

## TESTE DE ELISA

O teste de “ELISA” (do inglês “**E**nzyme **L**inked **I**mmunono**S**orbent **A**ssay) se baseia reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas.

A enzima mais comumente utilizada nestas provas é a peroxidase, que catalisa a reação de desdobramento da água oxigenada ( $H_2O_2$ ) em  $H_2O$  mais  $O_2$ .

Existem vários modelos de testes de ELISA; em sua forma mais simples, chamada ELISA indireto, um antígeno aderido a um suporte sólido (placa de ELISA) é preparado; a seguir coloca-se sobre este os soros em teste ( ex. soro humano), na busca de anticorpos contra o antígeno. Se houver anticorpos no soro em teste ocorrerá a formação da ligação antígeno-anticorpo, que posteriormente é detectada pela adição de um segundo anticorpo dirigido contra imunoglobulinas da espécie onde se busca detectar os anticorpos (humana, no caso), a qual é ligada à peroxidase. Este anticorpo anti-IgG, ligado à enzima denomina-se **conjugado**. Ao adicionar-se o **substrato** apropriado para a enzima (isto é,  $H_2O_2$  dissolvida em uma substância química que dá uma reação colorida quando  $H_2O_2$  é desdobrada). Os orifícios onde ocorreu a reação antígeno-anticorpo apresentam uma coloração (variável dependendo do substrato).

Outro método é o chamado ELISA de bloqueio ou competição, em que a presença de anticorpos em determinado soro é revelada pela competição com um anticorpo específico (mono ou policlonal) dirigido contra o antígeno. Igualmente, o resultado é dado pela adição de um conjugado, porém a coloração aparecerá nos orifícios onde não havia anticorpos.

A seguir, temos um modelo de teste de ELISA de bloqueio, desenvolvido por nós e utilizado amplamente em nosso laboratório para o diagnóstico de anticorpos contra herpesvírus bovinos.

### **Método:**

1 – Sensibilizar as placas de ELISA com o antígeno, previamente diluído (no nosso exemplo, diluído a 1/200, correspondente à diluição considerada ótima em titulações anteriores), em tampão carbonato (vide fórmulas no final), 100 ul por orifício, e incubar overnight a 4 °C. Isto permitirá a ligação do antígeno à placa.

2- No dia seguinte, remover a solução de antígeno e lavar a placa 3 vezes com líquido de lavagem de ELISA (PBS-T20), em volume de 100 ul por orifício.

3- A placa pode então ser armazenada para uso posterior (em sacos plásticos fechados a – 20 °C, ou utilizada imediatamente.

4- Acrescentar os soros a testar em uma diluição previamente determinada ( ½ em nosso exemplo), preparada em líquido de lavagem, em volumes de 100 ul/orifício. Incubar por uma hora a 37 °C.

5- Remover a diluição dos soros e lavar três vezes com líquido de lavagem.

6- Acrescentar 100 ml por orifício de uma diluição apropriada do anticorpo monoclonal (1:1000 em nosso exemplo), preparada em líquido de lavagem. Incubar por uma hora a 37 °C.

7 - Remover o anticorpo monoclonal e lavar três vezes com líquido de lavagem.

8- Acrescentar 100 ml por orifício de uma diluição apropriada do conjugado (anti- IgG de camundongos; 1:1000 em nosso exemplo), preparada em líquido de lavagem. Incubar por uma hora a 37 °C.

9- Remover a diluição de conjugado e lavar três vezes com líquido de lavagem.

10- Acrescentar 100 ml por orifício de uma solução de OPD (ortofenilenodiamina) preparada em tampão citrato-fosfato acrescentado de 0,001% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Incubar por 15 minutos a 37 °C.

11- A reação é interrompida pela adição de 50 ml por orifício de uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M.

12- Os resultados são obtidos com base na leitura da densidade ótica (D.O.) em espectrofotômetro com filtro de 492 nm.