagem
5. Adição do antígeno ou amostra purificada
6. Lavagem para a eliminação de reações fracas e antígenos não ligados
7. Adição de amostra teste (soro, sobrenadante de cultura de células). Caso a amostra positiva o anticorpo interagirá com o antígeno ligado ao anticorpo primário.
8. Lavagem para a eliminação de reações fracas e anticorpos não ligados
9. Adição do conjugado. Quando há reação, haverá a formação de um complexo insolúvel. Neste caso o anticorpo conjugado é específico contra o anticorpo pesquisado (ex. anti-IgG bovina, anti-IgM canina, etc.)
10. Lavagem para a eliminação de reações fracas e conjugados não ligados
11. Revelação – adição de substrato e cromógeno. Quando ocorre a reação há mudança de cor no conteúdo do poço
12. Parada da reação
13. Leitura (no comprimento de onda adequado ao cromógeno usado)



antígeno



anticorpo primário



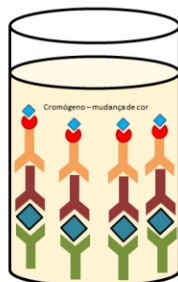
anticorpo teste



conjugado



substrato



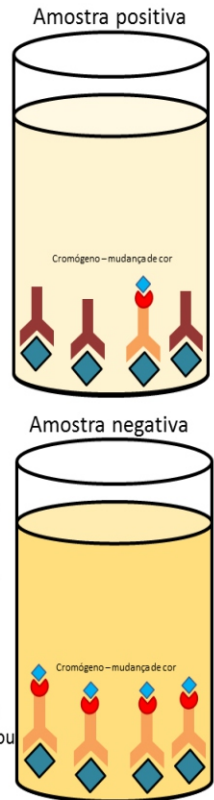
Quadro 5. Etapas do ELISA competitivo

1. Adsorção de antígeno
2. Lavagem para eliminação de ligações fracas e de antígeno não ligado
3. Bloqueio (para ocupar os espaços livres do suporte)
4. Lavagem
5. Adição de amostra (anticorpo) teste (soro teste, sobrenadante de cultura de células) mais anticorpo conjugado (anti-antígeno ligado à placa). Quanto mais positiva a amostra maior a quantidade de anticorpo teste ligado ao antígeno e menor a quantidade de conjugado ligado ao antígeno
6. Lavagem para a eliminação de reações fracas e anticorpos não ligados
7. Revelação – adição de substrato e cromógeno. Quando ocorre a reação há mudança de cor no conteúdo do poço. Neste caso, quanto menor a intensidade da cor, mais positiva é a amostra
8. Parada da reação
9. Leitura (no comprimento de onda adequado ao cromógeno usado)



Exemplos: diagnóstico de anaplasmosse, anemia infecciosa equina e peste suína clássica

Aqui foi ilustrada uma forma bastante simples de ELISA competitivo. Outras metodologias usando o mesmo princípio também podem ser feitas. Tanto usando antígeno, quanto usando anticorpo primário inicialmente adsorvidos na placa. Também podem ser usados anticorpos ou antígenos conjugados a enzima. O importante é que, por se tratar de um teste competitivo, quanto menor a intensidade da cor, mais positiva é a amostra.



Interpretação de Resultados

Apesar de, conforme indicado nos quadros, haver uma quantidade considerável de tipos de teste de ELISA, apresentaremos a seguir uma metodologia para a interpretação de resultados de ELISA indireto, o tipo mais comumente usado em diagnóstico veterinário.

O ELISA indireto é usado na pesquisa de anticorpos no soro de animais, ou, em casos específicos, em sobrenadantes de cultura de células. A placa é adsorvida com um antígeno de interesse. Por exemplo, para saber se um

determinado animal já entrou em contato com *Babesia bovis* adsorvem-se antígenos deste parasita na placa e as etapas seguintes visam a detecção de anticorpos no soro de animais teste.

ELISA indireto em apenas uma diluição

Nos casos em que o ELISA indireto foi padronizado para a amostra ser testada em apenas uma diluição, a resposta do teste será apenas positiva ou negativa (CROWTHER, 2000). Para determinar a partir de qual valor de absorbância uma determinada amostra é considerada positiva, faz-se necessário o uso de soros (que podem ou não conter anticorpos) controle negativo para o antígeno que se está procurando (antígeno adsorvido na placa). O ideal é que estes soros sejam provenientes de áreas onde a doença não ocorre. Em cada placa, amostras de soro controle negativo (número variável conforme a padronização do teste) são testadas em duplicata ou triplicata. Determina-se a média e o desvio padrão das amostras controle negativo e o valor de *cut-off* (ponto de corte, ponto discriminativo ou limiar) normalmente equivale à média da absorbância mais dois ou três desvios padrão obtidos para os soros controle negativos ($cut\ off = \bar{X} + 2xSD$ ou $cut\ off = \bar{X} + 3xSD$). Soros controle positivo também são usados para o controle interno da reação (como controle de qualidade do teste, para assegurar que o mesmo está funcionando dentro da normalidade). Além disso, como a absorbância das amostras é proporcional à quantidade de anticorpos no soro da amostra teste, um soro controle positivo pode ser usado para o cálculo de porcentagem de positividade, que oferece uma medida relativa (em relação ao controle positivo) da concentração de anticorpos na amostra, baseado na absorbância da amostra teste em relação à amostra controle positiva [$PP = (\bar{X}\ abs.\ amostra\ teste / \bar{X}\ abs.\ controle\ positivo) \times 100$, onde PP = porcentagem de positividade; abs. = absorbância].

Exemplificando (hipoteticamente): numa determinada placa de ELISA em que foram testados três soros controle negativo a média de absorbância destas amostras foi de 0,105 e o desvio padrão foi de 0,03. Assim, se usarmos a média mais dois desvios padrão ($cut\ off = \bar{X} + 2xSD$) teremos 0,105 +

$0,06 = 0,165$. Todas as amostras teste cuja absorbância for superior a este valor são consideradas positivas.

Supondo que neste mesmo teste a média da triplicata da absorbância do soro controle positivo seja 1,723 e uma das amostras teste tenha apresentado absorbância média de 1,485, esta amostra será positiva (maior que 0,165) e poderemos calcular a porcentagem de positividade em relação ao soro controle positivo $[(1,485/1,723) \times 100]$, que será de 86,18%.

Titulação por ELISA indireto

O método de titulação por ELISA indireto é mais utilizado em pesquisa do que como método de diagnóstico, pois é mais trabalhoso e oneroso que o ensaio com apenas uma diluição das amostras teste. Neste caso, amostras de soro controle negativo e soros teste são diluídas de forma seriada em duplicata (CROWTHER, 2000). A forma mais utilizada é a diluição seriada na base 2, por exemplo, começando com 1/100 teremos 1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 e assim por diante, mas outras bases, como a base 3 também podem ser usadas. Neste caso, o resultado é expresso como título, ou seja, inverso da última diluição em que os soros apresentaram absorbância maior que o *cut off*. Geralmente, este *cut off* é calculado empiricamente, como mencionado anteriormente. No entanto, ele deve ser obtido para cada uma das diluições do soro controle negativo (CROWTHER, 2000). Alternativamente, Frey et al. (1998) propuseram uma fórmula matemática para definir um *cut off* estatisticamente válido. Por este método determina-se o valor a se multiplicar o desvio padrão antes de somá-lo à média das absorbâncias dos soros controle negativo. Para este cálculo os autores levaram em consideração o número de amostras controle e o intervalo de confiança esperado. Quanto menor o intervalo de confiança e maior o número de amostras controle negativo usadas, menor o valor a se multiplicar o SD antes de somá-lo à média.

No exemplo fictício abaixo (tabela 1), estão representados os valores de absorbância de duas amostras controle negativo, testadas em duplicata

(colunas 1 a 4), e duas amostras teste (colunas 5 a 8). Na tabela 2 está representada a média (\bar{X}) de cada um dos controles negativos (porque o teste foi feito em duplicata). Subsequentemente, está representada a média e o desvio padrão (SD) destes dois controles negativos. O *cut off* foi calculado com base na fórmula $\bar{X} + 3 \times \text{SD}$ e as médias das absorbâncias de duas amostras teste (amostra 1 e amostra 2) também estão representadas na tabela 2.

Para interpretação, o valor da média das absorbâncias das amostras teste, em cada ponto de diluição, deve ser comparado ao *cut off*, até se determinar o *end point* (primeira diluição em que a média de absorbância da amostra teste é menor que o *cut off*). O título será o inverso da última diluição antes do end point. Neste exemplo, não foi possível determinar o *end point* da amostra 1. Só é possível dizer que o título para esta amostra é maior que 6400 (última diluição testada). Neste caso, é necessário que se realize outro teste, com mais diluições desta amostra, a fim de alcançar o *cut off* e calcular precisamente o título. Já para a amostra 2 o end point foi 1/1600 (em rosa na tabela) e, portanto, o título foi de 800 (em verde na tabela).

Tabela 1: Valores de absorbância em um teste de ELISA fictício para titulação de anticorpos

Diluição	1 ctr neg1	2 ctr neg1	3 ctr neg2	4 ctr neg2	5 amostra 1	6 amostra 1	7 amostra 2	8 amostra 2
1/100	0,491	0,501	0,552	0,520	1,835	1,832	0,602	0,598
1/200	0,292	0,295	0,320	0,332	1,592	1,601	0,481	0,485
1/400	0,183	0,188	0,232	0,224	1,283	1,281	0,360	0,358
1/800	0,125	0,121	0,145	0,138	0,865	0,862	0,251	0,247
1/1600	0,081	0,079	0,101	0,123	0,535	0,534	0,113	0,120
1/3200	0,079	0,079	0,085	0,084	0,311	0,315	0,080	0,079
1/6400	0,078	0,080	0,079	0,080	0,185	0,182	0,082	0,078
Branco	0,055	0,057	0,55	0,54	0,54	0,056	0,055	0,053

Ctrl(s) = controle(s); neg = negativo;

Tabela 2. Determinação do título de anticorpos de duas amostras fictícias.

Diluição	ctr neg1 média	ctr neg2 média	ctrs neg média	SD	cut off ($\bar{X} + 3 \times SD$)	amostra1 média	amostra2 média
1/100	0,496	0,527	0,511	0,021	0,577	1,833	0,600
1/200	0,293	0,326	0,309	0,022	0,378	1,596	0,483
1/400	0,185	0,228	0,206	0,030	0,296	1,282	0,359
1/800	0,123	0,141	0,132	0,013	0,171	0,863	0,249
1/1600	0,080	0,112	0,096	0,022	0,163	0,534	0,116
1/3200	0,079	0,084	0,082	0,003	0,093	0,313	0,079
1/6400	0,079	0,079	0,079	0,001	0,081	0,183	0,080

Ctr(s) = controle(s); neg = negativo; SD = desvio padrão (standard deviation)

Lista de soluções comumente usadas em ELISA

PBS 10X (deve ser diluído 1/10 para o uso):

NaCl	82 g
Na ₂ HPO ₄	10,5 g
NaH ₂ PO ₄	3,086 g
H ₂ O	q.s.p. 1 L

pH 7 a 7,2 acertado com NaOH ou HCl

Tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
H ₂ O	q.s.p. 1 L

Ajustar o pH com NaOH ou HCl

PBS 1X Tween 0,05% (PBS-T)

PBS	1 L
Tween 20	500 µL

PBS 1X-T-leite desnatado 5%

PBS-T	100 mL
Leite desnatado	5 g

PBS-T-leite desnatado 1%

PBS-T	100 mL
Leite desnatado	1 g

Tampão citrato-fosfato 0,15M, pH 5

Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	5,19 g
Na ₂ HPO ₄	5,74 g
H ₂ O	q.s.p. 1 L

Ajustar o pH com NaOH ou HCl

Solução de revelação

OPD (ortofenilenodiamina)	10 mg
Tampão citrato-fosfato, pH5	10 mL
H ₂ O ₂ (substrato)	10 μL

Solução de parada da reação H₂SO₄ 3M

H ₂ SO ₄ 98%	81,52 mL
H ₂ O	q.s.p. 500 mL

Sempre colocar o ácido sobre a água

Referências

- AVRAMEAS, S. Indirect immunoenzyme techniques for the intracellular detection of antigens. **Immunochemistry**, v. 6, n. 6, p. 825-831, Nov. 1969.
- AVRAMEAS, S.; URIEL J. Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**. Série D: Sciences Naturelles, v. 262, n. 24, p. 2543-2545, June 1966.
- CROWTHER, J. R. **The ELISA Guidebook**. Totowa: Humana Press, 2000. 436 p. (Methods in molecular biology, 149).
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871-874, 1971.
- ESTADOS UNIDOS. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. **Guidance for industry assay development for immunogenicity testing of therapeutic proteins**. Rockville, 2009. 20 p. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM192750.pdf>>. Acesso em: 31 jul. 2015.
- FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v. 221, n. 1-2, p. 35-41, Dec. 1998.

GAN, S. D.; PATEL, K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 9, p. E10-12, Sept. 2013.
doi:10.1038/jid.2013.287

KRSKA, R.; BECALSKI, A.; BRAEKEVELT, E.; KOERNER, T.; CAO, X. L.; DABEKA, R.; GODEFROY, S.; LAU, B.; MOISEY, J.; RAWN, D. F.; SCOTT, P. M.; WANG, Z.; FORSYTH, D. Challenges and trends in the determination of selected chemical contaminants and allergens in food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 1, p. 139-162, 2012.

LEQUIN, R. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2415-2418, 2005.

MADRUGA, C. R.; ARAUJO, F. R. de; SOARES, C. O. (Ed.). **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360 p.

NAKANE, P. K.; PIERCE JUNIOR, G. B. Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. **Journal of Cell Biology**, v. 33, n. 2, p. 307-318, May 1967.

VAN WEEMEN, B. K.; SCHUURS, A. H. W. M. Immunoassay using antigenenzyme conjugates. **FEBS Letters**, v. 15, n. 3, p. 232-236, June 1971.

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.

Embrapa

Pecuária Sul

CGPE 12127