

Recabido em 16 de Abril de 1982

# A técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

por

**AMARILIS DE VARENNES**

Assistente do Instituto Superior de Agronomia

## RESUMO

No presente trabalho faz-se uma descrição da técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Referem-se os vários parâmetros de execução desta técnica, as possibilidades de conservação das amostras e das placas sensibilizadas e de reutilização das placas e dos conjugados. Apresenta-se a relação existente entre a concentração de vírus e os valores do teste ELISA e mostra-se um exemplo de aplicação dessa relação.

## SYNOPSIS

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) is described in this paper. Some characteristics of this technique, samples and coated plates preservation and re-use of plates and conjugates are described. The relationship between virus concentration and ELISA values is shown, with an example of its utilization.

## INTRODUÇÃO

As técnicas serológicas «clássicas» como o teste da precipitação em tubo, o teste do anel ou o teste da dupla difusão em agar não

se mostraram adequadas à detecção dos vírus que infectam as plantas lenhosas directamente nos extractos de tecidos dos seus hospedeiros naturais. Esta limitação é geralmente devida à baixa concentração de vírus nas plantas lenhosas, à presença de conteúdos celulares que interferem na reacção antigénio-antissoro e à baixa sensibilidade daquelas técnicas serológicas.

O desenvolvimento de técnicas mais sensíveis e em que os conteúdos celulares são removidos por lavagem, como a técnica ELISA [7], permitiu a detecção de virus em situações em que os métodos convencionais de diagnóstico não podiam ser utilizados [8, 12].

A técnica ELISA pode ser usada em programas de indexagem e em estudos epidemiológicos, permitindo a testagem de um grande número de amostras e a utilização de amostras compostas (*bulk sampling*), com grande economia de tempo, trabalho e custo. Também pode ser usada para detectar outros agentes infecciosos como fungos [14] e espiroplasmas [16].

Na técnica ELISA os antigénios são fixados selectivamente por anticorpos adsorvidos a uma superfície sólida e a sua presença detectada por adição de anticorpos específicos ligados a uma enzima e de um substracto que origina um produto final corado. A técnica pode ser utilizada para fins quantitativos se a reacção final for avaliada colorimetricamente.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Tampões*

Tampão de revestimento (TR) — carbonato de sódio, 0,05M, pH 9,6.

Tampão fosfato salino (TFS) — fosfato (Na-K), 0,02M, pH 7,4 mais 0,8 % de Na Cl e 0,02 % de KCl.

Tampão de lavagem (TL) — TFS mais 0,05 % de Tween 20.

Tampão de extracção (TE) — TL mais 2 % de polivinil pirrolidona (pm 40 000) e 0,2 % de albumina de ovo (podem ainda ser utilizados outros aditivos como a nicotina ou o dietilditiocarbamato de sódio — DIECA).

Tampão do substracto da fosfatase (TSF) — dietanolamina a 10 %, ajustada a pH 9,8 com HCl.

Tampão do substracto da peroxidase (TSP) — acetato de sódio, 0,02M, pH 5,5 a que se junta 0,06% de peróxido de hidrogénio antes de usar.

Tampão de dissociação (TD) — glicina-HCl, 0,2M, pH 2,2.

A todos os tampões adiciona-se 0,02% de azida de sódio como conservante.

#### *Preparação da Gamaglobulina*

Para obtenção de resultados satisfatórios o antissoro utilizado deve possuir um título mínimo de 1:500. O título do soro em relação a antigénios do hospedeiro não deve exceder 1:8 [6].

A fracção gamaglobulina pode ser separada por duas precipitações com sulfato de amónio a 50%, ou então por uma precipitação seguida de uma passagem por uma coluna de troca aniónica, como por exemplo DEAE celulose (Whatman Ltd.) ou DEAE Shepadex (Pharmacia Ltd.). Nos ensaios efectuados não se encontrou qualquer diferença entre os métodos de preparação empregados.

A gamaglobulina é ajustada a  $A_{280} = 1,4$  correspondendo à concentração de  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$  e conservada por congelamento ou por liofilização.

#### *Conjugação da Gamaglobulina com a Enzima*

As enzimas utilizadas nesta técnica são a fosfatase alcalina (tipo VII da Sigma) ou a peroxidase extraída do nabo (tipo VI da Sigma).

A enzima é dissolvida na preparação de gamaglobulina, na concentração de  $2,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ . Após diálise contra TFS, adiciona-se glutaraldeído como agente acoplador. A concentração final do glutaraldeído é normalmente de 0,05-0,06% [6, 7] mas em alguns casos deve ser apenas da ordem de 0,015% [13].

Após incubação à temperatura ambiente durante 4 h, o conjugado é dialisado contra TFS e depois adicionado de cerca de 0,5% de albumina de soro bovino. O conjugado assim obtido é conservado a 4°C.

### EXECUÇÃO

Os vários passos da técnica ELISA estão assinalados na Fig. 1. As placas de microtitulação de fundo plano ou em U (Cooke Microti-

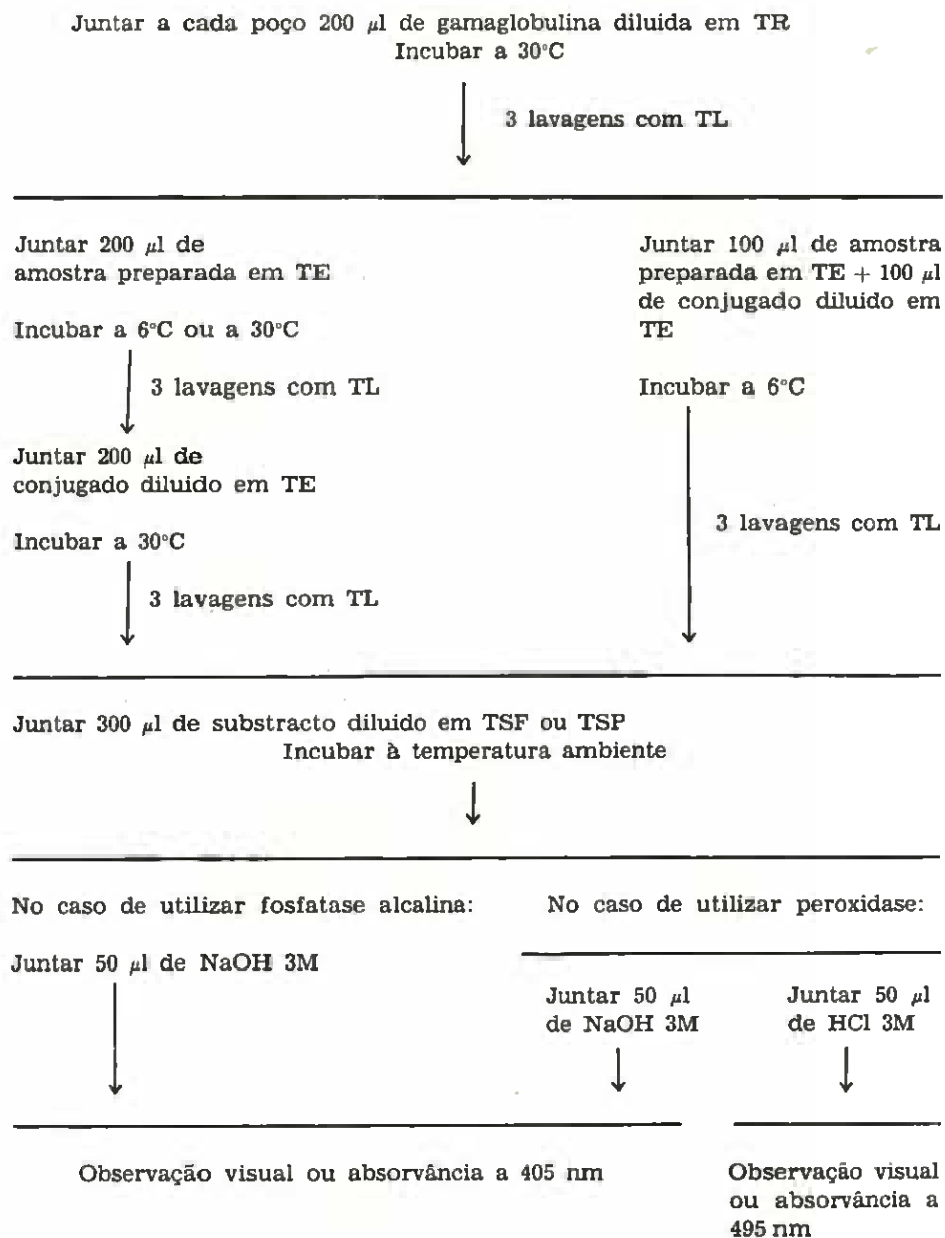


Fig. 1. Execução da técnica ELISA

tre da Dinotech Ltd ou Linbro Microtitre da Linbro Scientific Co.) são sensibilizadas com a gamaglobulina diluída em TR. Após incubação a 30°C, as placas são lavadas três vezes com TL, por imersão dos poços durante 3 minutos para cada lavagem.

As amostras são incubadas nas placas sensibilizadas, isolada ou juntamente com o conjugado. No primeiro caso, após três lavagens, o conjugado (diluído em TE) é adicionado posteriormente e incubado a 30°C.

Após lavagem das placas, adiciona-se o substracto:

1) *p*-nitrofenil fosfato (Sigma N.104) em concentrações variáveis de 0,5-1,0 mg.ml<sup>-1</sup> em TSF, no caso de se ter utilizado o conjugado de fosfatase alcalina.

2) *o*-fenilenodiamina (Sigma) diluído em TSP (0,5 mg.ml<sup>-1</sup>) no caso de se ter utilizado o conjugado de peroxidase.

A reacção final processa-se à temperatura ambiente durante 10-60 min., sendo interrompida por adição de NaOH 3M ou HCl 3M (só no caso de se ter utilizado a peroxidase). Os resultados são avaliados visualmente ou por medição da absorvância a 405 nm ou a 495 nm (quando se adicionou HCl). Normalmente considera-se o resultado positivo quando o valor da absorvância é igual ou superior ao dobro do valor do controlo são. Também se pode recorrer à interpretação estatística dos resultados.

#### *Sensibilização das Placas*

Dentro de certos limites, o processo de sensibilização é tanto mais rápido quanto mais concentrada estiver a gamaglobulina. Contudo, baixas diluições da gamaglobulina e curtos períodos de incubação conduzem a valores mais baixos do que períodos de incubação mais longos com concentrações menores de gamaglobulina. Para cada combinação vírus-antissoro, deve-se averiguar as condições de sensibilização das placas, tendo em vista uma optimização dos resultados ou uma maior rapidez de execução.

#### *Conservação das Placas Sensibilizadas*

Podem-se sensibilizar placas de microtitulação sempre que se executa a técnica ELISA. Contudo, é mais prático sensibilizar um lote de placas e usá-las à medida que forem sendo necessárias.

As placas sensibilizadas podem ser conservadas no frigorífico mas apenas por curtos períodos de tempo (alguns dias) perdendo rapidamente a sua sensibilidade. No Quadro I pode verificar-se que houve uma perda de sensibilidade de 27-42% após a permanência de placas sensibilizadas, no frigorífico, durante uma semana.

#### QUADRO I

*Influência da conservação das placas sensibilizadas, no frigorífico, nos valores do teste ELISA -  $A_{405\text{ nm}}$  (média  $\pm$  erro padrão)*

Diluição das amostras	Conservação das placas sensibilizadas		Perda de sensibilidade (%)
	Utilizadas imediatamente	Utilizadas após uma semana no frigorífico	
1:8000	1,73 $\pm$ 0,08	1,26 $\pm$ 0,07	27
1:16000	0,842 $\pm$ 0,031	0,561 $\pm$ 0,005	33
1:32000	0,485 $\pm$ 0,024	0,282 $\pm$ 0,036	42
1:64000	0,302 $\pm$ 0,011	0,220 $\pm$ 0,006	27

Como amostras utilizaram-se extractos brutos de *Chenopodium quinoa* Willd. infectado com o Vírus CM 112 da Videira.

Quando se pretende conservar as placas sensibilizadas por períodos relativamente longos deve-se recorrer ao congelamento. No Quadro II verifica-se que houve apenas uma perda de sensibilidade de 17-26% após o congelamento de placas sensibilizadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 100 dias.

#### *Preparação das Amostras*

Como antigénio podem usar-se preparações de vírus purificado ou extractos brutos de plantas infectadas. Também já se detectaram vírus directamente nos seus vectores biológicos [11].

Os extractos brutos de plantas infectadas são normalmente preparados na diluição 1:50 em TE. Já têm sido utilizados extractos mais concentrados [4], mas para pequenas diluições, as reações não específicas são algumas vezes muito intensas.

## QUADRO II

Influência da conservação das placas sensibilizadas, por congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , nos valores do teste ELISA —  $A_{405\text{ nm}}$  (média  $\pm$  erro padrão)

Diluição das amostras	Conservação das placas sensibilizadas		Perda de sensibilidade (%)	
	Utilizadas imediatamente	Utilizadas após congelamento a $-20^{\circ}\text{C}$ durante 100 dias		
v	1:50	0,393 $\pm$ 0,010	0,291 $\pm$ 0,024	26
	1:100	0,344 $\pm$ 0,015	0,284 $\pm$ 0,019	17
	1:200	0,272 $\pm$ 0,017	0,218 $\pm$ 0,009	20
q	1:4000	1,92 $\pm$ 0,04	1,52 $\pm$ 0,11	21
	1:8000	1,64 $\pm$ 0,04	1,35 $\pm$ 0,20	18
	1:10000	1,11 $\pm$ 0,05	0,912 $\pm$ 0,005	18

Como amostras utilizaram-se:

v — extractos brutos de *Vitis vinifera* L. infectada com o Vírus CM 112 da Videira.

q — extractos brutos de *Chenopodium quinoa* Willd. infectado com o Vírus CM 112 da Videira.

Devem incluir-se testemunhas em todas as placas — TE, extractos brutos de plantas sãs ou homogeneizados de vectores alimentados em plantas sãs.

Quando se pretende detectar vírus directamente nos extractos de tecidos de plantas lenhosas, pode ser vantajosa a utilização de outros aditivos além de polivinil pirrolidona e albumina de ovo. Alguns autores [5, 9] acrescentaram DIECA e/ou nicotina ao TE, quando aplicaram a técnica ELISA na detecção do Vírus do Urticado da Videira e DIECA [10] quando na detecção do Vírus da Mancha Foliar Clorótica da Macieira.

Em relação à detecção do Vírus CM 112 da Videira, verificou-se ser vantajosa a adição de 0,5 % de nicotina (Quadro III); a presença de DIECA não se mostrou tão favorável, quer isolada quer juntamente com a nicotina (Quadro IV).

## QUADRO III

*Influência da presença de nicotina no tampão de extracção, nos valores do teste ELISA -  $A_{405\text{ nm}}$  (média  $\pm$  erro padrão)*

Diluição das amostras	Quantidade de nicotina (%)			
	0,0	0,5	1,0	2,5
1:500	1,11 $\pm$ 0,02	1,16 $\pm$ 0,01	1,14 $\pm$ 0,01	1,03 $\pm$ 0,02
1:2500	0,406 $\pm$ 0,003	0,430 $\pm$ 0,004	0,414 $\pm$ 0,004	0,318 $\pm$ 0,002
1:5000	0,220 $\pm$ 0,001	0,232 $\pm$ 0,003	0,229 $\pm$ 0,004	0,161 $\pm$ 0,002

Como amostras utilizaram-se diluições de uma preparação purificada do Vírus CM 112 da Videira no tampão de extracção mais aditivo, tendo-se em seguida utilizado essas diluições para preparar extractos brutos de folhas sãs de *Vitis vinifera* L. na proporção de 1:50.

## QUADRO IV

*Influência da presença de aditivos no tampão de extracção, nos valores do teste ELISA -  $A_{405\text{ nm}}$  (média  $\pm$  erro padrão)*

Diluição das amostras	Aditivo utilizado			
	nenhum	nicotina 0,5 %	DIECA 0,2 %	nicotina 0,5 % + DIECA 0,2 %
1:1000	2,38 $\pm$ 0,03	2,81 $\pm$ 0,03	2,76 $\pm$ 0,05	2,65 $\pm$ 0,04
1:5000	0,557 $\pm$ 0,008	0,640 $\pm$ 0,007	0,609 $\pm$ 0,003	0,547 $\pm$ 0,011
1:10000	0,289 $\pm$ 0,007	0,348 $\pm$ 0,006	0,330 $\pm$ 0,004	0,294 $\pm$ 0,001

Como amostras utilizaram-se diluições de uma preparação purificada do Vírus CM 112 da Videira no tampão de extracção mais aditivo, tendo-se em seguida utilizado essas diluições para preparar extractos brutos de folhas sãs de *Vitis vinifera* L. na proporção de 1:50.

*Conservação das Amostras*

A possibilidade de conservar as amostras que se pretendem testar pela técnica ELISA permite fazer grandes colheitas de material e testá-las nos dias seguintes ou mesmo em épocas do ano de pouco trabalho nos laboratórios.

Devem fazer-se as colheitas de material das porções das plantas onde a concentração de vírus é mais elevada. Por exemplo, no caso da videira (*Vitis vinifera* L.) e do Vírus CM 112 da Videira, verificou-se serem as folhas superiores ainda não completamente expandidas ( $\varnothing$  5-6 cm) aquelas que continham maiores quantidades de vírus.

As amostras podem ser conservadas no frigorífico por curtos períodos de tempo, ou então por congelamento ou desidratação, por longos períodos. Para cada hospedeiro e vírus deve-se determinar o melhor modo de conservação. Por exemplo, em testagens do Vírus da Tristeza directamente de tecidos de citrinos [4], as amostras foram conservadas por congelamento ou por desidratação sob vácuo seguida de congelamento.

#### *Incubação das Amostras*

As amostras podem ser incubadas isolada ou juntamente com o conjugado. O segundo processo pode ser o único possível para alguns vírus [10]. Tem a vantagem de tornar o teste mais rápido mas impossibilita a reutilização do conjugado.

A incubação das amostras é normalmente feita no frigorífico, durante a noite, mas também pode ser feita a 30°C durante um período de tempo mais curto (1-3h).

#### *Concentração e Incubação do Conjugado*

As preparações do conjugado podem variar muito, mesmo quando preparadas com a mesma gamaglobulina, devido a variações na actividade da enzima (com a idade, modo de conservação, etc.). Deve-se por isso ensaiar para cada caso a diluição apropriada do conjugado assim como o período de incubação do mesmo.

#### *Reutilização das Placas e dos Conjugados*

A técnica ELISA é relativamente dispendiosa devido ao elevado custo das placas e das enzimas. Por esse facto, alguns autores [2, 3] estudaram a possibilidade de reutilização das placas e dos conjugados. Verificaram que o tratamento das placas usadas, com TD, durante 1 h à temperatura ambiente, separa o complexo antigénio-anticorpo, permanecendo os anticorpos ligados à superfície sólida, podendo as placas ser utilizadas novamente (Fig. 2). Verificaram contudo que

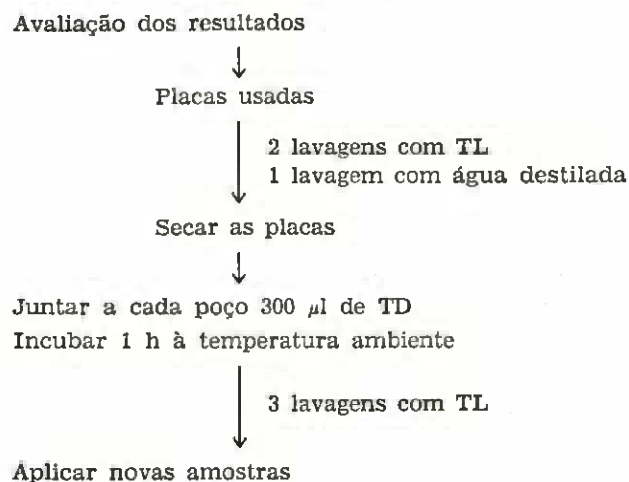


Fig. 2. Reutilização das placas usadas

alguns complexos resistem a este tratamento ácido e que a eficiência de dissociação varia de complexo para complexo. Embora estes autores tenham reutilizado as placas pelo menos cinco vezes, verificou-se que no caso do Vírus CM 112 da Videira, o tratamento ácido vai provocar uma perda gradual da sensibilidade das placas, sendo aconselhável incluir controles infectados para avaliar a variação desta sensibilidade.

Quanto ao conjugado, verificaram ser possível a sua reutilização [3]. O número de utilizações depende do nível do antígeno.

## APLICAÇÕES

Além da utilização em testagens de vírus em larga escala, a técnica ELISA tem sido usada para outros fins como a diferenciação de isolamentos ou de estirpes de vírus [1, 15]. Por ser uma técnica quantitativa, pode ainda ser utilizada para a avaliação da concentração de vírus [7]. Dentro de certos limites, existe uma relação linear entre a quantidade de vírus e os valores do teste ELISA. Para um mesmo vírus e antissoro, essa relação varia com as condições de execução da técnica. É quase impossível um controle rigoroso dessas con-

dições de modo a obter-se uma relação constante e é por isso preferível incluir diluições de vírus purificado em todas as placas e assim estabelecer uma relação linear para cada caso.

No Quadro V encontra-se um exemplo de aplicação dessa relação, determinando-se a concentração do Vírus CM 112 da Videira em cinco videiras infectadas, em várias épocas do ano.

## QUADRO V

*Cálculo da concentração do Vírus CM 112 da Videira em várias videiras (Vitis vinifera L.) em diferentes épocas do ano ( $\mu\text{g}$  de vírus  $\text{g}^{-1}$  de folha)*

Época do ano	Relação entre $A_{405 \text{ nm}}$ e ng de vírus (x)	Videira	$A_{405}$	Vírus (ng)	Diluição da amostra (p/v)	Concentração de vírus ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )
Maio	$A_{405} = 0,0350 + 0,00508x$ $r = 0,999$	1	0,570	105	1:50	5,3
		2	1,116	213	1:50	11
		3	1,580	304	1:50	15
		4	3,605	703	1:50	35
		5	3,367	656	1:50	33
Junho-Julho	$A_{405} = 0,0588 + 0,00719x$ $r = 0,999$	1	0,882	114	1:50	5,7
		2	1,510	202	1:50	10
		3	2,538	345	1:50	17
		4	2,734	372	1:50	19
		5	1,965	265	1:50	13
Agosto	$A_{405} = 0,135 + 0,00860x$ $r = 1,00$	2	7,022	801	1:50	40
		3	5,915	672	1:50	34
		4	3,181	354	1:50	18
		5	3,189	355	1:50	18

## CONCLUSÕES

A técnica ELISA é uma técnica serológica quantitativa e de grande sensibilidade. É de fácil execução, não necessitando de aparelhagem dispendiosa, embora a utilização de aparelhos como Titertek Multiscan da Flow Laboratories aumente a sua rapidez por permitir a leitura simultânea de todos os poços de uma placa de microtitulação e o registo automático dos resultados.

Embora esta técnica esteja a ser amplamente utilizada é necessário adaptá-la a cada conjunto hospedeiro-vírus-antissoro, investigando os vários parâmetros de execução para tirar o maior partido da sua rapidez e sensibilidade.

A maior desvantagem desta técnica — o seu custo — foi superada pela possibilidade de reutilização das placas e conjugados, tornando-a economicamente competitiva com as outras técnicas modernas de serodiagnose.

Uma modificação desta técnica [17], por enquanto ainda usada apenas a título experimental, poderá torná-la ainda mais prática, por não necessitar de um conjugado diferente para cada vírus.

Esta técnica é particularmente indicada para programas de testagem de vírus, podendo vir a ter papel muito importante a desempenhar nos esquemas de certificação de plantas a nível nacional.

#### BIBLIOGRAFIA

- [ 1 ] BAR-JOSEPH, M. e SALOMON, R. — 1980 — Heterologous Reactivity of Tobacco Mosaic Virus Strains in Enzyme-linked Immunosorbent Assays. *Journal of general Virology*, **47**: 509 — 512.
- [ 2 ] BAR-JOSEPH, M., MOSCOVITZ, M. e SHARAFI, Y. — 1979 — Reuse of Coated Enzyme-linked Immunosorbent Assay Plates. *Phytopathology*, **69**: 424 — 426.
- [ 3 ] BAR-JOSEPH, M., SHARAFI, Y. e MOSCOVITZ M. — 1979 — Re-using the Non-sandwiched Antibody-enzyme Conjugates of two Plant Viruses Tested by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Plant Disease Reporter*, **63**: 204 — 206.
- [ 4 ] BAR-JOSEPH, M., GARNSEY, S. M., GONSALVES, D. e PURCIFULL, D. E. — 1980 — Detection of Citrus Tristeza Virus. I. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) and SDS-Immunodiffusion Methods. *Proceedings of the Eighth Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside, California*: 1 — 8.
- [ 5 ] BOVEY, R., BRUGGER, J.-J. e GUGERLI, P. — 1980 — Detection of Fanleaf Virus in Grapevine Tissue Extracts with ELISA and Immune Electron Microscopy. *Report to the 7th. International Council for the Study of Viruses and Virus-diseases of Grapevine, Niagara Falls, Canada*.
- [ 6 ] CLARK, M. F. e ADAMS, A. N. — 1976 — *Laboratory Notes on the ELISA Technique*, East Malling Res. Stn, Maidstone, Kent, 6 pp.

- [7] CLARK, M. F. e ADAMS, A. N.—1977—Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Journal of general Virology*, 34: 475—483.
- [8] CONVERSE, R. H.—1978—Detection of Tomato Ringspot Virus in Red Raspberry by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Plant Disease Reporter*, 62:189—192.
- [9] ENGELBRECHT, D. J.—1980—Indexing Grapevines for the Presence of Grapevine Fanleaf Virus by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Report to the 7 th. International Council for the Study of Viruses and Virus-diseases of Grapevine, Niagara Falls, Canada.*
- [10] FLEGG, C. L. e CLARK, M. F.—1979—The Detection of Apple Chlorotic Leafspot Virus by a Modified Procedure of Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Annals of Applied Biology*, 91: 61—65.
- [11] GERA, A., LOEBENSTEIN, G. e RACCAH, B.—1978—Detection of Cucumber Mosaic Virus in Viruliferous Aphids by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Virology*, 86:542—545.
- [12] KOENIG, R., DALCHOW, J., LESEMANN, D. E. e PREIL, W.—1979—ELISA as a Reliable Tool for the Detection of Chrysanthemum Virus B in Chrysanthemums Throughout the Year. *Plant Disease Report* 63: 301—303.
- [13] KORPRADITSKUL, P., CASPER, R. e LESEMANN, D. E.—1979—Evaluation of Short Reaction Times and some Characteristics of the Enzyme-conjugation in Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Phytopathologische Zeitschrift*, 96: 281—285.
- [14] NACHMIAS, A., BAR-JOSEPH, M., SOLEL, Z. e BARASH, I.—1979—Diagnosis of Mal Sesso Disease in Lemon by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Phytopathology*, 69: 559—561.
- [15] ROCHOW, W. F. e CARMICHAEL, L. E.—1979—Specificity among Barley Yellow Dwarf Viruses in Enzyme Immunosorbent Assays. *Virology*, 95: 415—420.
- [16] SAILLARD, C., GARCIA-JURADO, O., BOVE, J. M., VIGNAULT, J. C., MOUTOUS, G., FOS, A., BONFELS, J., NHAMI, A., VOGEL, R. e VIENNOT-BOURGIN, G.—1980—Application of ELISA to the Detection of *Spiroplasma citri* in Plants and Insects. *Proceedings of the Eighth Conference of the International Organization of Citrus Virologists, Riverside, California*: 145—152.
- [17] TORRANCE, L.—1980—Use of Bovine C<sub>1q</sub> to Detect Plant Viruses in an Enzyme-linked Immunosorbent-type Assay. *Journal of general Virology*, 51: 229—232.

