



APOSTILA DO CURSO PRÁTICO DE VIROLOGIA

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

**Cláudia Lamarca Vitral
Prof. Adjunto de Virologia**

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS VIROSES

O diagnóstico de certeza de um processo infeccioso é a demonstração do patógeno ou de seus produtos nos tecidos ou fluidos biológicos. Esta demonstração, no caso de uma infecção viral, pode ser feita de forma direta ou indireta.

Como demonstração direta, temos o isolamento do agente etiológico (por exemplo, ovos embrionados, animais de laboratório ou cultura de células), a evidência das partículas virais ao microscópio eletrônico, a detecção de antígenos virais por técnicas de hemaglutinação ou imunológicas ou a pesquisa do genoma viral por técnicas de biologia molecular.

Já a demonstração indireta baseia-se na detecção de anticorpos produzidos pelo organismo infectado em resposta a uma determinada infecção viral. Pode ser feita pela sorologia pareada, isto é, pela coleta de amostras de sangue na fase aguda e convalescente da infecção. Uma diferença de pelo menos 4 vezes no título de anticorpos específicos entre as duas fases representa a conversão imunológica do indivíduo. A este fenômeno denominamos conversão sorológica e a verificação de sua ocorrência pode ser feita por testes de imunodifusão em gel de ágar e inibição da hemaglutinação.

Nas duas últimas décadas, houve um grande avanço no diagnóstico sorológico com o desenvolvimento de testes que permitem uma detecção mais rápida e precisa das infecções por vírus. Dentre elas, destaca-se os testes para pesquisa de anticorpos específicos da classe IgM, que são os primeiros formados em resposta às infecções, indicando uma infecção recente e dispensando a coleta de 2 amostras para teste de conversão sorológica. Dentre as técnicas imunológicas mais usadas atualmente, destacam-se a imunofluorescência, ensaio imunoenzimático (ELISA) e radioensaio (RIE). Além destas, com o advento de pesquisas na área de genética e biologia molecular, foram desenvolvidas técnicas de detecção do genoma viral, sendo as mais importantes a reação de hibridização de ácido nucleicos e a reação em cadeia da polimerase (PCR).

1. Importância da pesquisa de antígenos e/ou anticorpos no diagnóstico laboratorial

O exame laboratorial de uma virose humana serve não só para confirmar uma dada infecção, ou uma suspeita clínica, mas também para identificar o tipo do agente causal e assim contribuir para a avaliação do clínico, para o paciente e a comunidade em geral. Situações importantes no diagnóstico virológico:

- ❑ No esclarecimento de infecções com sintomas e sinais clínicos confundíveis, como exemplo, mononucleose infecciosa-citomegalovirose-rubéola e hepatites virais (A,B,C,D,E).
- ❑ Quando há necessidade de confirmação de uma infecção devido às sérias implicações que a mesma pode Ter para o paciente, como por exemplo na AIDS, hepatite virais e rubéola gestacional;
- ❑ Para diferenciar a fase da doença, como por exemplo, na determinação de infecções aguda ou crônicas, no prognóstico da doença (p.ex. pesquisa dos marcadores sorológicos das hepatites virais) e como critério de cura;
- ❑ No diagnóstico de doenças congênitas (p.ex. rubéola), uma vez que a detecção da imunoglobulina IgM no sangue do cordão umbilical é patognomônica de doença congênita pelo fato desta imunoglobulina não atravessar a barreira placentária;
- ❑ Na seleção de doadores de sangue das doenças virais transmitidas pelo sangue, como hepatites B e C, AIDS, HTLV-I e II;
- ❑ Quando a intervenção quimioterápica é importante e possível, como por exemplo nas infecções herpéticas, AIDS e papilomavirose;
- ❑ Durante surtos epidêmicos, para que a população e a Saúde Pública busquem as medidas profiláticas adequadas (vacinação, combate a vetores, etc.). Ex: febre amarela, dengue, sarampo, raiva, entre outras;
- ❑ Na busca de um agente etiológico de uma dada doença, seja ela nova ou não, favorecendo assim também a pesquisa. Com esta visão, a maioria dos vírus hoje conhecidos foram descobertos e associados a doenças. Ex: vírus Epstein-Barr, HIV, rotavírus, hantavírus, etc.
- ❑ Na avaliação da imunidade naturalmente adquirida após uma infecção viral ou artificialmente induzida após vacinação, pela pesquisa de anticorpos da classe IgG;
- ❑ Em estudos epidemiológicos, para avaliação da prevalência de diferentes doenças virais em uma determinada comunidade₂ pela pesquisa de anticorpos da classe

IgG, bem como na verificação da erradicação de doenças (ausência de anticorpos contra o patógeno em crianças nascidas no local) ou reintrodução de novos casos em áreas consolidadas (pesquisa de anticorpos IgG ou aumento no título de anticorpos IgG contra determinado patógeno).

2. Testes sorológicos

Os testes sorológicos ou imunoenaios são técnicas para a detecção e quantificação de antígenos ou anticorpos, podendo utilizar reagentes não-marcados ou reagentes marcados. Os ensaios com reagentes não-marcados, como precipitação e aglutinação, possuem sensibilidade de detecção menor, pois é necessário que se formem grandes complexos antígeno-anticorpo para sua detecção. Nos ensaios com reagentes marcados, estes amplificam o sinal, aumentando a sensibilidade de detecção. Os marcadores comumente utilizados são os radioativos, enzimáticos, fluorescentes e quimioluminescentes.

Na última década, houve um grande desenvolvimento nos testes para imunodiagnóstico, principalmente com relação aos anticorpos e antígenos empregados e, em menor escala, com relação aos métodos. O advento dos anticorpos monoclonais proporcionou um grande avanço pela possibilidade de produção, em grande quantidade, de anticorpos homogêneos e totalmente caracterizáveis. Esses anticorpos são altamente específicos, sendo a base de vários testes de pesquisa de antígenos. Por outro lado, a análise da estrutura dos principais componentes antigênicos dos vírus levou à identificação dos antígenos mais importantes na detecção de anticorpos. Tais antígenos podem ser preparados, em larga escala, por síntese peptídica e tecnologia recombinante, aumentando a especificidade dos testes para a pesquisa de anticorpos. Com relação aos métodos, tem-se observado uma tendência ao aperfeiçoamento e à consolidação dos testes já existentes especialmente pela facilitação e redução no tempo das reações, em vez do desenvolvimento de técnicas baseadas em princípios inovadores.

Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ELISA é um método no qual a reação antígeno-anticorpo é monitorada por medida da atividade enzimática. Desempenha um papel muito importante no laboratório clínico, pois, além da elevada sensibilidade comparável à do radioimunoensaio, apresenta as vantagens de utilizar reagentes estáveis, estar livre das exigências de trabalhar com radioisótopos e poder ser adaptado tanto a testes simples como a automação sofisticada. O ensaio pode ser empregado com uma variedade de sistemas de detecção, que vão de leituras visuais a fotométricas, com substratos coloridos, fluorescentes ou luminescentes, fato que tem contribuído para a multiplicação de seus métodos e aplicações nos últimos anos.

Para ser utilizada em imunoensaio, a enzima deve preencher alguns requisitos como ser estável, facilmente obtida em forma purificada e ser facilmente conjugada a vários antígenos e anticorpos sem perda de sua atividade. Entre as enzimas, a mais empregada é a peroxidase, que além desses requisitos, pode ser conjugada por vários processos e ser revelada por várias substâncias cromogênicas.

O princípio básico da reação de ELISA é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática como da imunológica do anticorpo. A fase sólida pode ser constituída por partículas de agarose, poliacrilamida, dextran, poliestireno, etc. Placas plásticas são as mais difundidas, por permitirem a realização de múltiplos ensaios e automação. Após cada etapa, como sensibilização, incubação com a amostra e com o conjugado, as cavidades das placas são lavadas para a remoção do material não ligado à fase sólida.

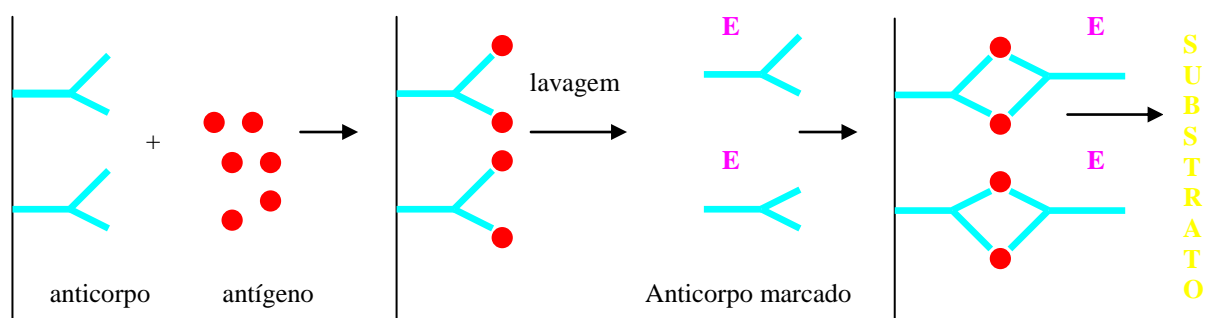
O teste detecta quantidades extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos, podendo ter elevada precisão se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados. O grau de pureza do antígeno ou anticorpo da fase sólida é muito importante, pois qualquer material heterólogo competirá pelo espaço na placa. Na pesquisa de antígenos, o anticorpo utilizado na sensibilização deve ter alta afinidade, podendo ser policlonal ou monoclonal. Para pesquisa de anticorpos, o antígeno deve estar livre de impurezas, podendo-se utilizar antígenos purificados por cromatografia de afinidade com anticorpos monoclonais, peptídeos sintéticos ou peptídeos obtidos a partir de tecnologia recombinante. Além de se avaliar a concentração ideal da amostra teste na reação, pode-se utilizar detergentes não-iônicos, como Tween 20

e/ou proteína (leite desnatado, gelatina, BSA, caseína, etc.) no diluente da amostra para reduzir a adsorção não-específica de componentes da amostra na placa. Os conjugados devem ser preparados com anticorpos de alta afinidade e maximamente purificados. Os substratos cromogênicos empregados pela degradação enzimática dão origem a produtos solúveis coloridos, cuja determinação é feita medindo-se a densidade ótica da solução no espectrofotômetro. Para a peroxidase, o substrato é o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), e os cromógenos ou doadores de hidrogênio mais utilizados são ortofenilenodiamina (OPD), ácido 5-amino salicílico, ortotoluidina, 2,2'-diazino do ácido etilbenzotiazolino sulfônico (ABTS) e tetrametilbenzidina (TMB)

Principais métodos de ELISA empregados para a pesquisa de anticorpos e antígenos

1. Ensaio para antígenos

A fase sólida é sensibilizada com anticorpo específico. A amostra em teste, onde se vai pesquisar o antígeno, é incubada com a fase sólida e, a seguir, incuba-se com excesso de anticorpo específico marcado com a enzima. A reação é revelada pela adição do substrato. A taxa de degradação é proporcional a concentração do antígeno



2. Ensaio para anticorpos

2.1 Método direto

As placas são sensibilizadas com antígenos, que reagirão com os anticorpos da amostra., incubando-se em seguida com o antígeno específico marcado com a enzima.

2.2 Método indireto

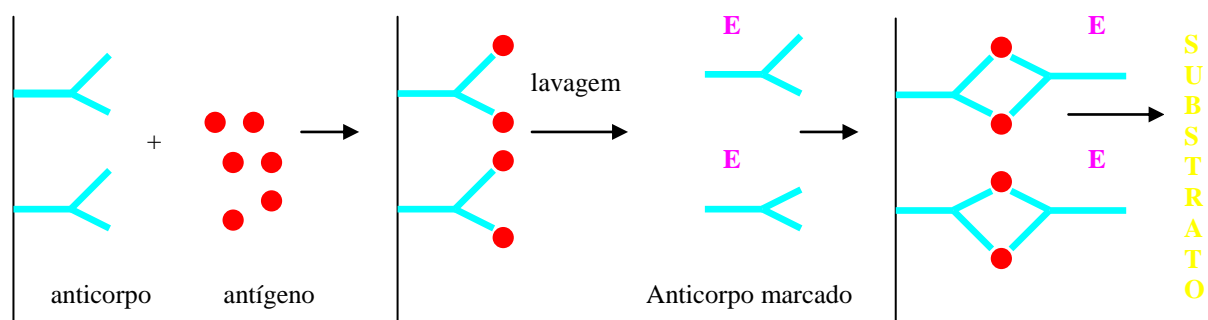
As placas são sensibilizadas com o antígeno. Segue-se a incubação com a amostra teste. O conjugado empregado utilizada antiimunoglobulina humana que reage com o anticorpo da amostra capturado pelo antígeno e a reação e revelada com a solução cromógena. O grau de degradação do substrato, indicado normalmente pela intensidade da cor da solução, é proporcional à concentração de anticorpo.

2.3 Método para captura para anticorpos IgM

A fase sólida é sensibilizada com anti-IgM específico para a região Fc. Os soros em teste são incubados, havendo a captura de qualquer IgM da amostra. A seguir incuba-se com antígeno marcado ou antígeno não marcado, seguindo de anticorpo específico marcado

AULA PRÁTICA: Ensaio imunoenzimático para detecção do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg)

Este ensaio baseia-se na metodologia direta do tipo sanduíche. Anticorpos anti-HBs são adsorvidos nas cavidades da fase sólida. Antígeno HbsAg, caso presente na amostra do soro teste, irá reagir especificamente com o anticorpo anti-HBs capturado na fase sólida. A placa é em seguida incubada com o conjugado anti-HBs/peroxidase. O anticorpo do conjugado só se ligará se a amostra de soro for positiva para a presença de HbsAg. A reação será revelada mediante adição do substrato da enzima em solução que inclui um cromógeno (TMB), que ao ser oxidado, se converte em um complexo de coloração azul. Amostras negativas se apresentarão incolores. A reação é paralizada pela adição de ácido sulfúrico, que muda a coloração das amostras positivas para amarelo. Amostras negativas permanecem incolores.



Metodologia:

1. Colocar numa placa de polivinil, 10 ul de anticorpo de captura (anti-HBs) por cavidade, previamente diluído (1/1000) em tampão carbonato-bicarbonato 0.05 M, pH 9.6. Incubar a 4oC durante 16-20 horas;
2. Com pente multicanal adaptado a sistema de vácuo, aspirar todas as cavidades e enchê-las com o tampão de lavagem (PBS T). Repetir esta operação 2X, com intervalos de 1 min;
3. Adicionar 100 ul de soro-teste por cavidade a reação, juntamente com os controles

- positivo e negativo. Incubar a 37°C/2 horas. Lavar a placa como descrito no item 2;
4. Adicionar 100 µl de conjugado (anti-HBs/HRP) por cavidade, diluído em tampão apropriado (1/500). Incubar a 37°C/2 horas. Lavar a placa como descrito no item 2;
 5. Preparar a solução de substrato (10 ml de tampão de substrato, 100 µl de TBM, 5 µl H₂O₂) no momento de uso. Misturar bem e distribuir 100 µl em todas as cavidades, inclusive no controle do substrato.
 6. Cobrir a placa e incubar a T.A. por 10 min. Bloquear a reação pela adição de 100 µl de H₂SO₄ em todas as cavidades. Proceder com a leitura.

Leitura visual

Observar a placa ligeiramente inclinada sobre uma superfície branca, com boa iluminação. Considerar como positivas as amostras que apresentarem qualquer diferença perceptível de cor em relação aos controles negativos, que devem ser incolores.

Leitura no espectrofotômetro (450 nm)

Considerar como positivas as amostras que apresentarem uma densidade ótica pelo menos 2.1 maior do que a média dos controles negativos.

PROTOCOLO DO ELISA

Reação:

Data:

Amostras:

Técnico:

Diluição do captura:

Diluição da amostra:

Diluição do conjugado:

	H	G	F	E	D	C	B	A
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								