

# Testes Laboratoriais Aplicados à Imunologia Clínica

Profa Alessandra Barone

Prof. Archangelo P. Fernandes

[www.profbio.com.br](http://www.profbio.com.br)

# Testes Laboratoriais

## Aplicados à Imunologia Clínica

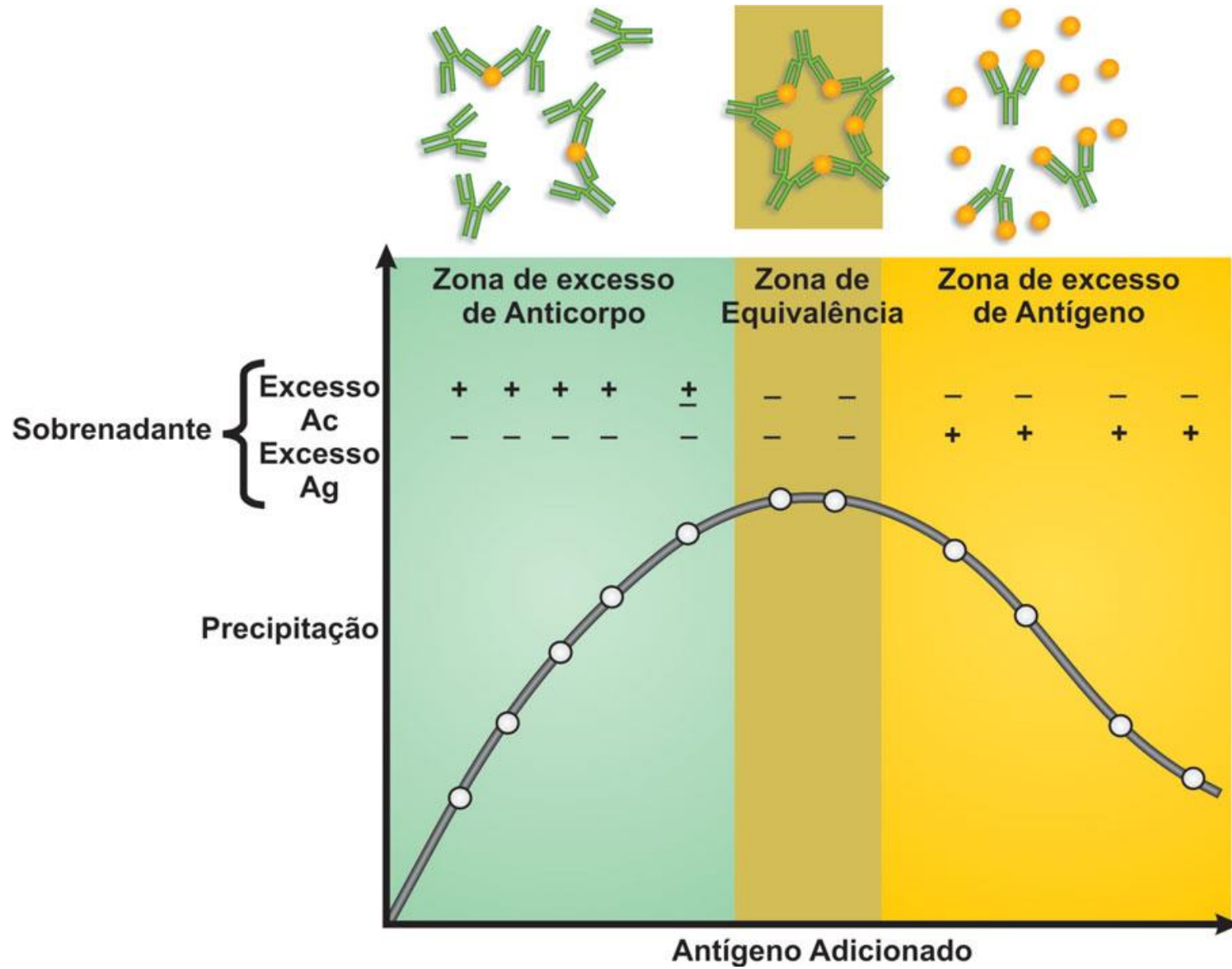
- Os imunoensaios são técnicas para a detecção ou quantificação de antígenos ou anticorpos, podendo utilizar reagentes marcados ou não marcados.
  - Técnicas com reagentes não marcados: aglutinação, precipitação e imuno difusão
  - Técnicas com reagentes marcados: radioativo, enzimático, fluorescente e quimioluminescente

# Testes sorológicos ou imunoenaios

- Precipitação
- Imunodifusão radial simples
- Imunodifusão radial dupla

# Precipitação

- As reações de precipitação envolvem a combinação de antígeno solúvel com anticorpo solúvel para produzir complexos insolúveis que são visíveis.
- Quando as quantidades de antígeno e anticorpo são equivalentes (zona de equivalência) há a **formação máxima de precipitado**, decrescendo à medida em que um dos dois reagentes está em excesso



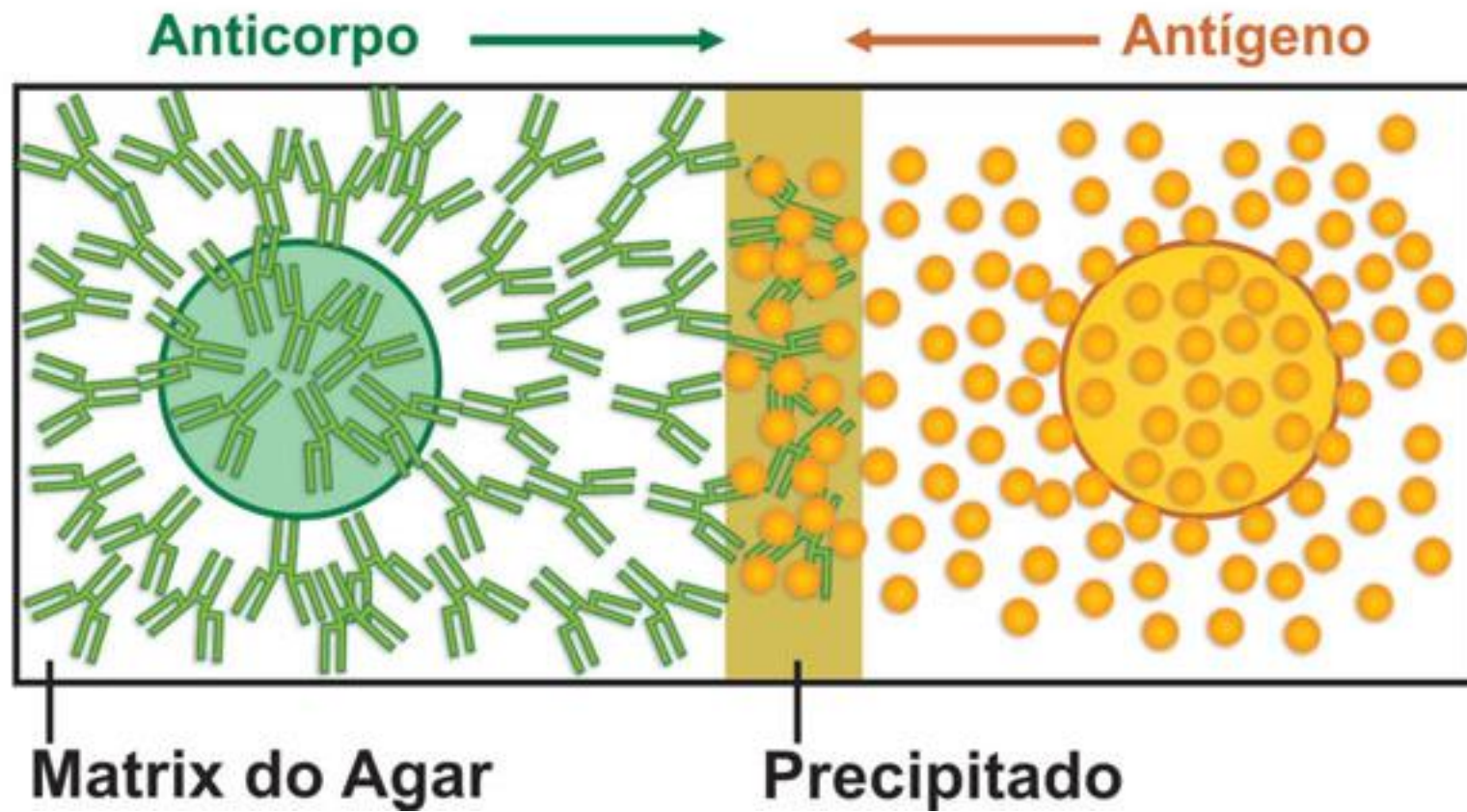


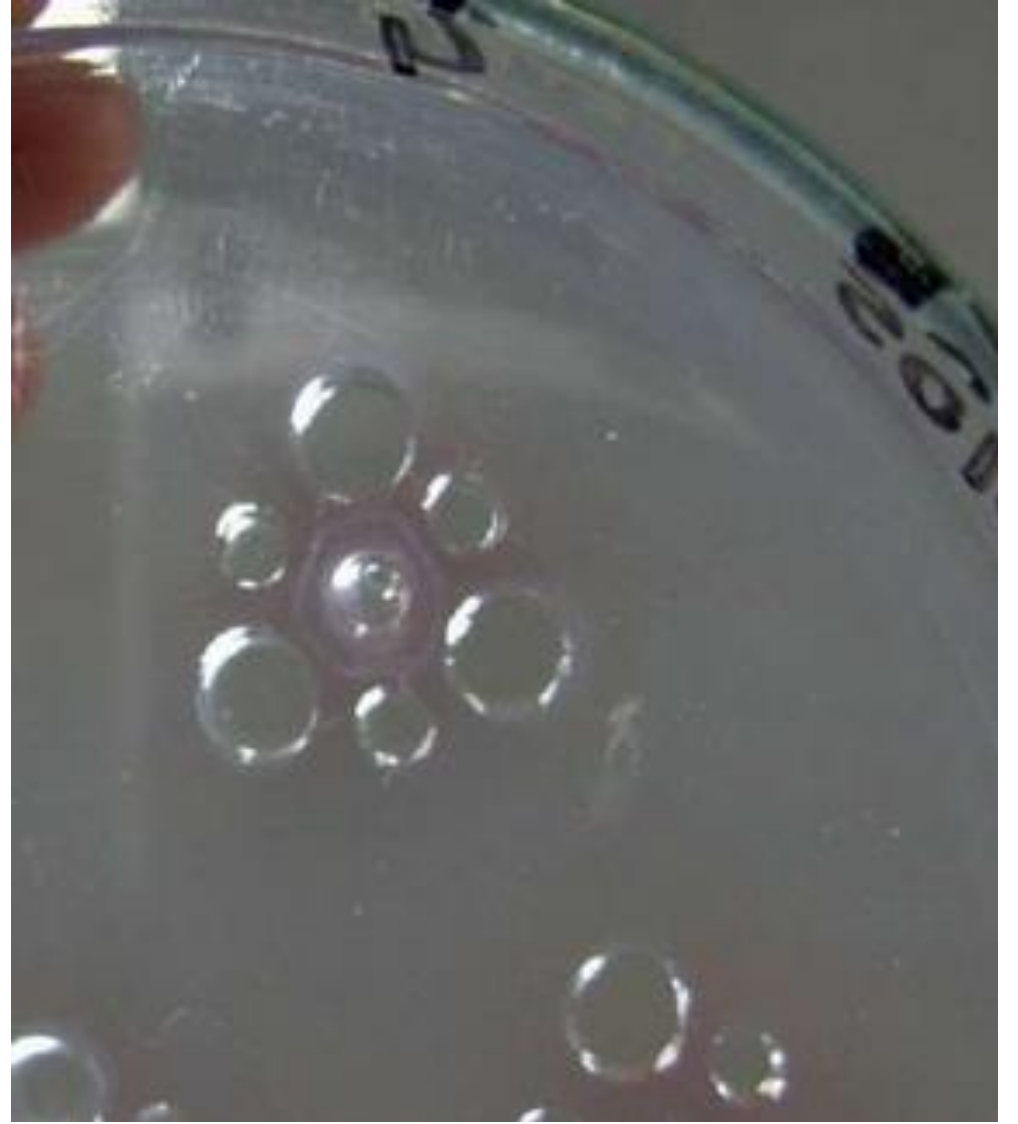
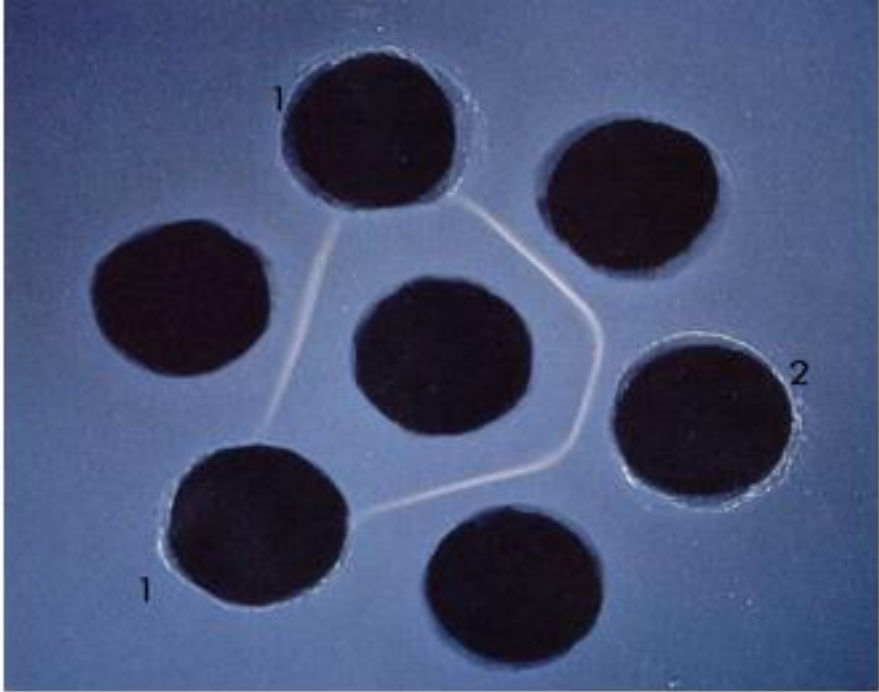
— Prova de precipitação simples demonstrando presença de crioglobulinas no soro à direita, em paciente com infecção pelo vírus da hepatite C.

# Imunodifusão Radial Dupla

- Também chamada de difusão de Ouchterlony,
- Método semi-quantitativo baseado na premissa que quando ambos os reagentes (**um antígeno desconhecido e moléculas de um anticorpo poliespecífico**) são colocados a difundir em um meio suporte, o ponto onde os reagentes se encontram pode ser visualizado como uma linha ou banda de precipitação.

# IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA

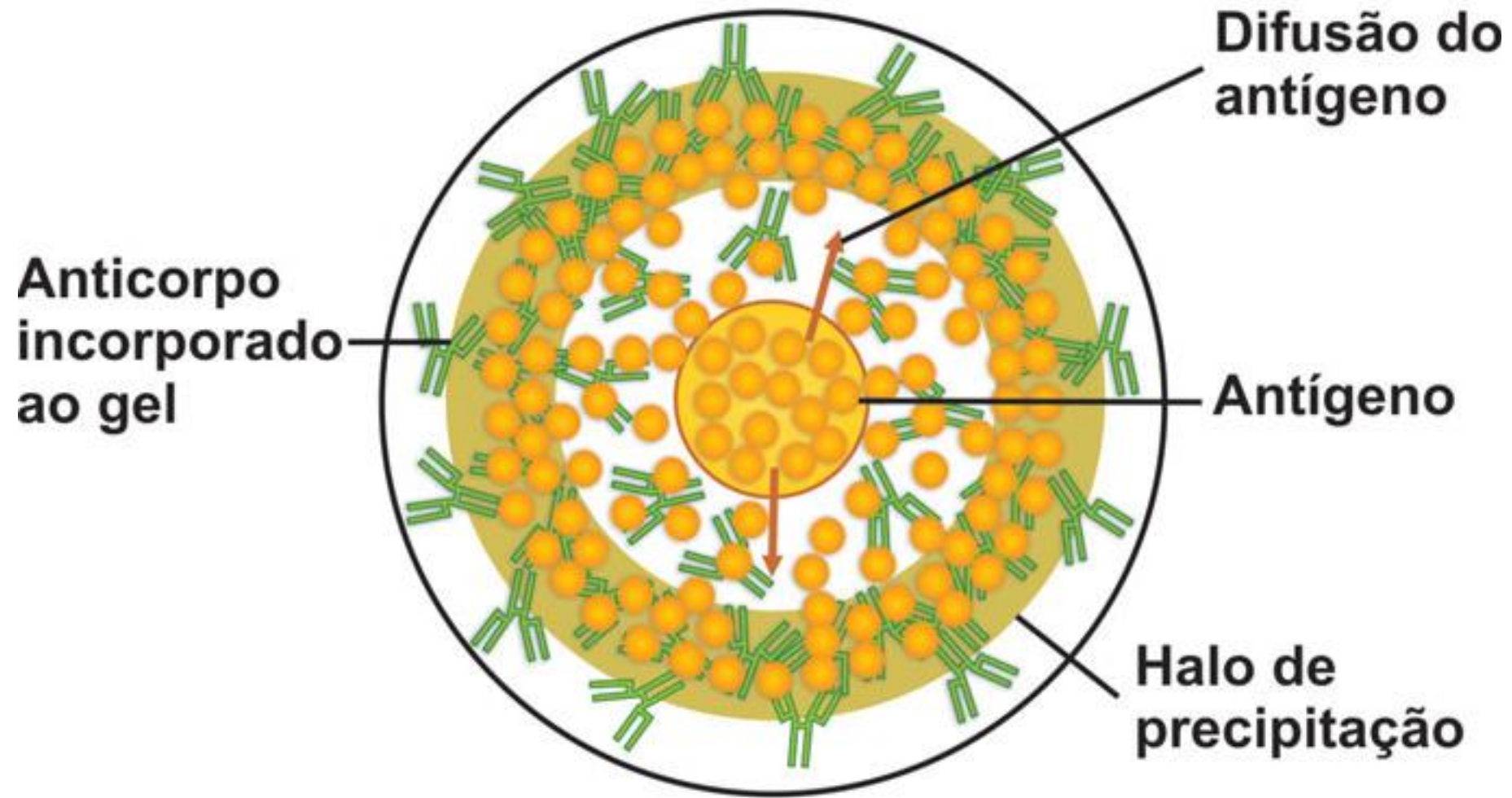




# Imunodifusão Radial Simples

- É a variação quantitativa da imunodifusão radial dupla.
- Nesta técnica o anticorpo é uniformemente distribuído no **gel** e o **antígeno (amostra teste)** é aplicado em um orifício.
- A amostra teste difunde radialmente no gel, formando um halo de precipitação circular em torno do orifício da amostra

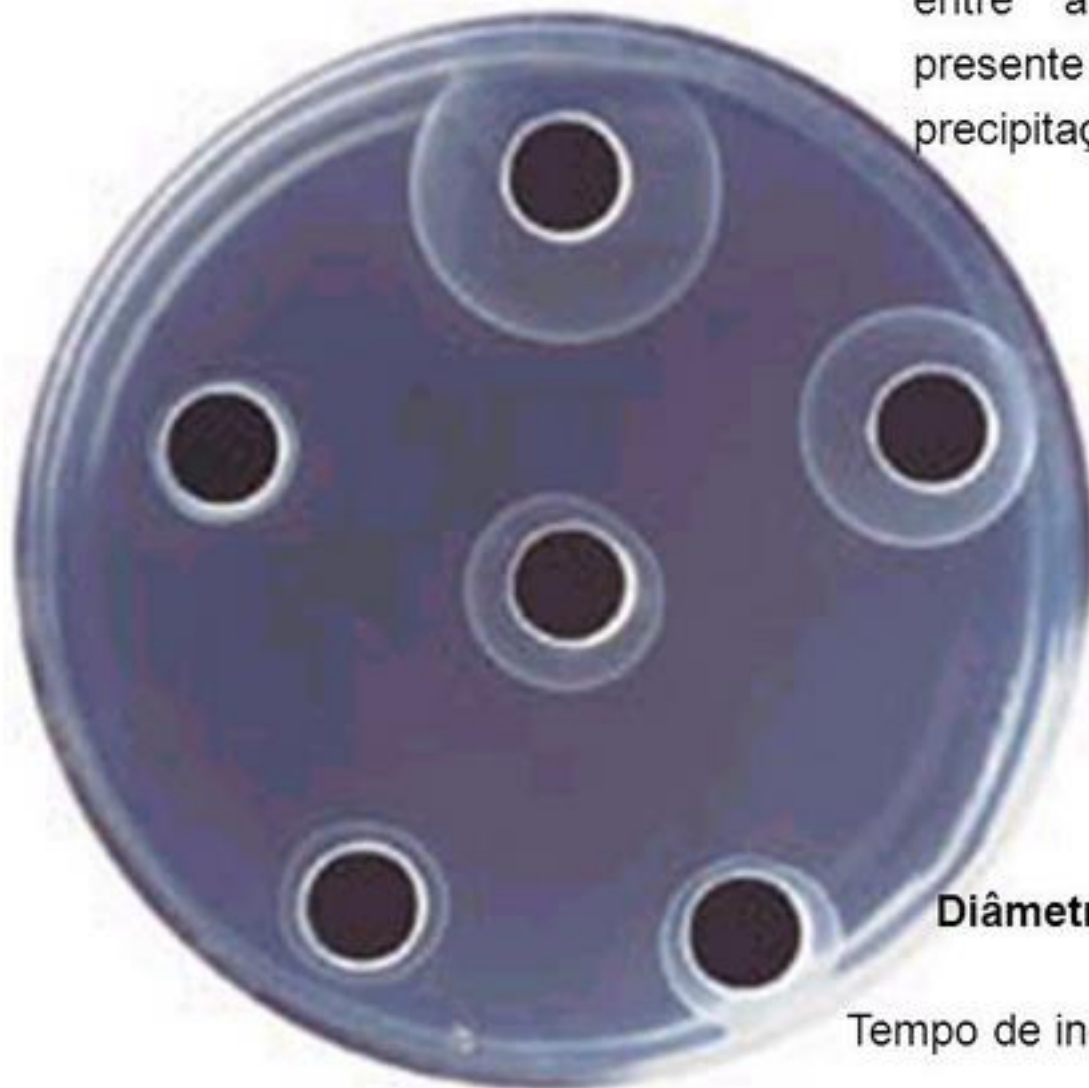
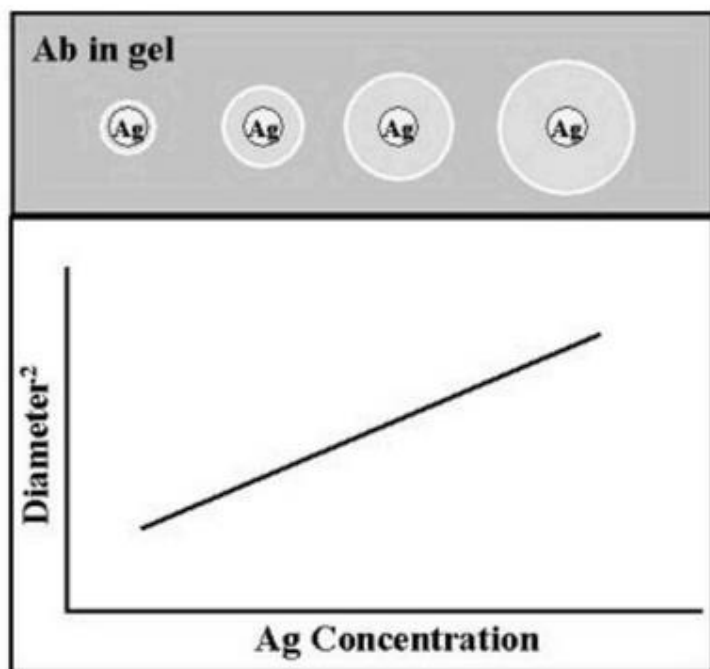
## IMUNODIFUSÃO RADIAL SIMPLES



## Imunodifusão radial simples

**Princípio:** Relação quantitativa entre a quantidade de Ag presente no poço e o anel de precipitação resultante.

### Imunodifusão radial simples



**Diâmetro do halo**

Tempo de incubação: 48 a 72 h

# Imunodifusão Radial Simples

- A difusão depende do **tamanho do orifício**, temperatura, **consistência do gel**, **concentração do anticorpo incluído no gel**, tempo de difusão e outros parâmetros.
- O **diâmetro do halo** de precipitação formado é **proporcional à concentração do analito** pesquisado na amostra.

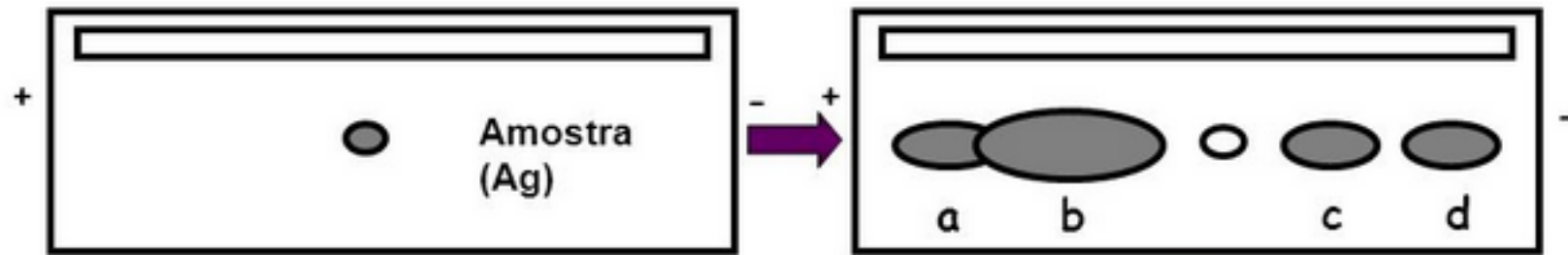
# Imunodifusão Radial Simples

- Esta técnica pode ser utilizada principalmente na quantificação de proteínas como imunoglobulinas, fatores do complemento, proteínas de fase aguda, cadeias leves e proteínas de transporte.

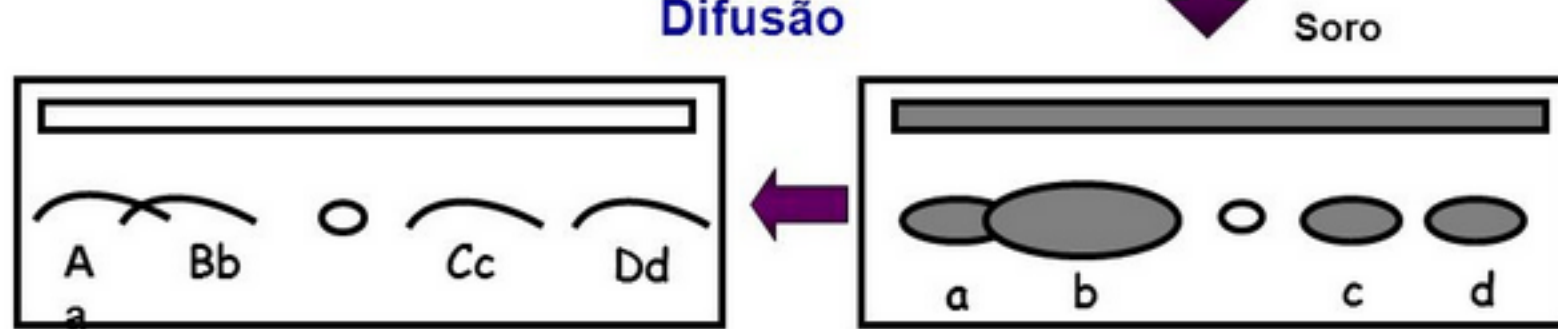
# Testes envolvendo separação eletroforética

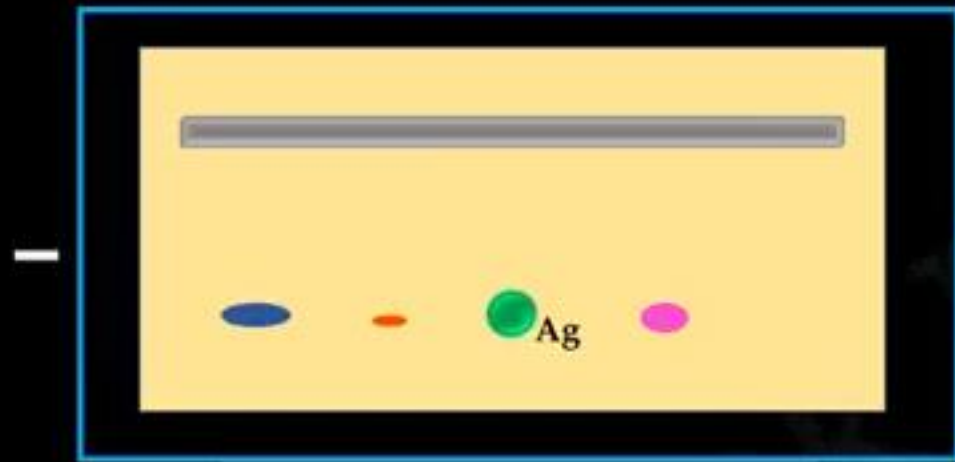
- Imunoeletroforese
  - Combina a **eletroforese em gel**, seguida da **imunodifusão e precipitação das proteínas**.
  - Realizado em duas etapas:
    - Primeira etapa: envolve a separação eletroforética das proteínas
    - Segunda etapa: imunodifusão de cada componente, a partir do seu centro de difusão, contra o anti-soro específico, formando uma linha ou arco de precipitação na região de equivalência.

## Eletroforese



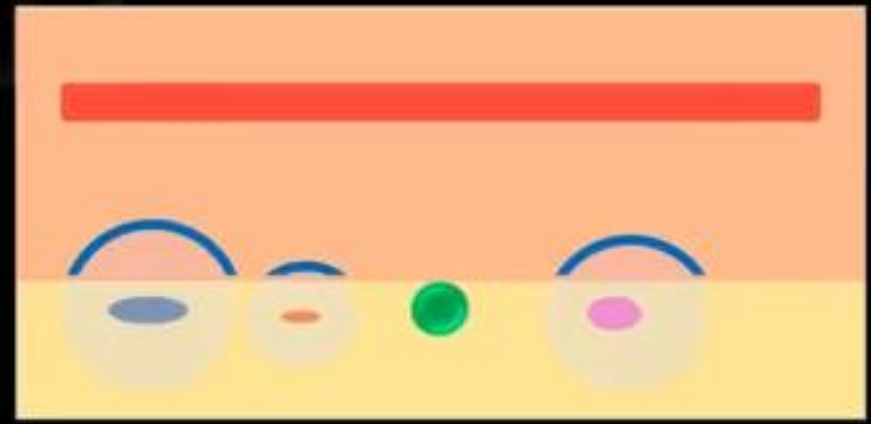
## Difusão





Electrophoresis

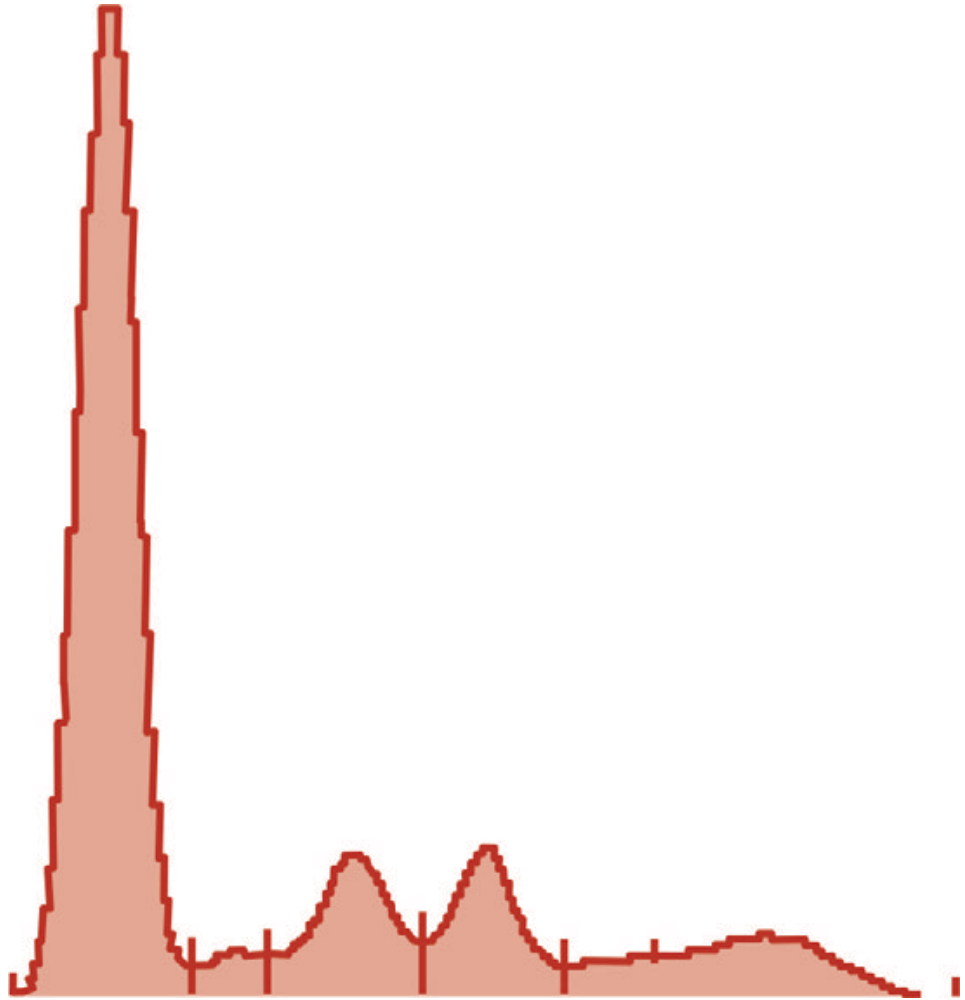
+



Double Immunodiffusion

# Imunofixação

- A imunofixação deve ser realizada quando um pico ou banda é encontrada na eletroforese de proteínas séricas ou quando há suspeita de gamopatia monoclonal.
- A imunofixação combina a eletroforese e a imunoprecipitação.



Eletroforese de proteínas séricas.

Da esquerda para a direita, as frações albumina,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -globulinas.

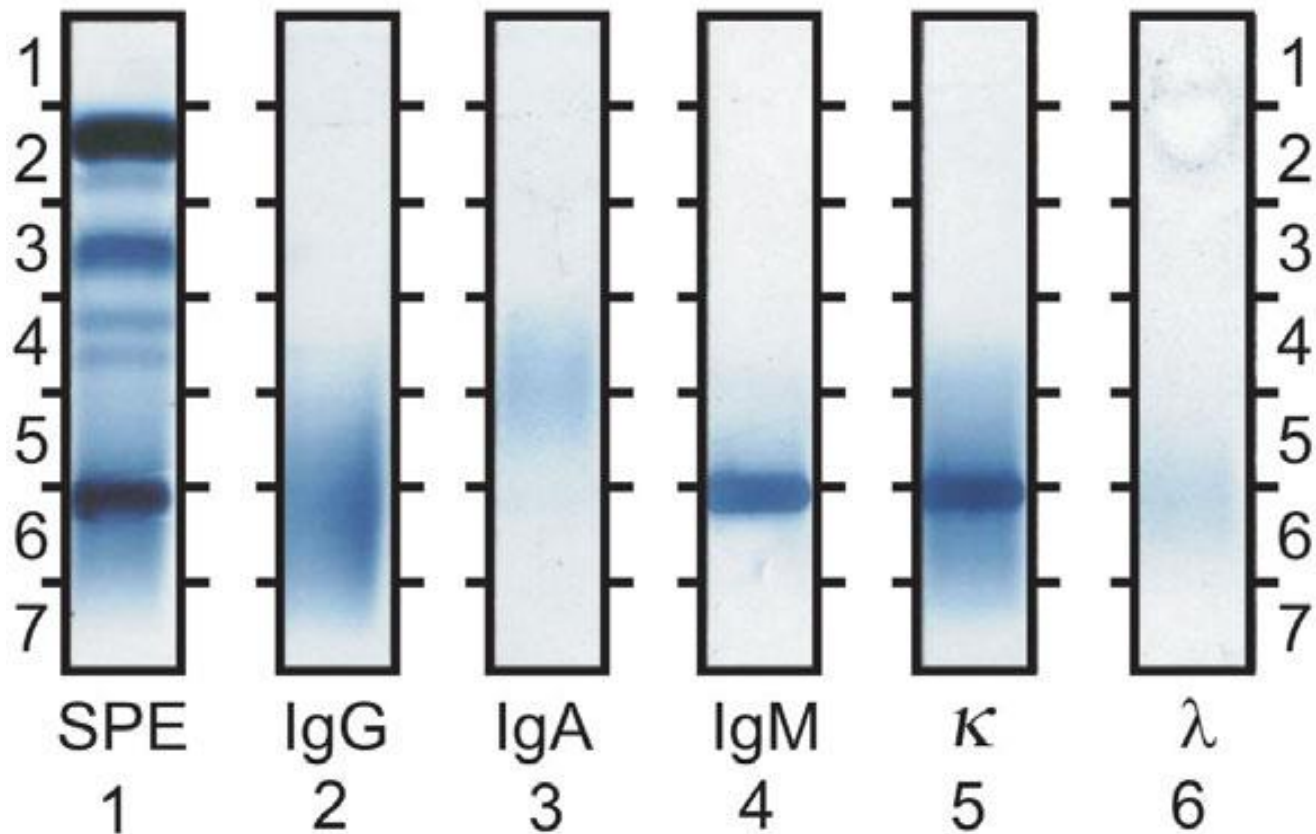
A imunoeletroforese pode ser utilizada para detecção de proteína-M (monoclonal).

.

# Imunofixação

- Procedimento realizado em dois estágios:
  - Primeiro a amostra é aplicada em posições diferentes do gel de agarose e as proteínas são separadas por eletroforese de acordo com a carga.
  - Após, soros monoespecíficos para IgG, IgA, IgM, cadeia *kappa* e cadeia *lambda* impregnados numa fita de papel ou acetato de celulose são colocados individualmente sobre cada posição, seguidos da aplicação de solução fixadora de proteínas.
  - Quando se coloca as fitas de acetato contendo o anticorpo em cima da agarose com o soro, ocorrerá a precipitação in situ. A revelação é feita com corante de prata.

## BECKMAN Paragon<sup>®</sup> IFE Gel



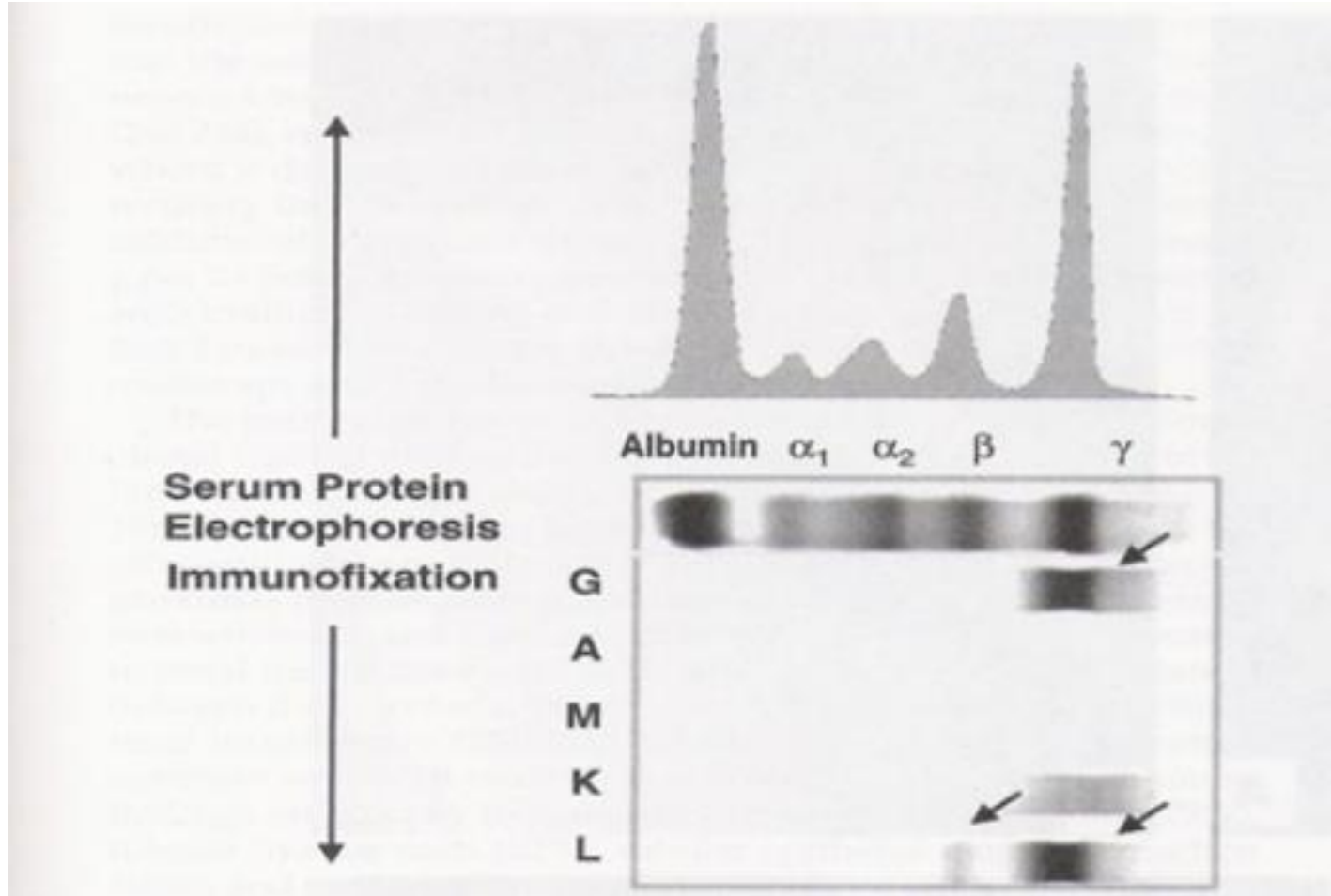
### Eletrforese com imunofixação.

SPE é a eletroforese de referência.

A seguir, cada campo é analisado com o anti-soro respectivo (anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-kappa e anti-lambda).

Notamos neste paciente a presença de proteína M monoclonal em IgM-kappa.

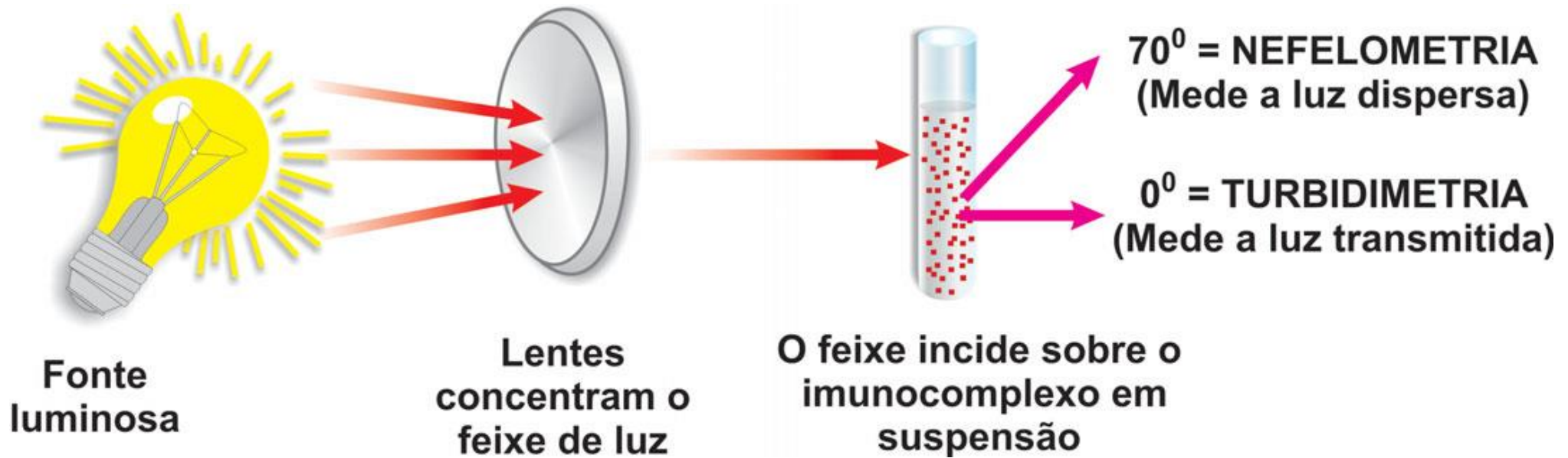
**Teste é utilizado na detecção precoce de gamopatias monoclonais, na intervenção terapêutica em casos novos e na recorrência de mieloma**



Paciente portador de Mieloma múltiplo

# Técnicas com dispersão de luz

- Nefelometria
  - Baseada no princípio de que um imunocomplexo em solução dispersa luz em vários ângulos em relação à luz incidente.
  - Um nefelômetro utiliza uma fonte de luz de alta intensidade que incide em uma cubeta contendo os imunorreagentes.
  - A quantidade e a natureza da dispersão dependem da forma e do tamanho das partículas, da concentração, do comprimento de onda e do índice de refração do meio.



Indicadas para determinações de proteínas específicas como alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína-ácida, alfa-2-antiplasmina, IgG, IgA, IgM, C3, C4, apolipoproteínas, beta-2-microglobulina, anti-estreptolisina O, proteína C reativa ultrasensível e fator reumatóide.

# Reações de aglutinação

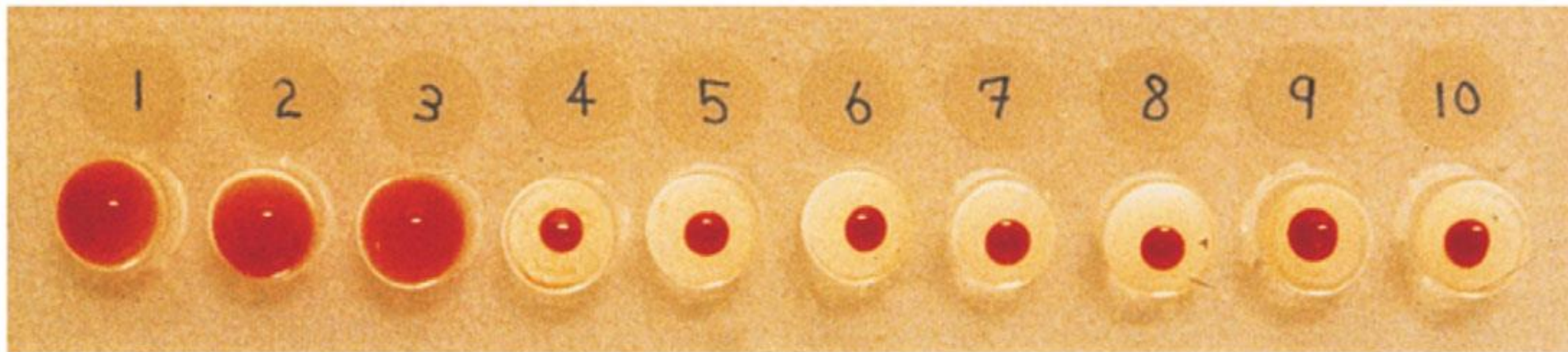
- A ligação cruzada com produção de agregados ocorre quando um anticorpo reage com um antígeno multivalente presente em uma partícula (insolúvel).
- A partícula insolúvel pode ser um antígeno insolúvel nativo, antígenos expressos em células (por exemplo, antígenos eritrocitários) ou partículas cobertas com antígenos (por exemplo, partículas de látex)

# Reações de aglutinação

- Tipos de reação de aglutinação:
  - Aglutinação direta
  - Aglutinação indireta
  - Reação de inibição de aglutinação

# Reações de aglutinação direta

- Nesta reação utilizam-se partículas antigênicas insolúveis em sua forma íntegra ou fragmentada: hemácias, bactérias, fungos e protozoários podem ser aglutinados diretamente por anticorpo.
- São realizadas diluições em série do anticorpo frente a uma quantidade constante do antígeno. Após um período de incubação a aglutinação se completa e o resultado é geralmente expresso como a máxima diluição em que ocorre a aglutinação



Exemplos de reações de aglutinação direta: tipagem de grupos sanguíneos (antígenos específicos), Teste de Widal para salmoneloses, teste de aglutinação para toxoplasmose e tripanossomíase.

# Reação de Aglutinação Passiva ou Indireta

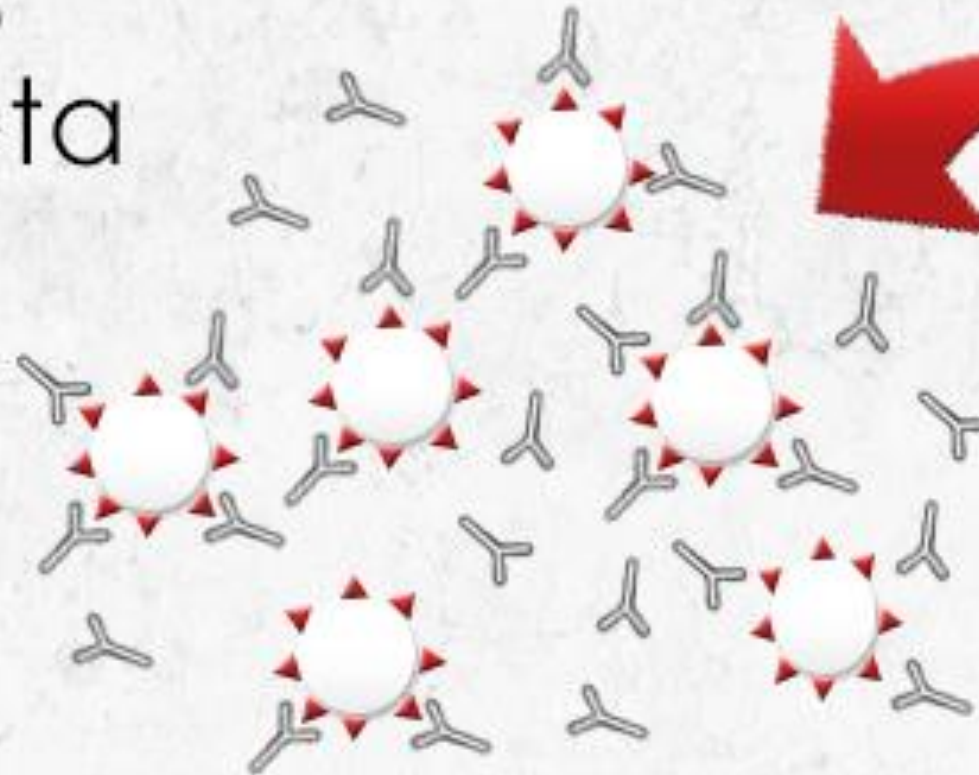
- Nas reações de aglutinação passiva ou indireta, as hemácias e as partículas inertes (bentonita, látex, *sepharose*, leveduras, gelatina) podem ser sensibilizadas por adsorção passiva.
- Devido à grande diversidade de antígenos que podem se ligar às células ou partículas, a aplicação dos testes de aglutinação passiva é muito variada.

# Reação de Aglutinação Passiva ou Indireta

- Aglutinação em látex
  - Partículas de látex são **esferas de poliestireno** utilizadas como suportes na **adsorção de proteína solúvel e antígenos polissacarídicos**, funcionando como sistema indicador da reação antígeno-anticorpo.
  - O teste pode ser empregado na pesquisa de antígenos ou anticorpos. A aplicação mais comum é na detecção de fator reumatóide IgM, dirigido contra isotipos de IgG, IgA1, IgM ou IgE.

# Aglutinação indireta

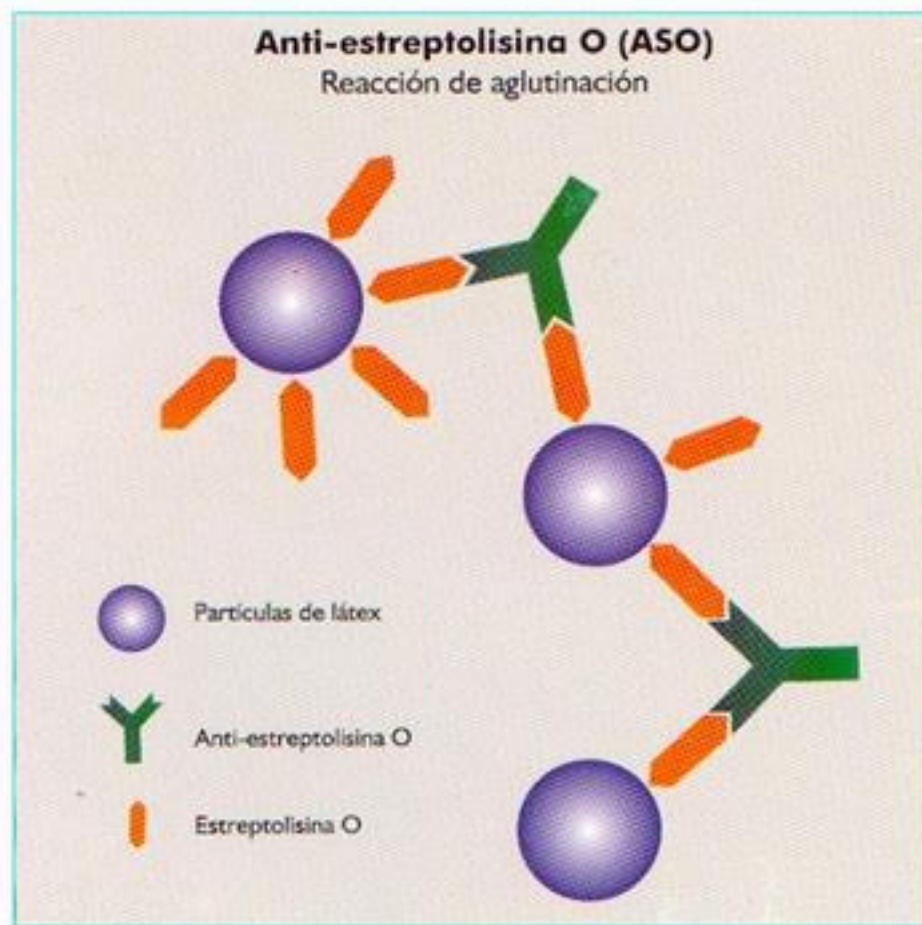
- látex
- ▲ antígeno
- Y anticorpo



soro/  
plasma

Reações macroscópicas visíveis

## AGLUTINAÇÃO INDIRETA OU PASSIVA



# Reação de Aglutinação Passiva ou Indireta

- **Teste de Aglutinação de Cristais de Colesterol**

- O teste do VDRL (*Veneral Disease Research Laboratory*) emprega cristais de colesterol que são sensibilizados com lecitina e cardiolipina para a pesquisa de **anticorpos cardiolipídicos da sífilis** ou na presença de **auto-anticorpos da síndrome anti-fosfolípide** primária ou secundária, neste caso em geral associada ao lúpus eritematoso sistêmico.

# Reação de Aglutinação

- **Reações de inibição da aglutinação**

- São baseadas na **competição entre antígenos particulados e solúveis** por um número limitado de sítios combinatórios em moléculas de anticorpos. A inibição da aglutinação é um indicador de reação positiva.
- Um exemplo de técnica de inibição da aglutinação é a testagem para a presença do hormônio da gonadotrofina coriônica (hCG) como teste de gravidez

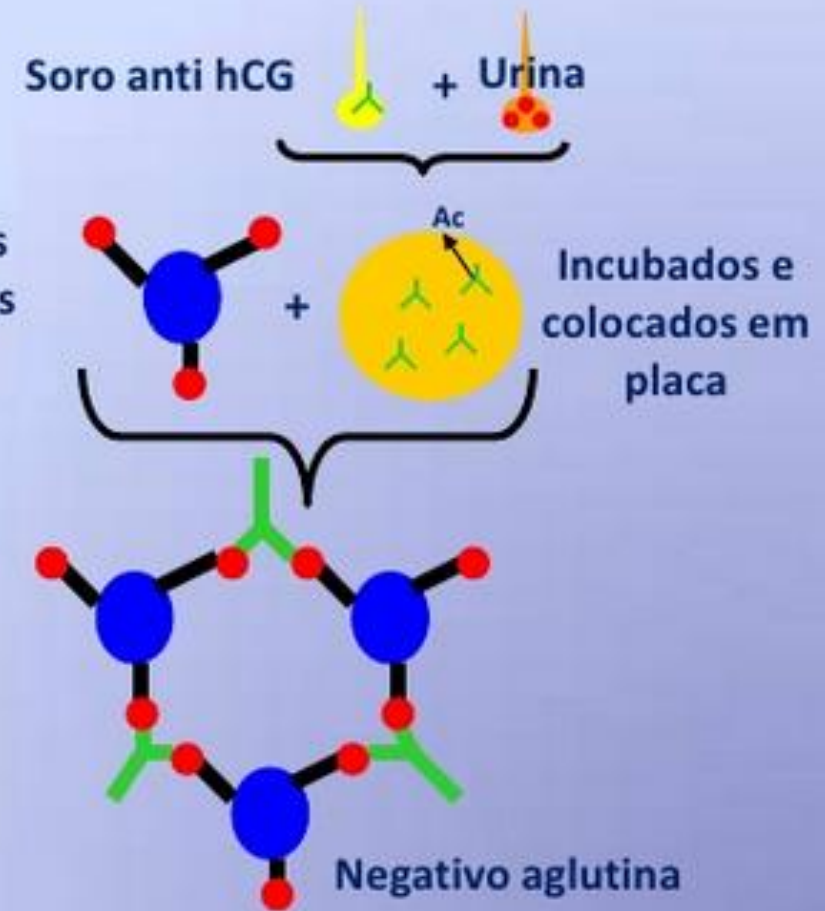
- **Teste de gravidez**

**POSITIVO**



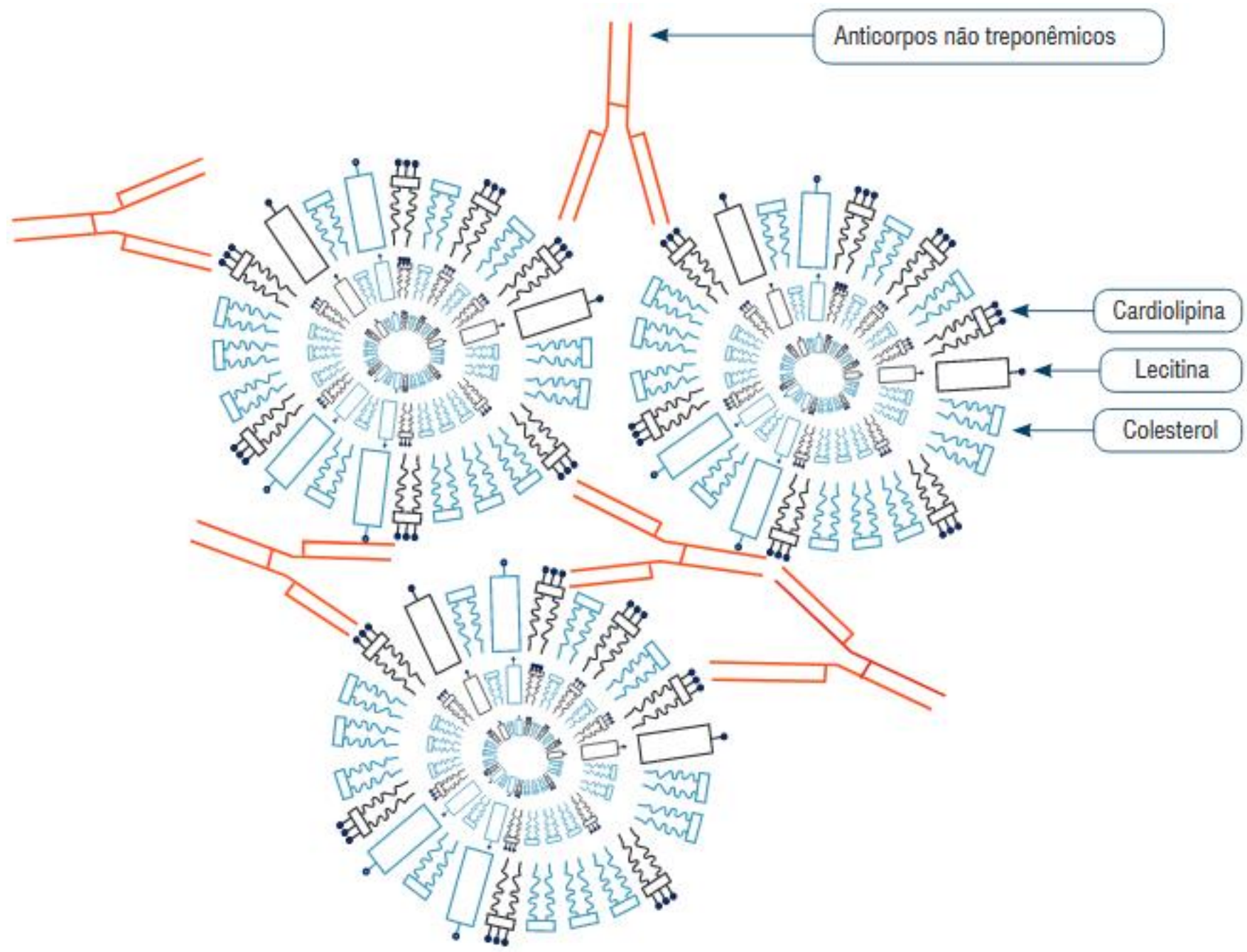
Positivo não aglutina, pois os Ac se ligaram ao hCG da urina na incubação

**NEGATIVO**



# Floculação

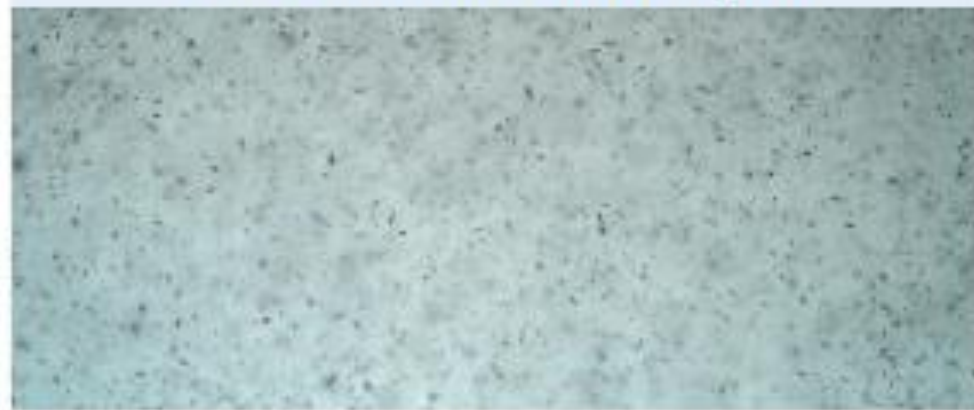
- Os antígenos são adsorvidos em partículas de carbono (micropartículas de carvão ativado)
  - Ex: RPR (Reagina Plasmática Rápida – sífilis)
  - O antígeno é uma suspensão de micropartículas de carbono sensibilizadas com lipídios complexos (**cardiolipina, colesterol e lecitina**) que se aglutinam na presença de reaginas, anticorpos presentes em pacientes com sífilis



**Presença de floculação**



**Ausência de floculação**



Observação de floculação e da ausência de floculação na reação de VDRL.

# Testes fluorescentes

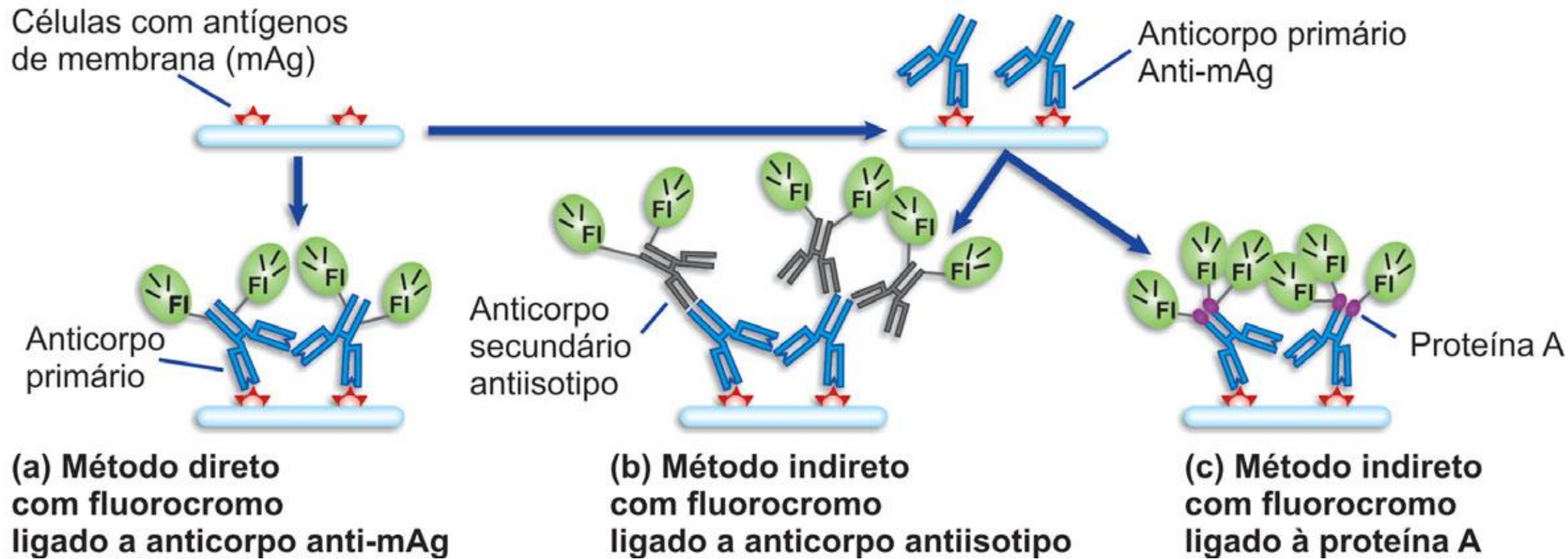
- Reação de Imunofluorescência Direta
  - É a detecção direta de antígenos usando anticorpo antígeno-específico marcado com substância fluorescente
  - Utilizado para detectar antígenos em tecidos biológicos (material de biópsias, vírus, bactérias, células etc.), sendo raramente quantitativo.

# Testes fluorescentes

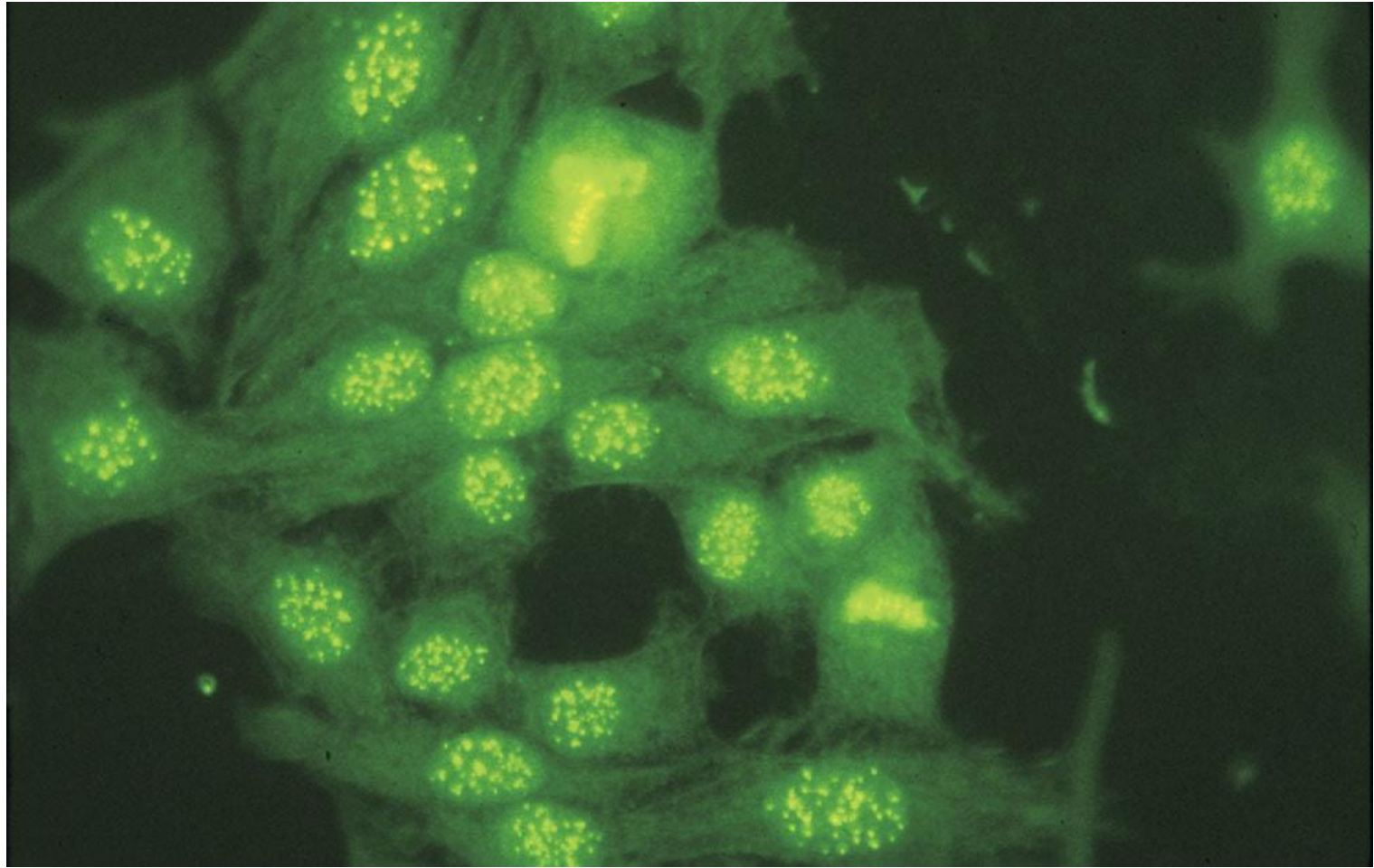
- Reação de Imunofluorescência Indireta
  - O anticorpo presente na amostra do paciente reage com um antígeno específico fixado em uma lâmina de microscopia.
  - Após lavagem, é adicionado um anticorpo anti-humano (conjugado) marcado com substância fluorescente.
  - Após um segundo passo de lavagem, a observação de fluorescência é feita ao microscópio fluorescente em câmara escura

# Testes fluorescentes





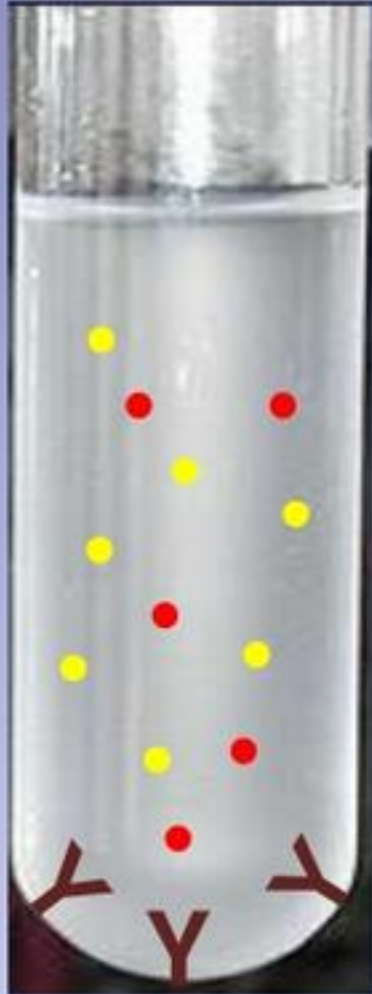
Testes fluorescentes heterogêneos: em (a) imunofluorescência direta (IFD), em (b) imunofluorescência indireta (IFI) com anticorpo antiisotipo e em (c), IFI com proteína A marcada com substância fluorescente.



# ENSAIOS COM MARCADORES RADIOATIVOS

- Radioimunoensaio
  - Utilizam um reagente marcado, antígeno ou anticorpo, para quantificar o antígeno ou o anticorpo da amostra.
  - O composto desconhecido pode ser determinado pela medida da radioatividade emitida.
  - O termo **radioimunoensaio (RIE)** é utilizado usualmente quando o componente marcado é **o antígeno** e **ensaio imunorradiométrico (IRMA)** quando o componente marcado é o **anticorpo**.
  - O radioisótopo mais utilizado é o iodo-125.

# DE COMPETIÇÃO COM Ag MARCADO



- Antígeno marcado
- Antígeno do soro
- Y Anticorpo específico

Inicialmente, uma quantidade conhecida de anticorpos específicos é colocada na fase sólida.

Em seguida, adiciona-se o antígeno marcado com  $^{125}\text{I}$ .

Uma amostra de soro de um paciente suspeito é então acrescentada.

O antígeno, se presente no soro, compete com o antígeno radioativo pelos sítios de ligação nos anticorpos.

A quantificação é feita em aparelho específico para a leitura de radioatividade. A concentração das moléculas antigênicas presentes na amostra é inversamente proporcional à leitura de radioatividade.

# DE COMPETIÇÃO COM Ac MARCADO



- Antígeno marcado
- Antígeno do soro
- Y Anticorpo marcado

Inicialmente, antígenos são fixados na fase sólida.

A seguir, acrescenta-se a amostra do paciente.

Os anticorpos específicos e marcados com o radioisótopo são acrescentados.

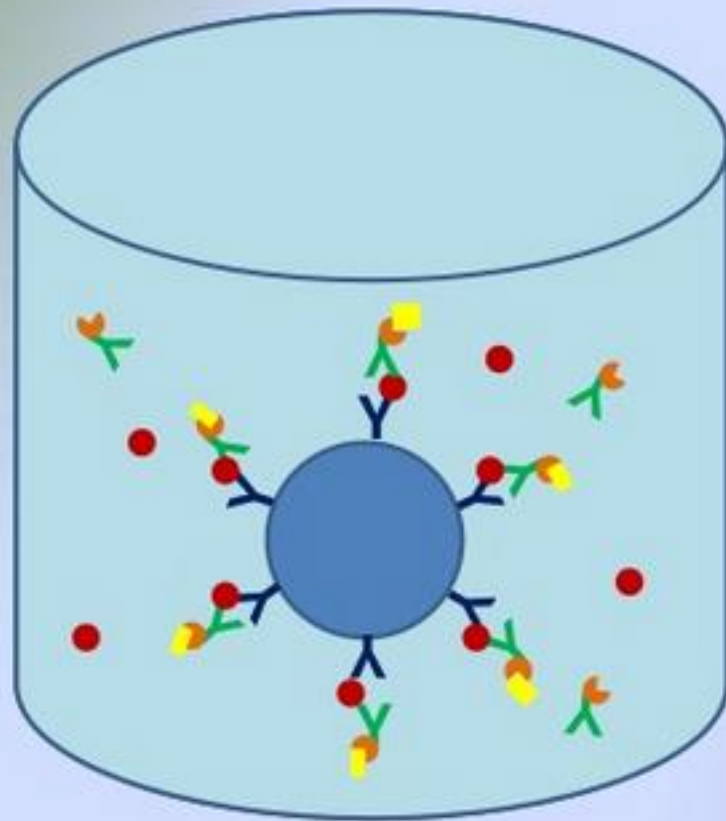
Se a amostra for positiva, haverá a formação do complexo Ag/Ac com o Ag do soro.

Quanto maior a quantidade de antígeno na amostra, maior será a ligação destes aos anticorpos, formando imunocomplexos, que serão retirados por lavagem e assim reduzindo a leitura da radioatividade.

# ENSAIOS LUMINESCENTES

- Quimioluminescência
  - Baseados na **emissão de luz produzida em algumas reações químicas** de oxidação, aqui incluídos agentes quimioluminescentes derivados biologicamente.
  - A emissão de luz pode ser **detectada ou medida utilizando-se luminômetros** com tubos fotomultiplicadores, diodo de silicone em estado sólido ou filme fotográfico como detector
  - As reações mais utilizadas envolvem reações de oxidação do luminol e do isoluminol, ésteres de acridina e decomposição catalisada pela fosfatase alcalina de adamantil 1,2-dioxetano aril-fosfato.

# PASSOS DA TÉCNICA



Conjugado



Antígeno do soro do paciente



Anticorpo monoclonal

Substrato

Uma microesfera de poliestireno é revestida com anticorpo monoclonal contra antígeno analisado

Adição do soro do paciente, que é incubado com agitação intermitente.

Lavagem para retirada do antígeno não fixado

Adição de anticorpo monoclonal específico para o antígeno pesquisado conjugado a enzima.

Incubação do conjugado e mais uma lavagem para tirar o anticorpo não fixado

Adição do substrato da enzima, em seguida, incubação.

A adição de substrato quimioluminescente sofre hidrólise na presença da enzima, produzindo substâncias instáveis que geram emissão de fótons (luz).



Transformam a luz emitida em impulsos elétricos

# ENSAIO COM MARCADORES ENZIMÁTICOS

- Enzima imunoensaio
  - É o termo genérico para um grande número de testes que permitem ensaios quali e quantitativos, para a detecção tanto de antígenos quanto de anticorpos.
  - Estes testes usam o produto da **mudança de cor da interação da enzima com o seu substrato** para medir a reação entre o antígeno e o anticorpo.

# ELISA - “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

- Técnica realizada em múltiplas fases para a quantificação de antígenos ou anticorpos.
- Um dos reagentes é imobilizado na fase sólida, enquanto outro pode ser ligado a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática como da imunológica do anticorpo.
- O teste detecta quantidades extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos
- **Os conjugados enzimáticos devem ser preparados com anticorpos de alta afinidade e muito purificados**

# ELISA - “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

- Os substratos cromogênicos empregados pela degradação enzimática dão origem a produtos solúveis coloridos, cuja determinação é feita medindo-se a densidade ótica da solução por espectrofotometria.
- ELISA direto
- ELISA indireto
- ELISA sanduiche ou captura

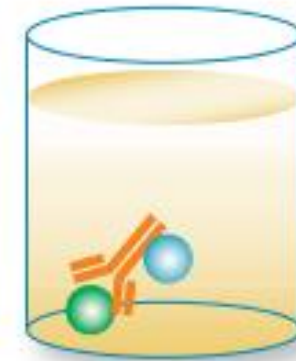
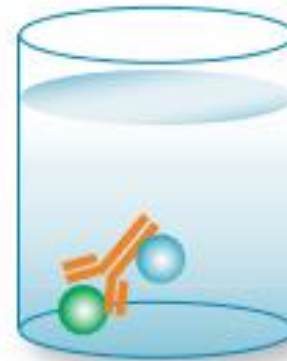
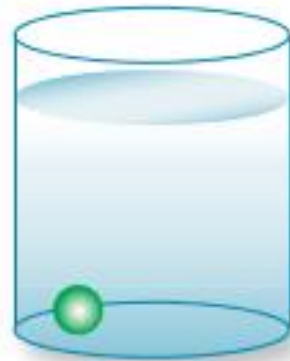
## ELISA Direto

### Medida de antígeno

antígeno é fixado a uma placa sendo adicionado uma proteína bloqueadora (albumina) para fechar todos os outros locais de ligação.

Adiciona-se o anticorpo ligado a enzima.

Ao se adicionar no substrato, a enzima é detectada ilustrando o sinal do antígeno.

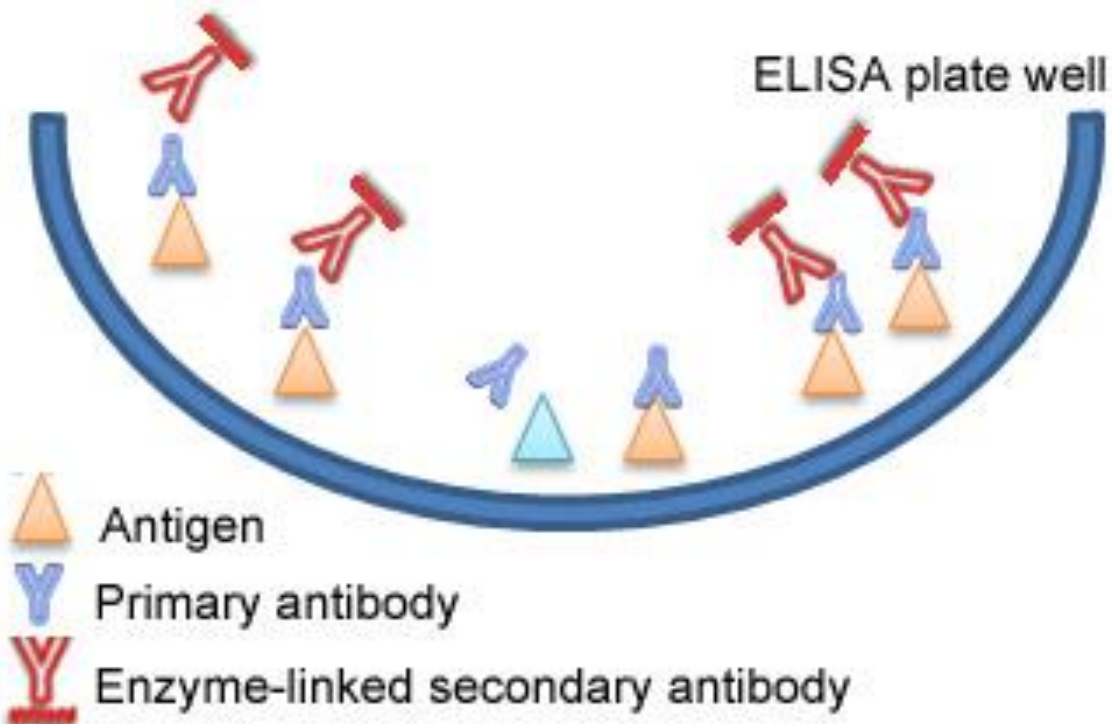


## ELISA Indireto

mede a concentração de anticorpo usando o antígeno ligado à fase sólida, onde o anticorpo da amostra se ligará.

O imunocomplexo será evidenciado pelo antianticorpo marcado com enzima e a subsequente adição do substrato/cromógeno.

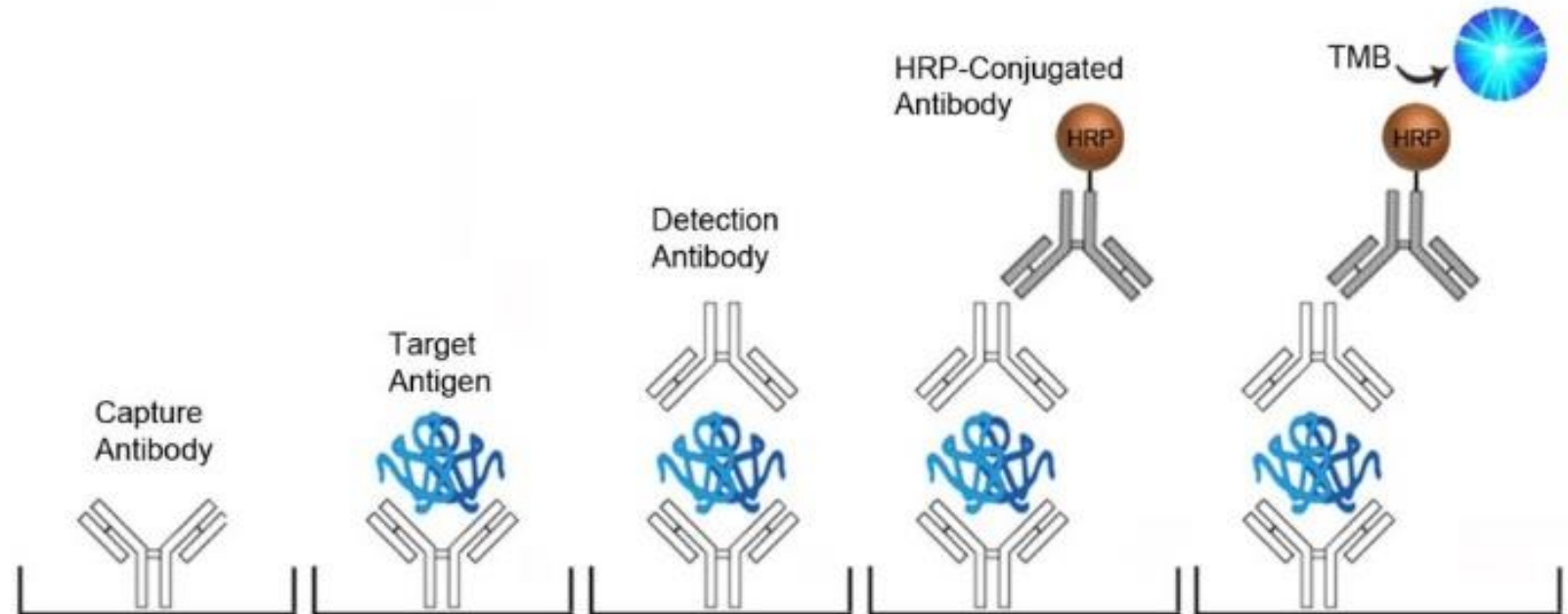
### Indirect ELISA



<https://www.youtube.com/watch?v=dW8XKeLkY3g>

## ELISA sanduiche

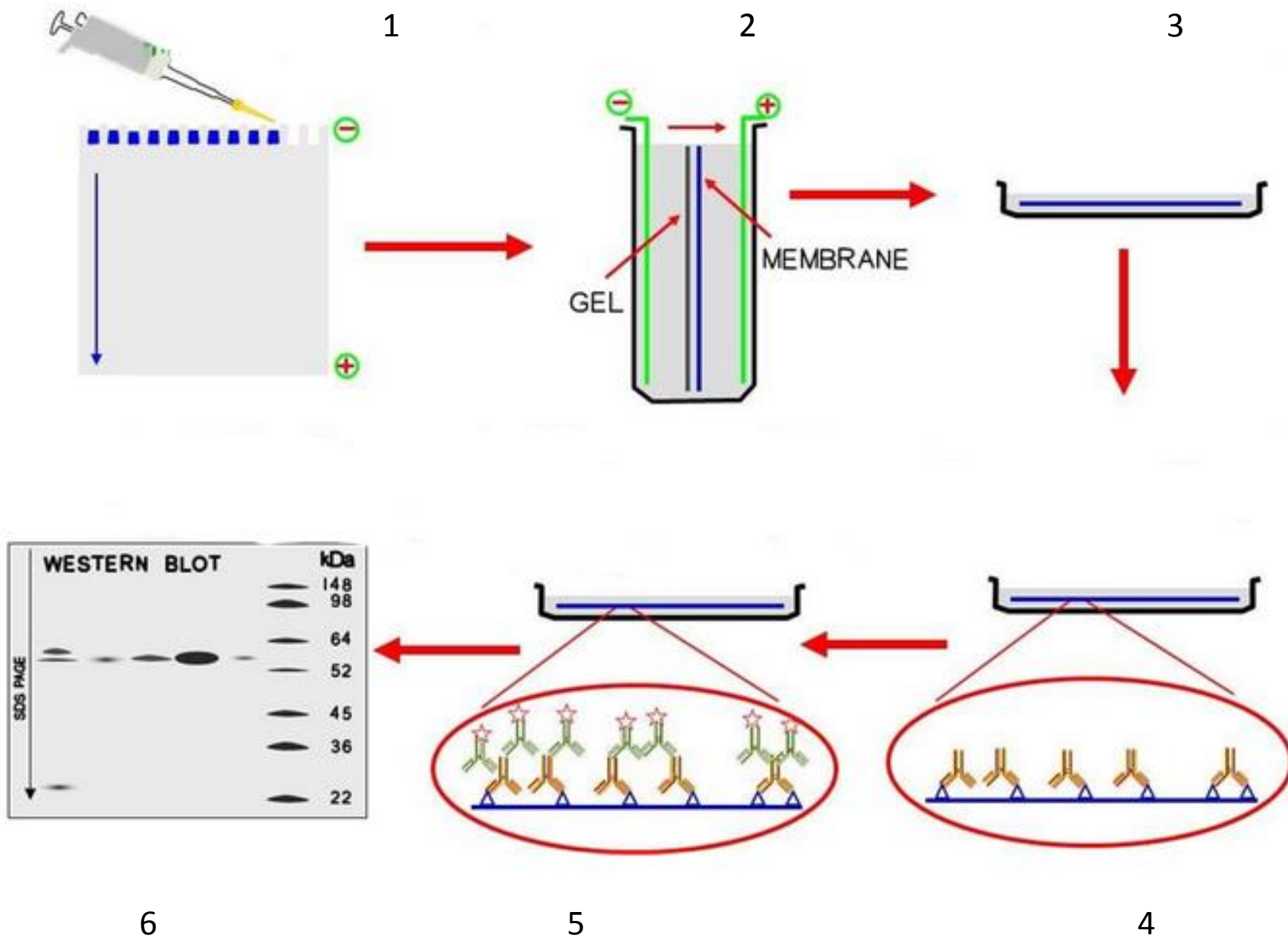
o anticorpo para um antígeno específico, chamado de **anticorpo de captura** é, inicialmente, adsorvido no poço. Depois, a **amostra com o antígeno** é adicionada e se liga a esse anticorpo. A revelação é feita com anticorpo marcado



[https://www.youtube.com/watch?v=\\_8r5XVmKfOc](https://www.youtube.com/watch?v=_8r5XVmKfOc)

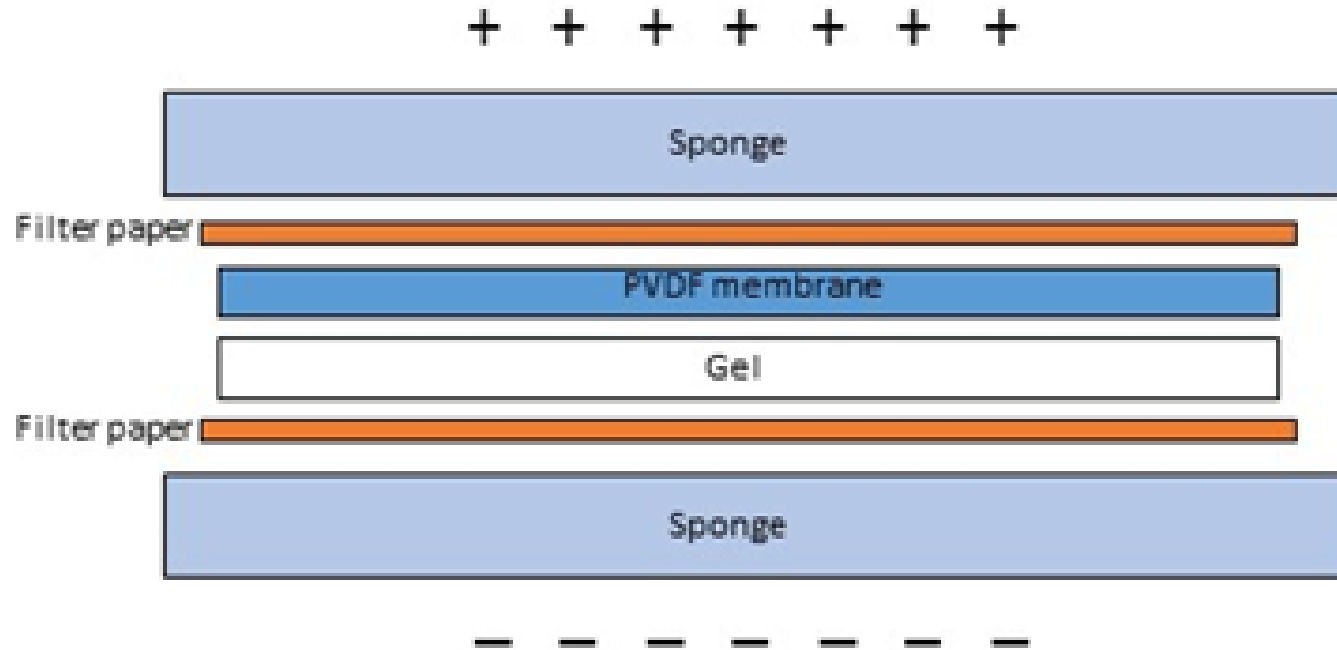
# Western Blotting

- É um procedimento em que as proteínas são separadas pelo tamanho por eletroforese e, após separação, transferidas para uma membrana de nitrocelulose onde ficam imobilizadas.
- Uma vez na membrana, são usados como sonda anticorpos específicos para a proteína alvo.
- O anticorpo adsorvido é detectado com um anti-soro, ou seja, um anticorpo anti-anticorpo específico conjugado a enzima
- A técnica pode ser empregada para a pesquisa de antígenos ou de anticorpos, sendo um importante auxiliar no diagnóstico de doenças infecciosas e auto-imunes



1. Eletroforese
2. Transferência para membrana
3. Bloqueio de membrana com proteínas neutras
4. Adição de anticorpo específico
5. Ligação com anticorpo marcado
6. Revelação

# Método de transferência para membrana



<https://www.youtube.com/watch?v=QYvJTBktn0o>