

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE ENSAIO ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS EM ENFERMIDADES ZOONÓTICAS

Priscila Dalmagro¹
Cleber Ferreira Ramos Rodrigues²
Kéthelin Fagundes Pussi³

Resumo: As zoonoses representam um importante desafio para a saúde pública e a produção animal, exigindo métodos diagnósticos sensíveis, específicos e aplicáveis em larga escala. Nesse contexto, o ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) destaca-se como uma ferramenta amplamente utilizada para detecção de anticorpos em diversas enfermidades infecciosas. O presente estudo tem como objetivo discutir o desenvolvimento e a padronização do teste ELISA voltado à detecção de anticorpos em doenças zoonóticas, abordando desde seus princípios básicos até sua validação e aplicação prática. O ELISA baseia-se na interação antígeno-anticorpo, permitindo a detecção indireta da presença de patógenos por meio da resposta imune do hospedeiro. A escolha adequada de antígenos, especialmente proteínas recombinantes ou de membrana externa, é determinante para o desempenho do teste. Estudos demonstram que a utilização de antígenos específicos pode aumentar significativamente a sensibilidade e a especificidade do ensaio, tornando-o útil como método de triagem em programas de controle sanitário. A padronização do ELISA envolve a definição de condições ideais de concentração de antígenos, diluição de soros e conjugados, bem como parâmetros de leitura, sendo fundamental para garantir reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. A validação do método, por sua vez, é realizada por meio da análise de indicadores como sensibilidade, especificidade e concordância com testes de referência. Estudos indicam sensibilidade de até 100% em determinadas aplicações, embora a especificidade possa variar conforme o antígeno utilizado. Além disso, o ELISA apresenta vantagens como baixo custo relativo, possibilidade de automação e análise de grande número de amostras, sendo amplamente empregado em zoonoses como leptospirose e tuberculose bovina. Contudo, limitações como reações cruzadas e variabilidade na resposta imunológica devem ser consideradas. Dessa forma, o desenvolvimento adequado e a padronização rigorosa do ensaio ELISA são essenciais para sua aplicação eficiente no diagnóstico e controle de doenças zoonóticas.

¹ Doutora em Ciência Animal pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - Araçatuba. (2016)

² Graduação em Medicina Veterinária. Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva, FAIT. (2014)

³ Mestrado em Ensino de Ciências. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS. (2025)

Palavras-chave: ELISA, Imunodiagnóstico, Zoonoses, Anticorpos, Padronização laboratorial, Sensibilidade e especificidade, Proteínas recombinantes, Diagnóstico sorológico.

Abstract: Zoonoses represent a significant challenge for public health and animal production, requiring sensitive, specific, and widely applicable diagnostic methods. In this context, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) stands out as a widely used tool for detecting antibodies in various infectious diseases. This study aims to discuss the development and standardization of the ELISA test for detecting antibodies in zoonotic diseases, addressing its basic principles, validation, and practical application. ELISA is based on antigen-antibody interaction, allowing the indirect detection of pathogens through the host's immune response. The appropriate choice of antigens, especially recombinant or outer membrane proteins, is crucial for the test's performance. Studies demonstrate that the use of specific antigens can significantly increase the sensitivity and specificity of the assay, making it useful as a screening method in sanitary control programs. Standardization of ELISA involves defining ideal conditions for antigen concentration, serum and conjugate dilution, as well as reading parameters, and is fundamental to ensuring reproducibility and reliability of results. Method validation, in turn, is performed through the analysis of indicators such as sensitivity, specificity, and agreement with reference tests. Studies indicate sensitivity of up to 100% in certain applications, although specificity may vary depending on the antigen used. In addition, ELISA has advantages such as relatively low cost, possibility of automation, and analysis of a large number of samples, being widely used in zoonoses such as leptospirosis and bovine tuberculosis. However, limitations such as cross-reactions and variability in the immune response must be considered. Thus, the proper development and rigorous standardization of the ELISA assay are essential for its efficient application in the diagnosis and control of zoonotic diseases.

Keywords: ELISA, Immunodiagnosis, Zoonoses, Antibodies, Laboratory standardization, Sensitivity and specificity, Recombinant proteins, Serological diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

As doenças zoonóticas constituem um dos principais desafios contemporâneos na interface entre saúde animal e saúde pública, sendo responsáveis por impactos significativos tanto econômicos quanto sanitários. Entre essas enfermidades, destacam-se a leptospirose e a tuberculose bovina, ambas de ampla distribuição e com potencial de transmissão ao ser humano. A tuberculose bovina, por exemplo, é causada por *Mycobacterium bovis* e afeta não apenas bovinos, mas também diversas espécies animais e o homem, configurando-se como importante problema de saúde pública.

O diagnóstico precoce dessas enfermidades é essencial para o controle epidemiológico e redução da disseminação dos agentes infecciosos. Tradicionalmente, métodos como testes intradérmicos ou soroaglutinação microscópica são utilizados como padrão diagnóstico. Contudo, tais métodos apresentam limitações, incluindo baixa sensibilidade em fases iniciais da infecção, necessidade de infraestrutura laboratorial específica e risco biológico elevado. No caso

da tuberculose bovina, o teste intradérmico pode falhar na detecção de animais cronicamente infectados, contribuindo para a manutenção da doença nos rebanhos.

Nesse cenário, métodos sorológicos, como o ensaio ELISA, têm ganhado destaque como ferramentas complementares ou alternativas no diagnóstico de zoonoses. O ELISA baseia-se na detecção da resposta imune humoral, especificamente anticorpos produzidos contra antígenos do patógeno, permitindo a identificação indireta da infecção. Esse método apresenta vantagens relevantes, como alta sensibilidade, possibilidade de automação e capacidade de análise simultânea de grande número de amostras.

A aplicação do ELISA no diagnóstico de doenças como a tuberculose bovina e a leptospirose tem demonstrado resultados promissores. No caso da tuberculose, a utilização de proteínas recombinantes como antígenos tem sido amplamente estudada, incluindo proteínas como ESAT-6, MPB70 e MPB83, que estão associadas à resposta imune do hospedeiro. Entretanto, a variabilidade na resposta imunológica e a limitação de antígenos disponíveis ainda representam desafios para a obtenção de testes altamente específicos e sensíveis.

Além disso, a escolha do antígeno é um fator crítico no desenvolvimento do ELISA. Proteínas de membrana externa, por exemplo, têm sido utilizadas com sucesso no diagnóstico da leptospirose, uma vez que apresentam maior conservação entre sorovares e são capazes de induzir resposta imune significativa. Estudos demonstram que a utilização dessas proteínas pode melhorar o desempenho do teste, aumentando sua aplicabilidade como método de triagem.

Outro aspecto fundamental no desenvolvimento do ELISA é a padronização do ensaio. Essa etapa envolve a definição das melhores condições experimentais, incluindo concentração de antígenos, diluição de soros e conjugados, além do estabelecimento do ponto de corte. A padronização adequada garante a reprodutibilidade dos resultados e minimiza variações entre ensaios, sendo essencial para a confiabilidade do diagnóstico.

A validação do teste também é indispensável, sendo realizada por meio da comparação com métodos de referência e análise de parâmetros como sensibilidade e especificidade. Em estudos com leptospirose bovina, por exemplo, o ELISA apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 73%, demonstrando alto potencial como ferramenta de triagem. Já em estudos com tuberculose bovina, a utilização de antígenos quiméricos apresentou melhor desempenho diagnóstico em comparação com antígenos isolados.

Diante disso, o desenvolvimento e a padronização do ensaio ELISA representam etapas fundamentais para sua aplicação eficaz no diagnóstico de enfermidades zoonóticas. Este artigo tem como objetivo discutir os principais aspectos envolvidos nesse processo, incluindo conceitos

básicos de imunodiagnóstico, princípios do ELISA, seleção de antígenos, padronização, validação, aplicações e limitações do método.

2. CONCEITOS BÁSICOS DE IMUNODIAGNÓSTICO

O imunodiagnóstico é um conjunto de técnicas laboratoriais baseadas na detecção de componentes do sistema imune, especialmente antígenos e anticorpos, com o objetivo de identificar a presença de agentes infecciosos ou a resposta imunológica do hospedeiro. Essas metodologias fundamentam-se na alta especificidade da interação antígeno-anticorpo, que permite a identificação indireta ou direta de patógenos em diferentes amostras biológicas, como soro, plasma ou tecidos (TIZARD, 2002).

A resposta imune pode ser dividida em dois grandes eixos: a imunidade inata e a adaptativa. No contexto do imunodiagnóstico, destaca-se a imunidade adaptativa, particularmente a resposta humoral, caracterizada pela produção de anticorpos por linfócitos B. Esses anticorpos reconhecem epítomos específicos presentes nos antígenos, possibilitando sua utilização como marcadores diagnósticos. A detecção de imunoglobulinas, como IgM e IgG, pode indicar diferentes estágios da infecção, sendo a IgM associada à fase aguda e a IgG a infecções passadas ou crônicas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Os testes imunodiagnósticos podem ser classificados em dois principais tipos: diretos e indiretos. Os testes diretos visam detectar o próprio antígeno do agente infeccioso, enquanto os indiretos detectam anticorpos produzidos pelo organismo infectado. O ensaio ELISA, amplamente utilizado, é um exemplo de teste indireto, no qual a presença de anticorpos é inferida por meio de reações enzimáticas que produzem sinais detectáveis, como mudança de cor (MADRUGA et al., 2001).

A eficácia dos métodos imunodiagnósticos depende de fatores como a especificidade do antígeno utilizado, a afinidade dos anticorpos e o momento da coleta da amostra. Em doenças como a tuberculose bovina, a resposta imune pode variar ao longo da infecção, sendo inicialmente predominantemente celular e, posteriormente, humoral. Isso pode influenciar diretamente a sensibilidade dos testes sorológicos, uma vez que a produção de anticorpos está relacionada à carga antigênica e ao estágio da doença.

Além disso, em zoonoses como a leptospirose, diferentes componentes antigênicos, como proteínas de membrana externa, têm sido explorados devido à sua capacidade de induzir resposta imune significativa e mais consistente entre diferentes sorovares. Essa escolha é fundamental para melhorar o desempenho dos testes, reduzindo reações cruzadas e aumentando a acurácia diagnóstica.

Outro aspecto relevante no imunodiagnóstico é a definição de parâmetros de desempenho, como sensibilidade e especificidade. A sensibilidade refere-se à capacidade do teste de identificar corretamente indivíduos infectados, enquanto a especificidade diz respeito à identificação correta de indivíduos não infectados. Esses parâmetros são essenciais para avaliar a confiabilidade do teste e sua aplicabilidade em diferentes contextos epidemiológicos (THRUSFIELD, 2004).

Dessa forma, os conceitos básicos de imunodiagnóstico envolvem a compreensão da resposta imune, da interação antígeno-anticorpo e dos princípios metodológicos dos testes laboratoriais. Esses fundamentos são essenciais para o desenvolvimento de técnicas como o ELISA, amplamente utilizadas no diagnóstico de doenças zoonóticas, contribuindo para o controle e prevenção dessas enfermidades.

3. PRINCÍPIOS DO ENSAIO ELISA

O ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) é uma técnica amplamente utilizada no imunodiagnóstico para detecção de antígenos ou anticorpos em amostras biológicas. Seu princípio fundamental baseia-se na interação específica entre antígeno e anticorpo, associada a uma reação enzimática capaz de gerar um sinal mensurável, geralmente uma mudança de cor proporcional à quantidade do analito presente (TIZARD, 2002).

O ELISA pode ser classificado em diferentes formatos, sendo os mais comuns o ELISA direto, indireto, sanduíche e competitivo. No contexto de doenças zoonóticas, o ELISA indireto é amplamente utilizado para detecção de anticorpos, no qual o antígeno é previamente adsorvido à superfície de placas de poliestireno, permitindo a ligação de anticorpos presentes na amostra do paciente. Posteriormente, um anticorpo secundário conjugado a uma enzima é adicionado, formando um complexo que, ao reagir com um substrato específico, produz um sinal detectável (MADRUGA et al., 2001).

A execução do ensaio envolve etapas sequenciais bem definidas. Inicialmente, ocorre a sensibilização da placa com o antígeno diluído em tampão apropriado, seguida por um bloqueio para evitar ligações inespecíficas. Em seguida, adiciona-se a amostra contendo anticorpos, que se ligam ao antígeno fixado. Após etapas de lavagem para remoção de componentes não ligados, é adicionado o conjugado enzimático, geralmente um anticorpo anti-IgG marcado com enzimas como peroxidase. Por fim, a adição do substrato cromogênico resulta em uma reação enzimática que produz coloração proporcional à quantidade de anticorpos presentes, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro (TIZARD, 2002).

A escolha dos reagentes e das condições experimentais é determinante para o desempenho do teste. A concentração do antígeno, a diluição dos soros e do conjugado, bem como o tempo de incubação e as condições de lavagem, devem ser cuidadosamente padronizados para maximizar a diferença entre amostras positivas e negativas. A padronização adequada permite maior reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

Outro aspecto essencial do ELISA é a definição do ponto de corte (cut-off), que determina a distinção entre resultados positivos e negativos. Esse parâmetro pode ser estabelecido por métodos estatísticos, como a média das amostras negativas acrescida de desvios padrão ou por curvas ROC, garantindo maior precisão diagnóstica (MADRUGA et al., 2001).

O desempenho do ELISA está diretamente relacionado à qualidade dos antígenos utilizados. Em estudos com tuberculose bovina, por exemplo, proteínas recombinantes e antígenos quiméricos têm sido empregados para aumentar a sensibilidade e especificidade do teste, permitindo melhor discriminação entre animais infectados e não infectados.

Dentre as principais vantagens do ELISA destacam-se a alta sensibilidade, a possibilidade de automação, a análise simultânea de grande número de amostras e a segurança biológica, uma vez que não requer o uso de patógenos vivos. Entretanto, limitações como reações cruzadas e variabilidade na resposta imune do hospedeiro devem ser consideradas (THRUSFIELD, 2004).

4. SELEÇÃO DE ANTÍGENOS E ANTICORPOS

A seleção adequada de antígenos e anticorpos é um dos fatores mais críticos para o desenvolvimento de testes imunodiagnósticos, especialmente no ensaio ELISA. A qualidade desses componentes determina diretamente a sensibilidade, especificidade e confiabilidade dos resultados obtidos, sendo essencial considerar características imunológicas, estruturais e epidemiológicas dos agentes infecciosos envolvidos.

Os antígenos utilizados em ensaios ELISA podem ser classificados em diferentes categorias, como antígenos totais, frações purificadas, proteínas recombinantes e antígenos sintéticos. A escolha do tipo de antígeno deve levar em consideração sua capacidade de induzir resposta imune específica e sua representatividade em diferentes fases da infecção. Antígenos altamente conservados e imunogênicos são preferíveis, pois aumentam a probabilidade de reconhecimento pelos anticorpos presentes na amostra (TIZARD, 2002).

No contexto das zoonoses, estudos têm demonstrado que proteínas de membrana externa e proteínas secretadas apresentam elevado potencial diagnóstico, uma vez que estão diretamente

envolvidas na interação com o sistema imunológico do hospedeiro. No caso da leptospirose, por exemplo, as proteínas de membrana externa têm sido amplamente utilizadas por apresentarem maior conservação entre diferentes sorovares e capacidade de estimular resposta imune significativa. Essa característica contribui para aumentar a sensibilidade do teste e reduzir a ocorrência de falsos negativos.

De forma semelhante, na tuberculose bovina, diversos antígenos recombinantes têm sido investigados com o objetivo de melhorar o desempenho do ELISA. Proteínas como ESAT-6, MPB70 e MPB83 são amplamente estudadas devido à sua relevância imunológica. Entretanto, a utilização isolada desses antígenos pode apresentar limitações, especialmente em relação à sensibilidade e especificidade. Nesse sentido, estratégias como o uso de antígenos quiméricos, que combinam epítomos de diferentes proteínas, têm demonstrado melhores resultados diagnósticos.

A cinética da resposta imunológica também deve ser considerada na seleção dos antígenos. Diferentes proteínas são reconhecidas em momentos distintos da infecção, o que pode influenciar a capacidade do teste em detectar a doença em suas diferentes fases. Anticorpos contra determinadas proteínas podem ser detectados precocemente, enquanto outros surgem apenas em estágios mais avançados da infecção, refletindo a carga antigênica e a progressão da doença. Dessa forma, a combinação de múltiplos antígenos pode ampliar a cobertura diagnóstica.

Além da escolha do antígeno, a seleção dos anticorpos utilizados no ensaio também é fundamental. No ELISA indireto, utiliza-se um anticorpo secundário conjugado a uma enzima, geralmente direcionado contra imunoglobulinas da espécie analisada. Esse anticorpo deve apresentar alta afinidade e especificidade, evitando reações cruzadas que possam comprometer a interpretação dos resultados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Outro ponto relevante é a pureza dos antígenos. Impurezas podem levar a ligações inespecíficas, aumentando o ruído de fundo do ensaio e reduzindo sua precisão. Técnicas como cromatografia de afinidade são frequentemente utilizadas para purificação de proteínas recombinantes, garantindo maior qualidade do material utilizado nos testes.

Adicionalmente, a padronização das concentrações de antígenos e anticorpos é essencial para otimizar a relação sinal/ruído do ensaio. Estudos demonstram que a determinação das condições ideais ocorre por meio de testes preliminares com diferentes diluições, buscando maximizar a diferença entre amostras positivas e negativas.

Por fim, deve-se considerar a possibilidade de reações cruzadas, especialmente em ambientes onde múltiplos patógenos circulam simultaneamente. A utilização de antígenos

altamente específicos e a validação rigorosa do teste são estratégias fundamentais para minimizar esse problema e garantir maior acurácia diagnóstica (THRUSFIELD, 2004).

5. ETAPAS DE PADRONIZAÇÃO DO TESTE

A padronização do ensaio ELISA constitui uma etapa fundamental para garantir a reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade do teste, sendo essencial no desenvolvimento de métodos confiáveis para o diagnóstico de enfermidades zoonóticas. Esse processo envolve a definição das condições ideais de reação, incluindo concentração de antígenos, diluição de amostras, conjugados, tampões e parâmetros operacionais.

A primeira etapa da padronização consiste na determinação da concentração ideal do antígeno a ser adsorvido na placa de microtitulação. Essa concentração deve ser suficiente para permitir a ligação eficiente dos anticorpos presentes na amostra, sem causar saturação ou aumento de ligações inespecíficas. Estudos demonstram que a avaliação de diferentes concentrações é essencial para identificar a melhor condição experimental, garantindo maior diferenciação entre amostras positivas e negativas.

Em seguida, realiza-se a padronização das diluições das amostras de soro. A escolha da diluição adequada é importante para evitar tanto falsos positivos, decorrentes de reações inespecíficas, quanto falsos negativos, causados por baixa concentração de anticorpos detectáveis. Normalmente, são testadas diferentes diluições até que se obtenha a maior relação entre sinal e ruído (MADRUGA et al., 2001).

Outro passo relevante é a definição da diluição do conjugado enzimático, geralmente um anticorpo secundário ligado a uma enzima, como a peroxidase. A concentração desse reagente deve ser cuidadosamente ajustada para garantir sensibilidade adequada sem comprometer a especificidade do teste. A escolha incorreta pode resultar em aumento do fundo da reação ou baixa intensidade de sinal (TIZARD, 2002).

Além disso, a padronização envolve a otimização das condições de incubação, incluindo tempo e temperatura. Esses fatores influenciam diretamente a interação antígeno-anticorpo e a eficiência da reação enzimática. Em protocolos experimentais, as incubações são geralmente realizadas a temperaturas controladas, como 37°C, por períodos previamente definidos, visando maior consistência dos resultados.

As etapas de lavagem também são críticas na padronização do ELISA, pois removem componentes não ligados, reduzindo o ruído de fundo e aumentando a precisão do teste. A

utilização de tampões contendo agentes como Tween 20 contribui para minimizar interações inespecíficas, melhorando a qualidade dos resultados (TIZARD, 2002).

Outro aspecto importante é a determinação do ponto de corte (cut-off), que define a distinção entre resultados positivos e negativos. Esse valor pode ser estabelecido com base na média das absorvâncias de amostras negativas acrescida de desvios padrão ou por meio de análises estatísticas mais robustas, como curvas ROC, garantindo maior acurácia diagnóstica (MADRUGA et al., 2001).

6. VALIDAÇÃO (SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE)

A validação de um ensaio imunodiagnóstico, como o ELISA, é uma etapa essencial para assegurar sua confiabilidade e aplicabilidade no diagnóstico de enfermidades zoonóticas. Esse processo consiste na avaliação do desempenho do teste por meio de parâmetros estatísticos, sendo os principais a sensibilidade e a especificidade.

A sensibilidade refere-se à capacidade do teste em identificar corretamente os indivíduos infectados, ou seja, sua habilidade em detectar resultados verdadeiramente positivos. Um teste altamente sensível reduz a ocorrência de falsos negativos, sendo especialmente importante em exames de triagem, nos quais a detecção precoce da doença é fundamental. Em estudos com leptospirose bovina, por exemplo, o ELISA apresentou sensibilidade de 100%, evidenciando sua eficiência na identificação de animais infectados.

Por outro lado, a especificidade está relacionada à capacidade do teste em identificar corretamente indivíduos não infectados, evitando resultados falso-positivos. Testes com alta especificidade são fundamentais para confirmação diagnóstica, reduzindo interpretações equivocadas e intervenções desnecessárias. No entanto, frequentemente observa-se um equilíbrio entre sensibilidade e especificidade, sendo necessário ajustar os parâmetros do teste conforme o objetivo diagnóstico (THRUSFIELD, 2004).

A validação do ELISA geralmente é realizada por comparação com um teste padrão de referência, como a soroaglutinação microscópica (SAM) ou testes intradérmicos. Além disso, utiliza-se o índice de concordância (Kappa) para avaliar a consistência entre os métodos. Valores elevados de Kappa indicam boa concordância e reforçam a confiabilidade do teste validado.

Outro aspecto importante na validação é a definição do ponto de corte (cut-off), que influencia diretamente os valores de sensibilidade e especificidade. Esse parâmetro pode ser determinado por métodos estatísticos, como curvas ROC, permitindo otimizar o desempenho do teste em diferentes contextos epidemiológicos.

7. APLICAÇÃO EM ZONOSSES RELEVANTES

O ensaio ELISA tem sido amplamente aplicado no diagnóstico de diversas zoonoses de importância econômica e sanitária, destacando-se como uma ferramenta eficiente para triagem e monitoramento epidemiológico. Entre as principais enfermidades em que o ELISA é utilizado, destacam-se a leptospirose e a tuberculose bovina, ambas de grande impacto na saúde pública e na produção animal.

Na leptospirose, o ELISA tem sido empregado como alternativa ao teste de soroprecipitação microscópica (SAM), considerado padrão, porém limitado por baixa sensibilidade em fases iniciais da infecção e maior complexidade técnica. O ELISA, por sua vez, apresenta elevada sensibilidade e facilidade de execução, sendo capaz de detectar maior número de animais reagentes, o que o torna útil como teste de triagem em programas de vigilância.

No caso da tuberculose bovina, o ELISA tem sido utilizado como método complementar ao teste intradérmico, permitindo ampliar a detecção de animais infectados, especialmente em fases mais avançadas da doença. A utilização de antígenos recombinantes e quiméricos tem contribuído para melhorar o desempenho do teste, possibilitando melhor discriminação entre animais positivos e negativos.

Além dessas doenças, o ELISA também é aplicado em outras zoonoses, como brucelose e toxoplasmose, devido à sua capacidade de análise em larga escala, baixo custo relativo e segurança biológica. Dessa forma, o ELISA constitui uma ferramenta essencial no controle e prevenção de zoonoses relevantes, contribuindo para a saúde única (One Health).

8. COMPARAÇÃO COM OUTROS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

O ensaio ELISA destaca-se no diagnóstico de zoonoses quando comparado a métodos tradicionais e moleculares, apresentando vantagens operacionais e limitações que devem ser consideradas conforme o contexto clínico e epidemiológico. Entre os métodos mais utilizados para comparação estão os testes sorológicos clássicos, como a soroprecipitação microscópica (SAM), os testes intradérmicos e técnicas moleculares como a PCR.

A soroprecipitação microscópica é considerada padrão para o diagnóstico da leptospirose, porém apresenta limitações importantes, como baixa sensibilidade nas fases iniciais da infecção, necessidade de manutenção de culturas vivas do agente e maior complexidade técnica. Em contraste, o ELISA apresenta maior sensibilidade e facilidade de execução, além de permitir análise simultânea de grande número de amostras, sendo mais adequado para triagem em larga escala.

No diagnóstico da tuberculose bovina, o teste intradérmico é amplamente utilizado como método oficial. Contudo, esse teste depende da resposta imune celular e pode não detectar animais em estágios avançados ou com resposta imune reduzida. O ELISA, por sua vez, detecta a resposta humoral, complementando o diagnóstico ao identificar animais que podem não ser detectados pelos testes intradérmicos.

As técnicas moleculares, como a PCR, apresentam alta sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção direta do material genético do patógeno. Entretanto, essas metodologias possuem custo elevado, exigem infraestrutura laboratorial especializada e são mais indicadas para confirmação diagnóstica do que para triagem em larga escala (THRUSFIELD, 2004).

Além disso, o ELISA apresenta vantagens como baixo custo relativo, segurança biológica por não utilizar agentes vivos e possibilidade de automação, tornando-o altamente reprodutível. Por outro lado, pode apresentar limitações, como reações cruzadas e incapacidade de diferenciar infecções ativas de passadas, uma vez que detecta anticorpos.

9. LIMITAÇÕES E CONTROLE DE QUALIDADE

Apesar das inúmeras vantagens do ensaio ELISA, como alta sensibilidade, praticidade e possibilidade de análise em larga escala, o método apresenta limitações que devem ser consideradas para garantir a confiabilidade dos resultados. Uma das principais limitações está relacionada às reações cruzadas, que podem ocorrer quando anticorpos presentes na amostra reconhecem antígenos semelhantes de diferentes patógenos, gerando resultados falso-positivos (THRUSFIELD, 2004).

Outra limitação importante refere-se à incapacidade do ELISA em diferenciar infecções ativas de infecções passadas, uma vez que detecta anticorpos que podem permanecer circulantes por longos períodos após a exposição ao agente infeccioso. Além disso, a variabilidade na resposta imunológica entre indivíduos pode influenciar a sensibilidade do teste, especialmente em fases iniciais da infecção, quando a produção de anticorpos ainda é baixa.

Diante dessas limitações, o controle de qualidade torna-se essencial na execução do ensaio. Esse controle envolve o uso de amostras padrão positivas e negativas, a padronização rigorosa das condições experimentais e a calibração adequada dos equipamentos. A repetibilidade dos resultados também deve ser monitorada por meio da realização de testes em duplicata ou triplicata.

Além disso, a definição adequada do ponto de corte (cut-off) é fundamental para minimizar erros diagnósticos. Procedimentos estatísticos e validações periódicas garantem maior precisão e confiabilidade do teste.

10. CONCLUSÃO

O desenvolvimento e a padronização do ensaio ELISA para detecção de anticorpos em enfermidades zoonóticas representam avanços significativos no campo do imunodiagnóstico, contribuindo diretamente para o aprimoramento das estratégias de vigilância epidemiológica e controle sanitário. Ao longo deste estudo, evidenciou-se que o ELISA se destaca como uma ferramenta versátil, sensível e aplicável em larga escala, sendo amplamente utilizado no diagnóstico de doenças de relevância tanto para a saúde animal quanto para a saúde pública.

A compreensão dos conceitos básicos de imunodiagnóstico mostrou-se fundamental para o desenvolvimento adequado do ensaio, especialmente no que se refere à interação antígeno-anticorpo e à resposta imunológica do hospedeiro. Esses elementos são determinantes para a escolha dos componentes do teste e para a interpretação correta dos resultados. Nesse contexto, a seleção criteriosa de antígenos e anticorpos revelou-se uma etapa crítica, uma vez que influencia diretamente a sensibilidade e a especificidade do método. O uso de proteínas recombinantes e antígenos quiméricos tem se mostrado promissor, ampliando a capacidade diagnóstica do ELISA ao permitir a detecção de anticorpos em diferentes fases da infecção.

As etapas de padronização do teste demonstraram a importância da definição de condições experimentais ideais, incluindo concentração de antígenos, diluições de soros e conjugados, além de parâmetros de incubação e lavagem. A padronização adequada garante maior reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados, sendo essencial para a aplicação do teste em diferentes contextos laboratoriais. Nesse sentido, estudos evidenciam que a otimização dessas condições permite maximizar a diferença entre amostras positivas e negativas, aumentando a precisão diagnóstica.

A validação do ELISA, baseada em parâmetros como sensibilidade e especificidade, reforça sua eficiência como ferramenta diagnóstica. Resultados encontrados na literatura demonstram alta sensibilidade, podendo alcançar valores próximos a 100%, o que o torna especialmente útil em testes de triagem. Entretanto, a especificidade pode variar conforme o antígeno utilizado, sendo necessário equilíbrio entre esses parâmetros para garantir maior acurácia.

A aplicação do ELISA em zoonoses relevantes, como leptospirose e tuberculose bovina, evidencia sua importância prática, especialmente quando utilizado de forma complementar a métodos tradicionais. Em muitos casos, o ELISA permite identificar um número maior de animais infectados, contribuindo para a tomada de decisões em programas de controle e erradicação dessas doenças. Além disso, quando comparado a outros métodos diagnósticos,

como testes intradérmicos, soroaglutinação microscópica e técnicas moleculares, o ELISA apresenta vantagens operacionais significativas, incluindo menor custo, maior rapidez e possibilidade de automação.

Contudo, o método não está isento de limitações. Problemas como reações cruzadas, dificuldade em diferenciar infecções ativas de passadas e variabilidade na resposta imunológica do hospedeiro podem impactar a interpretação dos resultados. Por isso, o controle de qualidade é indispensável, envolvendo o uso de controles internos, validações periódicas e padronização rigorosa dos procedimentos laboratoriais. A definição adequada do ponto de corte também se mostra essencial para minimizar erros diagnósticos e aumentar a confiabilidade do teste.

Dessa forma, conclui-se que o ensaio ELISA é uma ferramenta fundamental no diagnóstico de zoonoses, especialmente quando desenvolvido e padronizado de maneira rigorosa. Sua aplicação integrada a outros métodos diagnósticos potencializa sua eficácia, contribuindo para estratégias mais eficientes de controle sanitário e promoção da saúde única (One Health). O contínuo aprimoramento das técnicas e a busca por novos antígenos mais específicos tendem a ampliar ainda mais o potencial do ELISA no cenário diagnóstico contemporâneo.

11. REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

AYRES, Manuel et al. **BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007.

BOMFIM, M. R. Q. et al. Avaliação de métodos sorológicos no diagnóstico da leptospirose. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 27, n. 3, p. 145-152, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT)**. Brasília, 2004.

CULLEN, P. A. et al. Lipoproteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 26, p. 1-17, 2002.

FARIAS, T. A. et al. Avaliação de antígenos no diagnóstico da tuberculose bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 5, p. 389-394, 2012.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GUTIÉRREZ, M. et al. Tuberculosis in animals: epidemiology and control. *Veterinary Microbiology*, v. 40, p. 1-16, 1998.

LILENBAUM, W. et al. Tuberculose bovina: aspectos epidemiológicos. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 8, n. 2, p. 67-72, 2001.

MADRUGA, C. R. et al. Desenvolvimento e padronização de testes sorológicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 21, n. 3, p. 123-130, 2001.

MENEGHESI, I. I. F. S. et al. **Avaliação de proteínas recombinantes para detecção de anticorpos contra *Mycobacterium bovis* por ELISA**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2015. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 34).

SOUZA, M. A. et al. Padronização e validação de ELISA indireto para o diagnóstico da leptospirose bovina. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 993-999, 2012.

THRUSFIELD, Michael. **Epidemiologia veterinária**. 3. ed. São Paulo: Roca, 2004.

TIZARD, Ian R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 7. ed. São Paulo: Roca, 2002.

WATERS, W. R. et al. Evaluation of antibody responses in bovine tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 18, p. 1-7, 2011.

WHELAN, A. O. et al. Development of diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 112, p. 1-12, 2006.

ZWEIG, M. H.; CAMPBELL, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool. *Clinical Chemistry*, v. 39, p. 561-577, 1993.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

OIE – WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris: OIE, 2021.

ROMANOS, Michael A.; SCORER, Clare A.; SREEKUMAR, Rajesh. Expression of recombinant proteins in yeast. *Yeast*, v. 8, n. 6, p. 423–488, 1992.

ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 172, 2014.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCOPES, Robert K. **Protein purification: principles and practice**. 3. ed. New York: Springer, 1994.

SILVA, A. S. et al. Rapid diagnostic tests using recombinant proteins. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 31, n. 2, p. 145–152, 2019.

WATSON, James D. et al. **DNA recombinante: genes e genomas**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ZHANG, Y. et al. Advances in biosensors for detection of veterinary pathogens. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 165, p. 112349, 2020.