

# ELISA: DEFINIÇÃO, VARIACIONES E PROTOCOLOS PRÁTICOS

1ª Edição

Adalberto Alves Pereira Filho

# ELISA: DEFINIÇÃO, VARIACIONES E PROTOSCOLOS PRÁTICOS

1ª Edição

Adalberto Alves Pereira Filho



2023 - Editora Ampla

Copyright da Edição © Editora Ampla

Copyright do Texto © Os autores

Editor Chefe: Leonardo Pereira Tavares

Design da Capa: Editora Ampla

Diagramação: Juliana Ferreira

Revisão: Os autores

**ELISA: definição, variações e protocolos práticos** está licenciado sob CC BY 4.0.



Esta licença exige que as reutilizações deem crédito aos criadores. Ele permite que os reutilizadores distribuam, remixem, adaptem e construam o material em qualquer meio ou formato, mesmo para fins comerciais.

O conteúdo da obra e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, não representando a posição oficial da Editora Ampla. É permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores. Todos os direitos para esta edição foram cedidos à Editora Ampla.

ISBN: 978-65-5381-153-9

DOI: 10.51859/ampla.edv539.1123-0

**Editora Ampla**

Campina Grande – PB – Brasil

contato@amplaeditora.com.br

www.amplaeditora.com.br



2023

# CONSELHO EDITORIAL

Alexander Josef Sá Tobias da Costa – Universidade do Estado do Rio de Janeiro  
Andréa Cátia Leal Badaró – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Andréia Monique Lermen – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Antoniele Silvana de Melo Souza – Universidade Estadual do Ceará  
Aryane de Azevedo Pinheiro – Universidade Federal do Ceará  
Bergson Rodrigo Siqueira de Melo – Universidade Estadual do Ceará  
Bruna Beatriz da Rocha – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais  
Bruno Ferreira – Universidade Federal da Bahia  
Caio Augusto Martins Aires – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Caio César Costa Santos – Universidade Federal de Sergipe  
Carina Alexandra Rondini – Universidade Estadual Paulista  
Carla Caroline Alves Carvalho – Universidade Federal de Campina Grande  
Carlos Augusto Trojaner – Prefeitura de Venâncio Aires  
Carolina Carbonell Demori – Universidade Federal de Pelotas  
Cícero Batista do Nascimento Filho – Universidade Federal do Ceará  
Clécio Danilo Dias da Silva – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Dandara Scarlet Sousa Gomes Bacelar – Universidade Federal do Piauí  
Daniela de Freitas Lima – Universidade Federal de Campina Grande  
Darlei Gutierrez Dantas Bernardo Oliveira – Universidade Estadual da Paraíba  
Denilson Paulo Souza dos Santos – Universidade Estadual Paulista  
Denise Barguil Nepomuceno – Universidade Federal de Minas Gerais  
Dinara das Graças Carvalho Costa – Universidade Estadual da Paraíba  
Diogo Lopes de Oliveira – Universidade Federal de Campina Grande  
Dylan Ávila Alves – Instituto Federal Goiano  
Edson Lourenço da Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí  
Elane da Silva Barbosa – Universidade Estadual do Ceará  
Érica Rios de Carvalho – Universidade Católica do Salvador  
Fernanda Beatriz Pereira Cavalcanti – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Fredson Pereira da Silva – Universidade Estadual do Ceará  
Gabriel Gomes de Oliveira – Universidade Estadual de Campinas  
Gilberto de Melo Junior – Instituto Federal do Pará  
Givanildo de Oliveira Santos – Instituto Brasileiro de Educação e Cultura  
Higor Costa de Brito – Universidade Federal de Campina Grande  
Hugo José Coelho Corrêa de Azevedo – Fundação Oswaldo Cruz  
Isabel Fontgalland – Universidade Federal de Campina Grande  
Isane Vera Karsburg – Universidade do Estado de Mato Grosso  
Israel Gondres Torné – Universidade do Estado do Amazonas  
Ivo Batista Conde – Universidade Estadual do Ceará  
Jaqueline Rocha Borges dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Jessica Wanderley Souza do Nascimento – Instituto de Especialização do Amazonas  
João Henriques de Sousa Júnior – Universidade Federal de Santa Catarina  
João Manoel Da Silva – Universidade Federal de Alagoas  
João Vitor Andrade – Universidade de São Paulo  
Joilson Silva de Sousa – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
José Cândido Rodrigues Neto – Universidade Estadual da Paraíba  
Jose Henrique de Lacerda Furtado – Instituto Federal do Rio de Janeiro  
Josenita Luiz da Silva – Faculdade Frassinetti do Recife  
Josiney Farias de Araújo – Universidade Federal do Pará  
Karina de Araújo Dias – SME/Prefeitura Municipal de Florianópolis  
Katia Fernanda Alves Moreira – Universidade Federal de Rondônia  
Laís Portugal Rios da Costa Pereira – Universidade Federal de São Carlos  
Laíze Lantyer Luz – Universidade Católica do Salvador  
Lindon Johnson Pontes Portela – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Lisiane Silva das Neves – Universidade Federal do Rio Grande  
Lucas Araújo Ferreira – Universidade Federal do Pará

Lucas Capita Quarto – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Lúcia Magnólia Albuquerque Soares de Camargo – Unifacisa Centro Universitário  
Luciana de Jesus Botelho Sodré dos Santos – Universidade Estadual do Maranhão  
Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas  
Luiza Catarina Sobreira de Souza – Faculdade de Ciências Humanas do Sertão Central  
Manoel Mariano Neto da Silva – Universidade Federal de Campina Grande  
Marcelo Alves Pereira Eufrazio – Centro Universitário Unifacisa  
Marcelo Williams Oliveira de Souza – Universidade Federal do Pará  
Marcos Pereira dos Santos – Faculdade Rachel de Queiroz  
Marcus Vinicius Peralva Santos – Universidade Federal da Bahia  
Maria Carolina da Silva Costa – Universidade Federal do Piauí  
Maria José de Holanda Leite – Universidade Federal de Alagoas  
Marina Magalhães de Moraes – Universidade Federal do Amazonas  
Mário César de Oliveira – Universidade Federal de Uberlândia  
Michele Antunes – Universidade Feevale  
Michele Aparecida Cerqueira Rodrigues – Logos University International  
Milena Roberta Freire da Silva – Universidade Federal de Pernambuco  
Nadja Maria Mourão – Universidade do Estado de Minas Gerais  
Natan Galves Santana – Universidade Paranaense  
Nathalia Bezerra da Silva Ferreira – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte  
Neide Kazue Sakugawa Shinohara – Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Neudson Johnson Martinho – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso  
Patrícia Appelt – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Paula Milena Melo Casais – Universidade Federal da Bahia  
Paulo Henrique Matos de Jesus – Universidade Federal do Maranhão  
Rafael Rodrigues Gomides – Faculdade de Quatro Marcos  
Reângela Cíntia Rodrigues de Oliveira Lima – Universidade Federal do Ceará  
Rebeca Freitas Ivanicska – Universidade Federal de Lavras  
Renan Gustavo Pacheco Soares – Autarquia do Ensino Superior de Garanhuns  
Renan Monteiro do Nascimento – Universidade de Brasília  
Ricardo Leoni Gonçalves Bastos – Universidade Federal do Ceará  
Rodrigo da Rosa Pereira – Universidade Federal do Rio Grande  
Rubia Katia Azevedo Montenegro – Universidade Estadual Vale do Acaraú  
Sabryna Brito Oliveira – Universidade Federal de Minas Gerais  
Samuel Miranda Mattos – Universidade Estadual do Ceará  
Selma Maria da Silva Andrade – Universidade Norte do Paraná  
Shirley Santos Nascimento – Universidade Estadual Do Sudoeste Da Bahia  
Silvana Carloto Andres – Universidade Federal de Santa Maria  
Silvio de Almeida Junior – Universidade de Franca  
Tatiana Pascholette R. Bachur – Universidade Estadual do Ceará | Centro Universitário Christus  
Telma Regina Stroparo – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Thayla Amorim Santino – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Thiago Sebastião Reis Contarato – Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Tiago Silveira Machado – Universidade de Pernambuco  
Virgínia Maia de Araújo Oliveira – Instituto Federal da Paraíba  
Virginia Tomaz Machado – Faculdade Santa Maria de Cajazeiras  
Walmir Fernandes Pereira – Miami University of Science and Technology  
Wanessa Dunga de Assis – Universidade Federal de Campina Grande  
Wellington Alves Silva – Universidade Estadual de Roraima  
William Roslindo Paranhos – Universidade Federal de Santa Catarina  
Yáscara Maia Araújo de Brito – Universidade Federal de Campina Grande  
Yasmin da Silva Santos – Fundação Oswaldo Cruz  
Yuciara Barbosa Costa Ferreira – Universidade Federal de Campina Grande



2023 - Editora Ampla

Copyright da Edição © Editora Ampla

Copyright do Texto © Os autores

Editor Chefe: Leonardo Pereira Tavares

Design da Capa: Editora Ampla

Diagramação: Juliana Ferreira

Revisão: Os autores

**Catálogo na publicação**  
**Elaborada por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166**

P436e

Pereira Filho, Adalberto Alves

ELISA: definição, variações e protocolos práticos / Adalberto Alves Pereira Filho. – Campina Grande/PB: Ampla, 2023.

Livro em PDF

ISBN 978-65-5381-153-9

DOI 10.51859/ampla.edv539.1123-0

1. Imunologia humana. 2. Farmácia. 3. Pesquisa científica. I. Pereira Filho, Adalberto Alves. II. Título.

CDD 616.079

Índice para catálogo sistemático

I. Imunologia humana

**Editora Ampla**  
Campina Grande – PB – Brasil  
contato@amplaeditora.com.br  
www.amplaeditora.com.br



2023

## **AGRADECIMENTO**

Ao prof. Nelder Gontijo que permitiu adquirir o conhecimento de técnicas imunológicas ao longo da trajetória universitária, e a técnica de laboratório Rosálida Estevam Nazar Lopes por compartilhar seus valiosos conhecimentos a respeito do assunto.

# APRESENTAÇÃO

O teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é uma metodologia imunológica amplamente usada para o diagnóstico de doenças infecto-parasitárias. Essa abordagem é baseada na interação específica entre antígeno e anticorpo, encontrando aplicação em diversos campos, como diagnóstico médico, pesquisa biológica e controle de qualidade na indústria farmacêutica. O ELISA possui diferentes tipos, tais como: direto, indireto, sanduíche e competitivo. O ELISA direto, por exemplo, se baseia em um anticorpo específico que é diretamente ligado a uma enzima, enquanto no indireto, é usado um anticorpo secundário ligado à enzima, em geral chamada de peroxidase. No formato sanduíche, dois anticorpos distintos são utilizados para capturar o antígeno.

Essa técnica se torna importante uma vez da sua alta sensibilidade, especificidade e capacidade de analisar várias amostras simultaneamente. No entanto, ela apresenta algumas desvantagens, como o custo elevado de reagentes específicos, a necessidade de um técnico altamente treinado e a possibilidade de resultados falsos positivos e negativos. O ELISA é uma ferramenta essencial na pesquisa científica, principalmente no diagnóstico de doenças infecto-parasitárias. Neste e-book iremos apresentar conceitos, exemplificar os tipos de ELISA e mostrar protocolos para a realização de um ELISA de forma prática, eficiente e que gere resultados coesos.

# SUMÁRIO

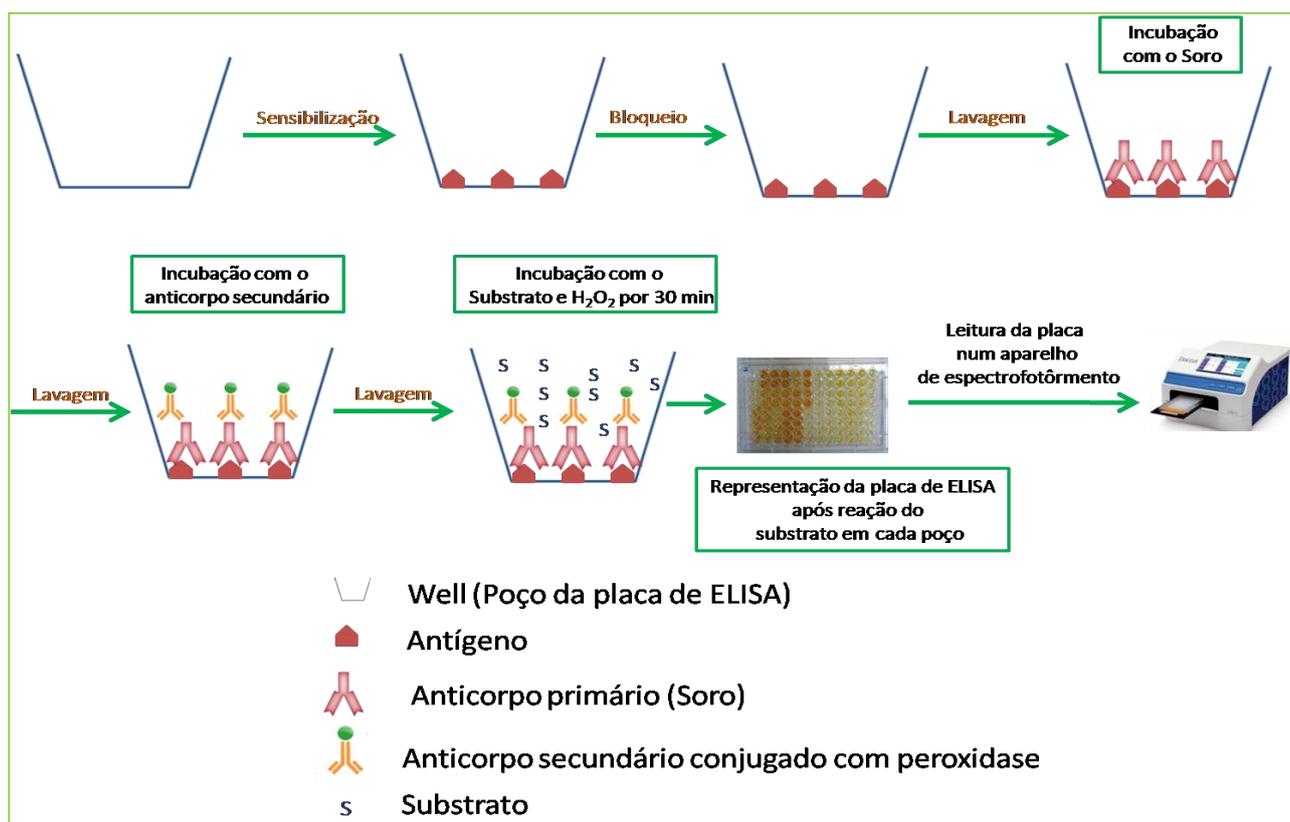
1. INTRODUÇÃO AO ELISA.....	9
2. ELISA DIRETO.....	10
3. ELISA INDIRETO.....	11
4. ELISA SANDUÍCHE.....	12
5. ELISA COMPETITIVO.....	13
6. VARIAÇÕES DO ELISA.....	14
7. APLICAÇÕES DO ELISA.....	14
8. ANÁLISES DOS RESULTADOS – UTILIZANDO O <i>CUT-OFF</i> E O ÍNDICE DE REATIVIDADE.....	15
9. A SEGUIR A DESCRIÇÃO DE PROTOCOLOS PRÁTICOS PARA A REALIZAÇÃO DE UM ELISA:.....	19
10. ELISA.....	20
11. PROTOCOLOS PRÁTICOS DE REAGENTES DO ELISA.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

## 1. INTRODUÇÃO AO ELISA

O ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é uma técnica imunológica empregada para identificar a presença de: proteínas, anticorpos, hormônios e outras moléculas em uma determinada amostra e fundamenta-se na interação altamente específica e sensível entre antígeno e anticorpo. No início dos anos 70, os cientistas Engvall e Perlmann foram os responsáveis pelo estabelecimento da técnica, e desde então, essa metodologia tem sido amplamente utilizada em diagnósticos clínicos e pesquisas científicas (Engvall & Perlmann 1971; Aydin et al. 2015; Hayrapetyan et al. 2023).

A base fundamental do ELISA é detectar moléculas podendo ser antígenos ou anticorpos por meio de reações enzimáticas. A análise é normalmente conduzida em uma placa de microtitulação com revestimento de antígenos específicos que se conectam ao anticorpos de interesse através dos seguintes passos: **Sensibilização** da placa com o antígeno, **Bloqueio** dos espaços não preenchidos por proteínas não reativas como albumina ou caseína provinda do leite, lavagem com PBS + Tween 20 para retirada do excesso do bloqueio, **incubação do soro** contendo o anticorpo (caso este soro for de um paciente positivo para a doença a ser pesquisada terá o anticorpo contra o antígeno, caso contrário não terá anticorpos que se ligarão ao antígeno de interesse e consequentemente a reação de revelação não acenderá), lavagem com PBS + Tween 20 mais uma vez, incubação do anticorpo secundário ligado a uma enzima (ex.: peroxidase, ou fosfatase alcalina), lavagem com PBS + Tween 20 mais uma vez, e por fim incubação com o substrato (OPD + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% + Solução Citrato) (Figura 1). A depender da enzima ligada ao anticorpo secundário e ao substrato a reação final terá cor verde, laranja ou azul. De maneira geral, o ELISA pode ser categorizado em quatro formatos principais: ELISA direto, ELISA indireto, ELISA sanduíche e ELISA competitivo.

Figura 1 – Representação esquemática de ELISA utilizando soro de paciente para pesquisa de anticorpos para uma determinada doença

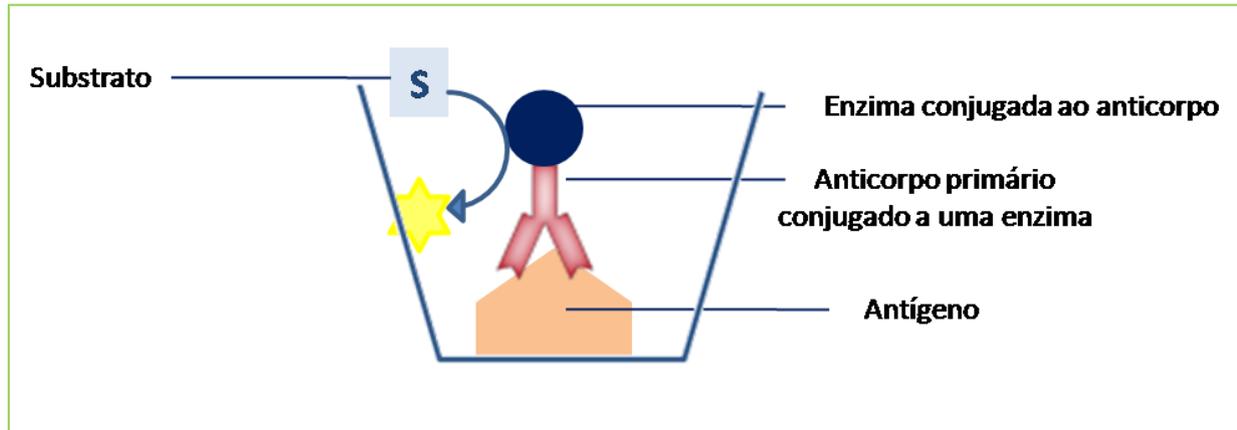


## 2. ELISA DIRETO

O ELISA direto é a forma mais prática do ELISA e tem como objetivo verificar a presença ou até mesmo a dosagem de anticorpo, permitindo reconhecer se o indivíduo ou animal foi exposto a um determinado patógeno (vírus, bactéria, parasita). Nesse ensaio, componentes antigênicos oriundos do soro são imobilizados em Placa 96 Poços de Poliestireno apropriada para a reação de ELISA. A seguir é adicionado o anticorpo em cada poço é adicionada para reagir. Neste caso, o anticorpo primário direcionado para a pesquisa daquele determinado antígeno já é comprado comercialmente e já vem ligado a uma enzima (esta enzima pode ser a peroxidase ou a fosfatase alcalina), que vai permitir promover a reação e mudança de cor ao contato com o substrato (Lin et al. 2015a).

Durante a etapa seguinte, ocorre o reconhecimento do antígeno pelo anticorpo e, após procedimentos intermediários, como incubação e lavagem, os componentes não fixados são removidos. Em seguida, a reação positiva é visualizada ao adicionar um substrato específico da enzima usada, causando uma mudança de cor na solução devido à catálise enzimática. A intensidade da cor é estimada colorimetricamente e é proporcional à concentração do anticorpo pesquisado, ou seja, quanto maior a quantidade de anticorpo pesquisado, maior a coloração oriunda da reação entre substrato e enzima ligada ao anticorpo (**Figura 2**).

Figura 2 – Representação esquemática de ELISA Direto.

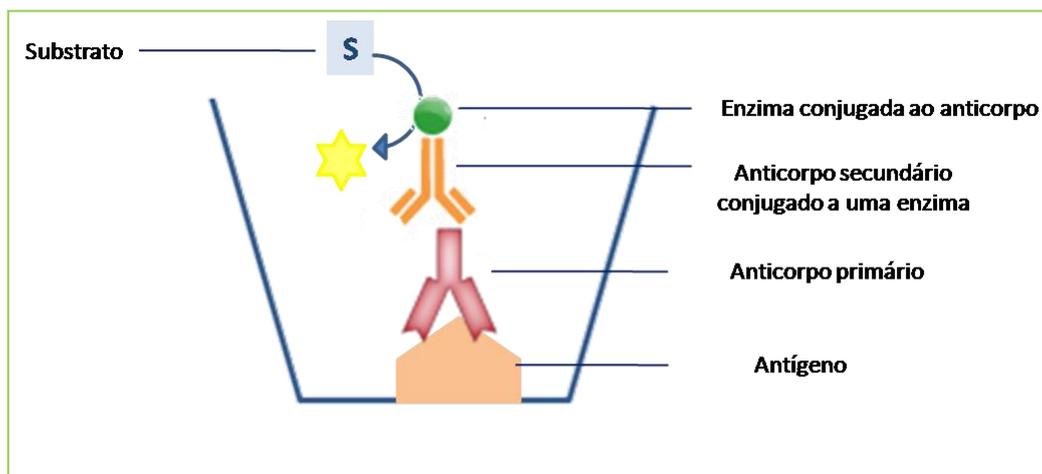


### 3. ELISA INDIRETO

No teste ELISA Indireto, o antígeno (oriundo da maceração e quebra de moléculas do patógeno) é adicionado a Placa 96 Poços de Poliestireno apropriada para a reação de ELISA. Posteriormente é adicionado anticorpos ou soro do paciente (que pode conter o anticorpo de interesse caso o soro contenha anticorpos direcionados para aquela doença a ser pesquisado (Kohi & Ascoli 2017; Tabatabaei et al. 2022). Após isso é acrescentado um segundo anticorpo, denominado anticorpo secundário (conjugado a uma enzima), o qual é específico para o anticorpo primário e que está conjugado ou ligado a uma determinada enzima e, após procedimentos intermediários, como incubação e lavagem, os componentes não fixados são removidos. Após a realização das lavagens, é adicionado o substrato, e a enzima gera o sinal de detecção resultante da reação química: Enzima, Peróxido de Hidrogênio e Substrato (**Figura 3**).

O ELISA Indireto tem como vantagens: 1 – Versatilidade - pois um único anticorpo primário pode ser usado para detectar diferentes antígenos. Isso é útil quando se deseja investigar a presença de várias substâncias em uma única amostra; 2 – Sensibilidade: O ELISA indireto é geralmente mais sensível do que o ELISA direto, pois permite a detecção de múltiplos anticorpos secundários ligados a um único anticorpo primário. Isso amplifica o sinal de detecção, tornando-o útil quando se trabalha com amostras que contêm baixas concentrações de antígeno (Lin et al. 2015b; Tabayabaei et al. 2022).

Figura 3 – Representação esquemática de ELISA Indireto.

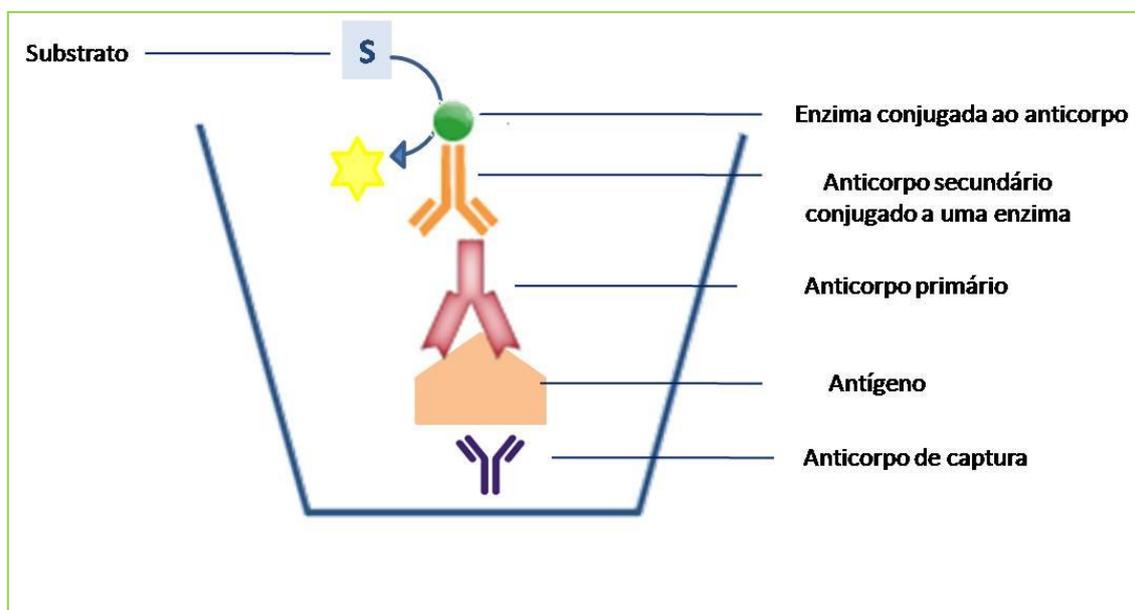


#### 4. ELISA SANDUÍCHE

A técnica ELISA Sanduíche é largamente utilizada para detectar antígenos específicos em baixas concentrações. Nesse método, são empregados dois anticorpos específicos diferentes: um anticorpo de captura e um anticorpo detector. O anticorpo de captura é imobilizado na placa e, em seguida, a amostra é adicionada. Caso o antígeno esteja presente, ocorrerá a ligação com o anticorpo de captura. Em sequência, é adicionado o anticorpo detector, o qual está ligado a uma enzima, formando assim um complexo antígeno-anticorpo-anticorpo detector. Após a realização das lavagens, é adicionado o substrato, e a enzima produz o sinal de detecção (Hayrapetyan et al. 2023).

O ELISA Sanduíche tem como vantagens: a alta especificidade, pois utiliza dois anticorpos diferentes que se ligam a epítopos diferentes do antígeno. Essa abordagem "sanduíche" permite uma detecção mais específica e menos suscetível a interferências e reatividade cruzada. Além disso, o ELISA sanduíche pode ser tido como frequentemente mais sensível do que o ELISA direto e o indireto. A combinação de dois anticorpos de ligação ao antígeno permite uma amplificação do sinal, tornando-o particularmente útil quando se trabalha com amostras que contêm baixas concentrações de antígeno (**Figura 4**).

Figura 4 – Representação esquemática de ELISA Sanduíche

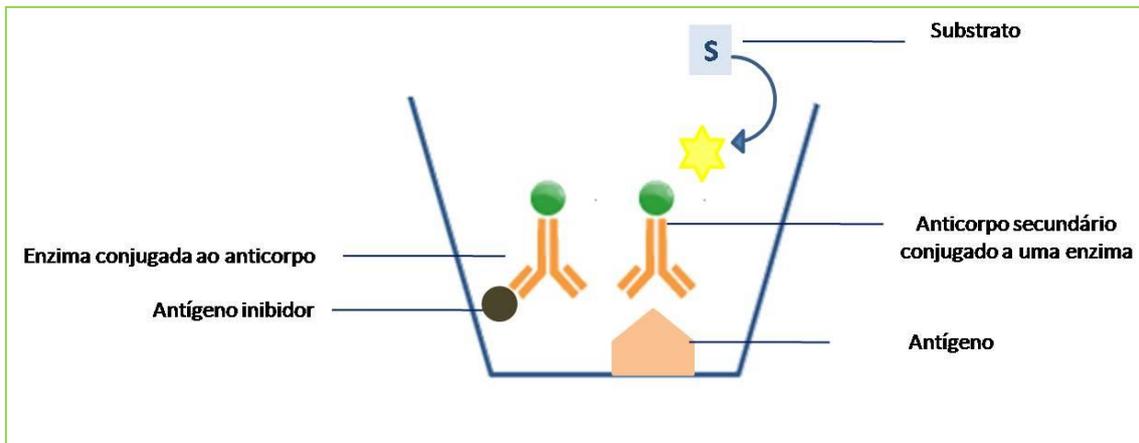


## 5. ELISA COMPETITIVO

No ELISA competitivo o antígeno é previamente incubado com um anticorpo específico marcado com uma enzima. Em seguida, a mistura antígeno-anticorpo é adicionada à placa revestida com um anticorpo capturador. O antígeno marcado competirá com o antígeno da amostra pela ligação ao anticorpo capturador na superfície da placa. Quanto maior a quantidade de antígeno na amostra, menor será a quantidade de antígeno marcado que se ligará ao anticorpo capturador. Após a lavagem para remover o excesso de reagentes, a atividade enzimática é medida, sendo inversamente proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra. (Hayrapetyan et al. 2023)

Embora o ELISA competitivo seja menos comum do que outras formas de ELISA, ele apresenta algumas vantagens específicas: 1 – Ampla aplicabilidade: O ELISA competitivo pode ser usado para a detecção de antígenos pequenos e de baixa imunogenicidade, onde outros formatos de ELISA podem não ser adequados; 2 – Sensibilidade: Devido ao princípio de competição, o ELISA competitivo pode ser altamente sensível na detecção de antígenos específicos (**Figura 5**).

Figura 5 – Representação esquemática de ELISA Competitivo



## 6. VARIAÇÕES DO ELISA

Diversas variações do ELISA foram criadas para atender diferentes exigências. Alguns exemplos abrangem o ELISA de fase sólida, ELISA de ponto final, ELISA de doseamento, ELISA de captura reversa, ELISA fluorescente, ELISA enzimático de imunoabsorção (EIA), entre outras. Cada adaptação apresenta suas vantagens e desvantagens, sendo escolhida conforme o propósito do ensaio e os recursos disponíveis (Hayrapetyan et al. 2023).

## 7. APLICAÇÕES DO ELISA

O teste ELISA possui uma extensa variedade de aplicações em diversas áreas, abrangendo o diagnóstico médico (por exemplo, detecção de infecções virais, auto-imunidade e marcadores tumorais), pesquisa biomédica (como estudos de imunologia e biologia molecular) e o controle de qualidade na indústria farmacêutica.

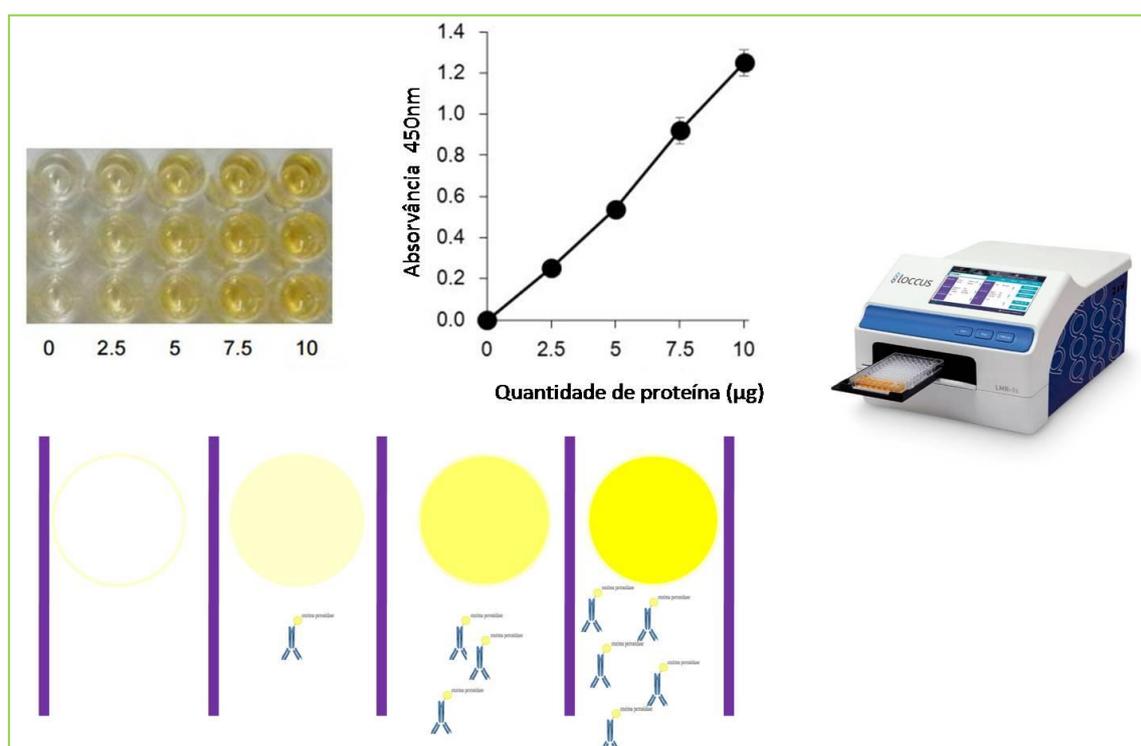
O teste ELISA é uma metodologia imunológica de grande importância, versátil e que se tornou indispensável tanto na pesquisa científica quanto no diagnóstico clínico. A contínua evolução e aprimoramento dessa técnica têm expandido ainda mais suas aplicações e aprimorado sua sensibilidade e especificidade. Embora apresente algumas limitações, os benefícios e a relevância do ELISA superam suas desvantagens, posicionando-o como uma das principais abordagens analíticas em laboratórios em todo o mundo.

Como já dito anteriormente, o princípio do funcionamento do ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é baseado na interação específica entre antígenos e anticorpos, que são componentes fundamentais do sistema imunológico. O teste ELISA é realizado em uma placa de

microtitulação, onde anticorpos específicos são fixados nas paredes da placa, criando um "revestimento" para capturar os antígenos de interesse.

A quantidade do produto formado está diretamente relacionada à quantidade de antígeno presente na amostra original, permitindo a quantificação do antígeno e sua detecção em diferentes concentrações em um leitor chamado de espectrofotômetro, como ilustrado na **Figura 6**. Dessa forma, em poços onde houve maior interação entre antígeno-anticorpo primário e conseqüentemente o anticorpo secundário, maior haverá a quebra de peróxido de hidrogênio (por conta da enzima peroxidase ligada ao anticorpo secundário), liberando  $O^{\cdot}$  que se reagirá ao substrato no caso abaixo representado pelo OPD, e conseqüentemente haverá maior valor de Absorvância.

Figura 6 – Representação esquemática do princípio de quantificação do ELISA em espectrofotômetro



## 8. ANÁLISES DOS RESULTADOS – UTILIZANDO O *CUT-OFF* E O ÍNDICE DE REATIVIDADE

O ponto de corte, também conhecido como *cut-off*, é um valor limite empregado em exames diagnósticos, como o ELISA, para determinar se um resultado é positivo ou negativo. Esse valor é estabelecido com base em estudos prévios, buscando maximizar a sensibilidade e especificidade do teste. No ELISA, o *cut-off* é calculado utilizando as leituras de amostras dos soros sabidamente negativos incluídos no ensaio. Denomina-se de amostras de soros negativas

aquelas que previamente já foram testadas e são oriundas de pacientes que não foram expostos a determinado patógeno.

A média das leituras dos controles negativos mais três vezes o desvio padrão é utilizada para determinar *cut-off*. Ao testar uma determinada amostra no ELISA, sua leitura é comparada com o *cut-off*. Se a leitura da amostra for maior que o *cut-off*, o resultado é considerado positivo, indicando a presença do anticorpo para aquele patógeno ou parasita de interesse. Caso a leitura seja menor ou igual ao *cut-off*, o resultado é considerado negativo, sinalizando a ausência do anticorpo para aquele patógeno ou parasita de interesse naquela amostra.

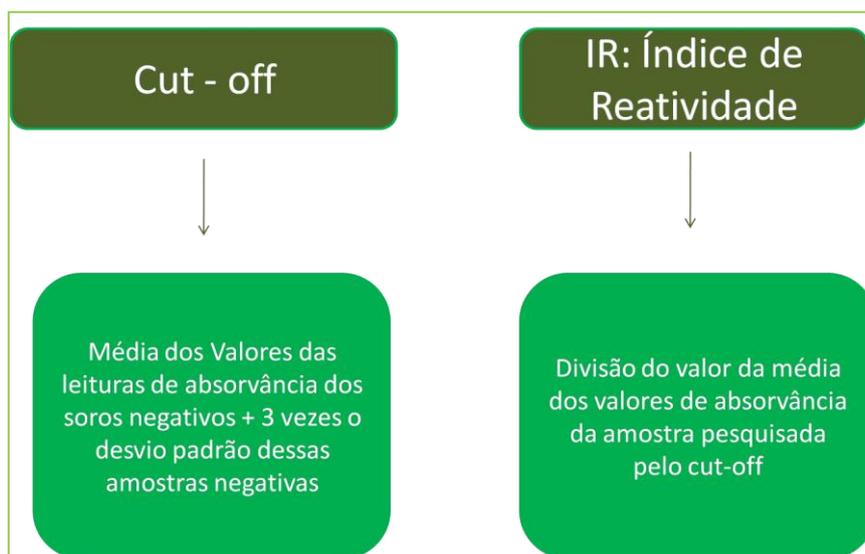
O *cut-off* é fundamental para a interpretação dos resultados dos testes diagnósticos, ajudando a distinguir entre verdadeiros positivos e falsos positivos, bem como verdadeiros negativos e falsos negativos. A correta definição do ponto de corte é essencial para garantir a precisão e confiabilidade dos resultados dos testes. Para calcular o *cut-off* pode-se utilizar a seguinte fórmula: **Média dos Valores das leituras de absorvância dos soros negativos + 3 vezes o desvio padrão dessas amostras negativas.**

Já o Índice de Reatividade, também conhecido como Índice de Positividade é um valor calculado a partir dos resultados obtidos do teste ELISA, com o objetivo de quantificar a reatividade de uma amostra em relação a um determinado antígeno ou marcador.

O Índice de Reatividade funciona como um calibrador e agente confirmatório verificando se aquela determinada amostra é positiva ou não. O Índice de Reatividade é calculado dividindo a leitura da amostra pelo valor de *cut-off* (ponto de corte). Se o Índice de Reatividade for maior que 1, significa que a amostra em questão é positiva. Se o Índice de Reatividade for menor que 1 indica que a presente amostra é negativa. Quando o Índice de Reatividade for igual a 1 ou bem próximo de 1 cabe refazer o teste visto que o soro do dado paciente pode estar saindo da janela imunológica e o nível de anticorpo ainda não ser suficiente ao ponto de ultrapassar esse valor de 1 ou ser bem superior ao nível do *cut-off*.

O Índice de Reatividade auxilia na interpretação dos resultados, fornecendo uma medida quantitativa da resposta do sistema imunológico à presença do anticorpo gerado pela presença do patógeno. Além disso, facilita a comparação de resultados entre diferentes amostras e experimentos, complementando o valor de referência que é o *cut-off*. A seguir a representação matemática simplificada da definição de *Cut-off* e Índice de Reatividade (**Figura 7**).

Figura 7 – Representação esquemática da definição de Cut-off e Índice de Reatividade



A seguir exemplos práticos e comentários de como se calcular o *cut-off* e o Índice de reatividade. A seguir na **tabela 1** temos os valores das amostras da absorvância de amostras de soros negativos. Sabendo que o *cut-off* é a Média dos Valores das leituras de absorvância dos soros negativos + 3 vezes o desvio padrão dessas amostras negativas, ao realizarmos o calculo dessas amostras temos como *cut-off* = 0,059.

Tabela 1 – Representação dos Valores das leituras de absorvância dos soros negativos

	Média dos Negativos + 3X Desvio Padrão
Poço A1	0,036
Poço A2	0,021
Poço B1	0,043
Poço B2	0,032
Poço C1	0,039
Poço C2	0,038
Poço D1	0,041
Poço D2	0,035
Poço E1	0,023
Poço E2	0,023
Poço F1	0,015
Poço F2	0,021
<b>Média</b>	<b>0,031</b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>0,009</b>

Na presente tabela 2 temos as leituras de dez amostras como exemplo. Considerando que o *cut-off* das amostras de soros negativos é 0,059 já calculado anteriormente, podemos

verificar que as amostras 1, 3, 4, 5 e 10 são positivas (em destaque de amarelo) uma vez que as médias das leituras das absorvâncias destas amostras são maiores que o *cut-off* = 0,059.

Tabela 2 – Representação dos Valores das leituras de absorvância de amostras de soros de pacientes

Amostras	Leitura 1	Leitura 2	Média das Leituras
1	0,195	0,1	0,148
2	0,047	0,044	0,046
3	0,126	0,137	0,132
4	0,119	0,095	0,107
5	0,071	0,082	0,077
6	0,05	0,054	0,052
7	0,037	0,038	0,038
8	0,058	0,045	0,052
9	0,06	0,054	0,057
10	0,095	0,104	0,100

Ainda utilizando o presente exemplo anterior e a definição de índice de Reatividade, que é a divisão do valor da média dos valores de absorvância da amostra pesquisada pelo *cut-off*, na presente tabela temos as leituras de dez amostras como exemplo (Tabela 3). Considerando que o *cut-off* das amostras de soros negativos é 0,059 e dividindo o valor da média dos valores de absorvância de cada amostra confirmamos as amostras 1, 3, 4, 5 e 10 mais uma vez como positivas.

Tabela 3 – Representação dos Valores das leituras de absorvância de amostras de soros de pacientes com a inclusão do Índice de Reatividade calculado

Amostras	Leitura 1	Leitura 2	Média das Leituras	Índice de Reatividade
1	0,195	0,1	0,148	2,50
2	0,047	0,044	0,046	0,77
3	0,126	0,137	0,132	2,23
4	0,119	0,095	0,107	1,81
5	0,071	0,082	0,077	1,30
6	0,05	0,054	0,052	0,88
7	0,037	0,038	0,038	0,64
8	0,058	0,045	0,052	0,87
9	0,06	0,054	0,057	0,97
10	0,095	0,104	0,100	1,69

## 9. A SEGUIR A DESCRIÇÃO DE PROTOCOLOS PRÁTICOS PARA A REALIZAÇÃO DE UM ELISA:

### PREPARO DE ANTÍGENO DE *Leishmania* PARA ELISA (ULTRA-SOM)

01. Uma cultura de promastigotas de *Leishmania infantum* em fase estacionária da curva de crescimento será submetida à contagem de células. Para isso 100 µL dessa cultura será retirada para diluir em 900 µL de isotom (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de cloreto de sódio, 15 mL de formol P.A 40 % em 1 L de água destilada). Após contagem deverá ser pego um volume da cultura cujo número de células no microtubo será final de  $1 \times 10^8$  células.
02. As promastigotas serão lavadas duas vezes por centrifugação (3000g/4°C/10min) com 200 µL de tampão PBS pH 7,4 gelado. Após a última lavagem o sedimento de células será ressuscitado num volume de 1000 µL de tampão PBS. A concentração de células nessa suspensão será final de  $1 \times 10^8$  células/mL;
03. Tomar uma preparação de aproximadamente de  $1 \times 10^8$  promastigotas suspensos em 2 ml de PBS pH 7,2 em tubo Falcon. Sonicar à 20 hertz (em banho de gelo) 5 à 7 vezes durante 45 segundos (Ultrasonic Homogeneizer – 4710; Coler-Palmer Instrument Co. ou outro aparelho similar). Acompanhar o rompimento dos parasitas em microscópio entre lamina e lamínula.
04. Dosar a concentração de proteínas pelo método de Lowry ou pelo método de Bradford.

### Dosagem de proteína (Método de Lowry)

#### **Soluções:**

Tartarato de Sódio e Potássio 4% em H<sub>2</sub>O (manter à -20C)

Sulfato de Cobre 2% em H<sub>2</sub>O

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - Carbonato de Sódio 3% em NaOH 0,1N

Reagente Fenol (Folin) (manter em geladeira e protegido da luz)

#### **1- Reagente de Cobre:**

Tartarato de Na e K	0,1ml
Sulfato de Cobre	0,1ml
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,8ml
Total	5,0ml

\*\*Preparar no momento de uso. O Tartarato de Na e K deve ser descongelado no momento do uso. Usar 1ml por tubo.

## 2- Reagente de Fenol (Folin):

Reagente de Folin deve ser diluído 1:3 em H<sub>2</sub>O no momento do uso. Usar 0,1ml por tubo.

Tubo	Amostra	H <sub>2</sub> O Destilada	Volume Amostra	Agitar Vortex	Reagente de cobre	Agitar Vortex	Reagente Fenol 1:3 em H <sub>2</sub> O	Agitar Imediatamente
1	Branco	100µl	--		1 ml	Imediatamente	100µl	leitura após
2	Padrão 1mg/ml	90µl	10µl		1 ml		100µl	
3	Amostra (Bruta)	90µl	10µl		1 ml	Repouso	100µl	10 minutos
4	Amostra (diluída 1:2)	90µl	10µl		1 ml	10 minutos	100µl	
5	*Amostra (diluída 1:5)	90µl	10µl		1 ml		100µl	
6	*Amostra (diluída 1:10)	90µl	10µl		1 ml		100µl	

\* Dilua a sua amostra em H<sub>2</sub>O destilada em outro tubo.

Leitura à 655 nm no espectrofotômetro (ou leitor de microplacas - ELISA).

### Exemplo de cálculo da concentração de proteína:

1. Com um único valor do padrão:

Ex.: Amostra (X) .....0,130 de absorb.

Padrão (1000µg/ml).....0,062

$$X=2097\mu\text{g/ml}$$

2. Com vários valores do padrão:

Regressão linear.

Obs.: O padrão deve ser preparado dissolvendo 1mg de albumina bovina (BSA) em 1ml de H<sub>2</sub>O destilada [Padrão] = 1 mg/ml. Manter a -20°C. Se estiver muito concentrada, a amostra analisada deve ser diluída e testada novamente.

## 10. ELISA

1. Sensibilizar a placa overnight (4°C) com 100µl/well do antígeno diluído (de acordo com a concentração padronizada: 0,5 ug/well) em tampão apropriado (Coating buffer). Validade  $\pm$  1 semana.

### **No dia do experimento:**

2. Desprezar a solução do antígeno, lavar 2 vezes com solução de lavagem e secar por inversão em papel absorvente (ou Perfex). Bloquear com PBS-Caseína 2% por 30 minutos a 37°C e logo em seguida lavar 2 vezes com solução de lavagem, secar e colocar os soro)
3. Diluir o soro na diluição definida previamente em PBS-Tween 20 à 0,5% + CASEÍNA 0,25% (PBS-T/Caseína 0,25%). Usar 2 soros controle positivos e 6 soros controle negativo para calcular o cut off.

Colocar 100µl das amostras de soro diluído/well. (esta diluição poderá ser feita no dia anterior se conservada a 4°C, até a hora da distribuição na placa).

Colocar 100µl de PBS-T/Caseína 0,25% (sem soro) em alguns poços. Estes serão: o Branco para zerar o aparelho. Incubar por 45 min. a 37°C.

**Se for avaliar avidéz de IgG, seguir para o item 4.**

**Se for realizar elisa indireto convencional, lavar por 2 x, secar em papel absorvente e pular para item 05.**

### **4. Avaliação da avidéz de IgG (lavagem adicional com Uréia 6M em PBS-T20-0,5%)**

**Preparo:** 36,03g de Uréia em 100 mL de PBS-T20-0,5% (qsp) – (Para se dissolver a uréia, usar PBS-T20-0,5% aquecido, adicionar a Uréia e agitar).

- a) **Lavar 1 vez com solução de lavagem e secar por inversão em papel absorvente**
  - b) **Adicionar 100µl/well de PBS-T/Caseína 0,25% nas colunas de 1 a 5 e 100µl/well de PBS-T/Caseína 0,25%/Uréia 6M nas colunas de 7 a 8, por 5 minutos com agitação (em temperatura ambiente).**
  - c) **Descartar e lavar acrescentando 100µl de PBS-T/Caseína 0,25% em todas as colunas trabalhadas (2 ciclos de 5 minutos cada) sob agitação.**
5. Adicionar 100µl/well do conjugado (anti IgG de Camundongo) diluído em PBS-T/Caseína 0,25% conforme titulação prévia e deixar à 37°C por 45 min. *Obs.: O conjugado é marcado com peroxidase e específico ao animal e imunoglobulina pesquisado.*

6. Desprezar e lavar 4 vezes com solução de lavagem e secar por inversão.

7. Preparar a solução substrato-reveladora (feito na hora), 15 ml por placa.

**Preparo do substrato:** Para 1 placa: em 15 ml de solução de ácido cítrico (tampão) adicionar 3mg de o-fenilenodiamino (OPD) e 3µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 vol.) acrescentar na hora do uso (sensível a luz).

*OBS.: O OPD É CANCERÍGENO À INALAÇÃO E AO CONTATO. Descartar todo material usado com OPD em uma solução de NAOH 0,2% em água comum por no mínimo 2 horas: o NAOH neutraliza o OPD.*

8. Colocar 100µl/well da solução de substrato por 20 minutos no escuro à 37°C. Ligar o leitor de microplacas.

9. Interromper a reação com 25µl/well de ácido sulfúrico 4N [*Preparo da solução estoque de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/4N (± 1L): 1/20 em H<sub>2</sub>O destilada.*

**(Para se diluir um ácido sempre se coloca o ácido sobre a água) PARA 200 mL COLOCA-SE 190 mL DE ÁGUA DESTILADA E 10 mL DE ÁCIDO SULFÚRICO – ESCORRENDO LENTAMENTE NA PAREDE DA PROVETA).**

10. Ler imediatamente após interromper a reação com filtro de 490nm, limpando a placa por baixo com papel embebido em álcool antes da leitura.

11. Cut off.

*Usar 6 soros negativos em cada placa para calcular o Cut Off.*

*Cut off = (media da absorbância dos 6 negativos) + 3DP.*

*Índice de Reatividade (IR) = Abs. Amostra/cut off.*

*IR<0,9 = Soro negativo. 0,9>IR<1,1 = Soro duvidoso/ indeterminado. IR>1,1 = Soro Positivo.*

**Obs.: Pode ser congelados seguintes itens: Solução de bloqueio, Solução diluidora de anticorpo (BSA ou caseína); Solução de Ácido Cítrico , antígeno, solução de ligação (cut-buffing); E as soluções que se deve fazer a diluição na hora e NÃO devem ser congeladas: solução de antígeno, solução do conjugado, e substratos (opd, peróxido de hidrogênio).**

## 12. Índice de Avidéz de IgG

Calcular o Índice de Avidéz (IA) de cada soro amostra com IR positivo: razão do valor em absorbância com úreia pelo valor em absorbância sem úreia X 100.

## 11. PROTOCOLOS PRÁTICOS DE REAGENTES DO ELISA

### 11.1. Preparo dos Reagentes do ELISA

- **Coating Buffer** (ou Solução de Ligação de Antígeno/proteína) pH 9,6

<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	1,59g	0,80g
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	2,93g	1,47g
<b>H<sub>2</sub>O destilada (qsp)</b>	1,00 L	0,50 L

- **Caseína**

Aquecer 400ml de PBS pH 7,2 no microondas, (em becker de vidro de 1L). Acrescentar 20,0g de caseína sob agitação por 30 min. até dissolver toda a caseína. Completar o volume para 1 Litro (A caseína só deve ser acrescentada após o PBS estar aquecido).

- **Solução de Lavagem**

<b>NaCl</b>	9 g
<b>Tween 20</b>	0,5ml
<b>H<sub>2</sub>O destilada(qsp)</b>	1 L

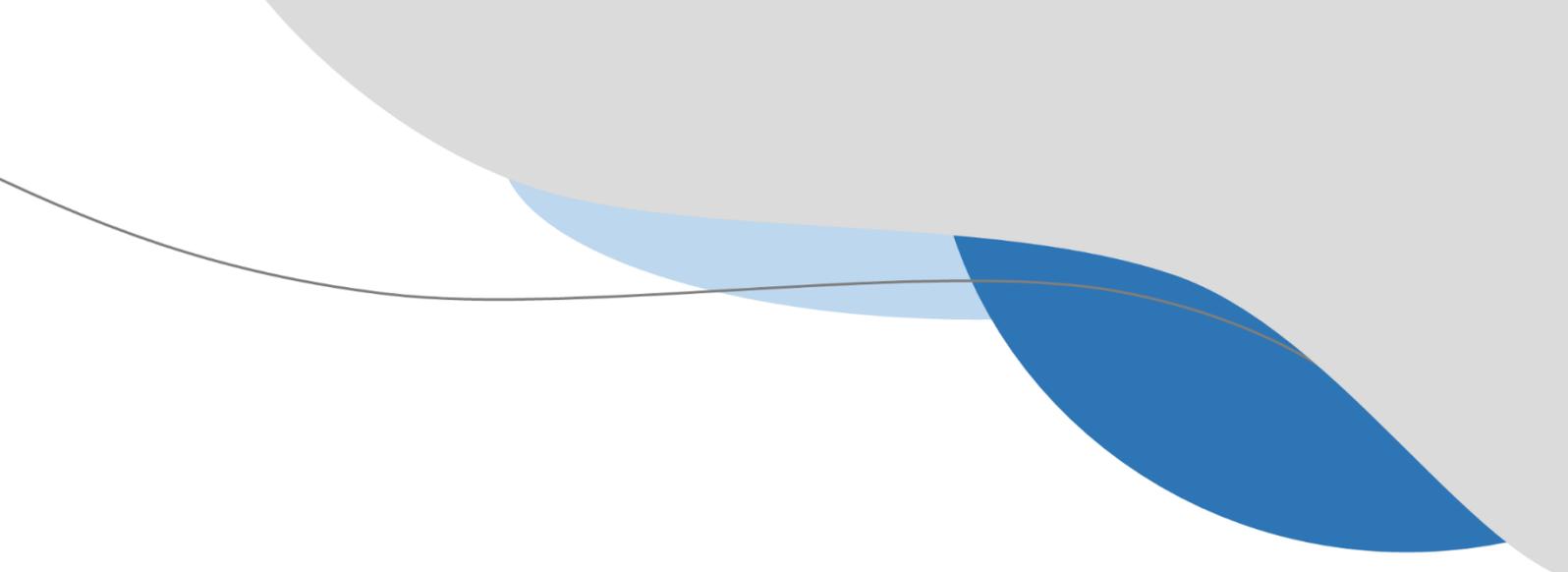
\*Adicionar o Tween20 após dissolver o NaCl.

- **Solução de Ácido Cítrico (tampão substrato) pH 5,0**

<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> Ou <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .12 H<sub>2</sub>O</b>	7,19g 18,0g	3,6g 9,0g
<b>Ácido Cítrico</b>	5,19g	2,6g
<b>H<sub>2</sub>O destilada (qsp)</b>	1 L	0,5L

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*. 2015;72:4-15. doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012
- Lin AV. Indirect ELISA. *Methods Mol Biol*. 2015a;1318:51-59. doi:10.1007/978-1-4939-2742-5\_5
- Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 2022;2508:115-134. doi:10.1007/978-1-0716-2376-3\_10
- Reen DJ. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Methods Mol Biol*. 1994;32:461-466. doi:10.1385/0-89603-268-X:461
- Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8 (9):871±874.
- Hayrapetyan H, Tran T, Tellez-Corrales E, Madiraju C. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: Types and Applications. *Methods Mol Biol*. 2023;2612:1-17. doi:10.1007/978-1-0716-2903-1\_1
- Kohl TO, Ascoli CA. Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Cold Spring Harb Protoc*. 2017;2017(7):pdb.prot093757. Published 2017 Jul 5. doi:10.1101/pdb.prot093757
- Lin AV. Indirect ELISA. *Methods Mol Biol*. 2015b;1318:51-59. doi:10.1007/978-1-4939-2742-5\_5



9 786553 811539

