



Concurso Público Fiocruz 2023

Tecnologista em Saúde Pública

Prova Discursiva

TE09

Imunodiagnóstico

Espelho de Resposta

Pontuação da Questão Discursiva conforme Anexo II do Edital nº 2, de acordo com a Unidade detentora da vaga.

Espera-se que o candidato, no desenvolvimento do tema, tenha feito considerações técnicas adequadas sobre os seguintes pontos:

a) Ensaio imunoenzimático (*ELISA-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) é um dos imunoenaios mais comumente utilizado no diagnóstico laboratorial, baseado em reações colorimétricas e utiliza extrato bruto de parasitas, antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos adsorvidos à superfície de cavidades de microplacas. Esta técnica é amplamente utilizada devido à facilidade de automação e custo relativamente baixo, além de alta sensibilidade e especificidade.

As variações da técnica, apresentadas a seguir, permitem a detecção e a quantificação tanto de antígeno quanto de anticorpo:

- I. ELISA direto- O ELISA direto é a forma mais simples e prática do ELISA e tem como objetivo verificar a presença ou até mesmo a dosagem de anticorpo. O antígeno é fixado a um suporte sólido onde posteriormente é adicionado a amostra do paciente que, possuindo anticorpos específicos, serão fixados sobre os antígenos. Nessa etapa, ocorre o reconhecimento de antígeno-anticorpo. Em seguida, a reação positiva é visualizada com a adição do substrato específico da enzima utilizada, em que ocorre mudança de cor na solução através de catálise enzimática. A intensidade da cor é estimada colorimetricamente e é proporcional a concentração do anticorpo pesquisado.

- II. ELISA indireto – Mais comumente utilizado em diagnóstico, nesta abordagem pesquisam-se anticorpos circulantes, utilizando-se antígenos adsorvidos em fase sólida que podem ser de origem sintética, ou pode-se também utilizar o próprio agente inativado. Após a adsorção na placa, adiciona-se a amostra do paciente que, possuindo anticorpos específicos, serão fixados sobre os antígenos. Enzimas como, por exemplo, a peroxidase e a fosfatase alcalina são conjugadas às anti-imunoglobulinas humanas e em caso de positividade das amostras ocorre uma reação corada ao se adicionar o substrato específico da enzima.
- III. ELISA de competição - As placas são adsorvidas com anticorpos específicos contra o agente em questão. É chamado de teste de competição devido ao fato de o soro testado ser incubado previamente com o antígeno, antes de ser adicionado à placa. Se houver anticorpos no soro, haverá a formação de complexo antígeno-anticorpo. Quando essa mistura for adicionada à placa, o antígeno não vai ligar-se no anticorpo fixado, pois já está ocupado. A lavagem remove a mistura antígeno-anticorpo. Então se adiciona o anticorpo secundário marcado com a enzima, lava-se e adiciona-se o substrato. Quando houver anticorpos na amostra, não haverá mudança de coloração do substrato (resultado positivo). Se não houver anticorpos na amostra o antígeno vai ficar livre e irá ligar-se no anticorpo que está fixado na placa, não sendo removido pela lavagem. Então, o anticorpo secundário marcado com a peroxidase vai ligar-se no anticorpo primário. A lavagem não removerá o anticorpo marcado e a adição do substrato será seguida de mudança de coloração (reação negativa).
- IV. ELISA do tipo sanduíche - Consiste na fixação de um anticorpo específico contra o agente em questão, na placa de poliestireno. Adiciona-se posteriormente a amostra suspeita, seguida de incubação e lavagem. O anticorpo específico (pode ser o mesmo que foi adsorvido na placa) conjugado com a enzima é acrescentado. Finalmente adiciona-se o substrato que dará coloração ao sobrenadante. A quantidade do substrato que foi modificada pela ação da enzima é proporcional à quantidade de antígeno presente.

b) Os ensaios baseados em quimiluminescência (CLIA) combinam uma reação imunológica a um sistema quimiluminescente para determinar a concentração de analitos por sondas que geram luz por meio de uma reação química e foram desenvolvidos para ampliar a sensibilidade da detecção colorimétrica convencional. A técnica, que representa uma ferramenta versátil e ultrasensível com uma ampla gama de aplicações em biotecnologia, é comumente usada com base em atividade enzimática ou nanopartículas. Tradicionalmente, os substratos mais populares são luminol, isoluminol e seus derivados, éster de acridínio e derivados, peroxidase e fosfatase alcalina (ALP). A CLIA convencional é limitada quando se trata de sinais fracos e tempo de luminescência curto. Para amplificar estes sinais foram adicionados intensificadores ao sistema, que desempenham um papel mediador na reação, aumentando a ativação eletrônica, e elevando a sensibilidade analítica. Tanto mecanismos de CLIA aprimorados quanto a aplicação de intensificadores químicos vêm sendo descritas. Nos últimos anos, ensaios CLIA tornaram-se muito populares em química clínica e análise ambiental. Isso ocorreu devido à sua ampla faixa dinâmica, automação completa e às combinações com novos materiais, nanopartículas e instrumentos para detecção automatizada e integrada. Como marcadores, as nanopartículas apresentam muitas vantagens, entre elas a facilidade com que diversas nanoestruturas com propriedades únicas em dimensões nanométricas podem ser preparadas. Além disso, pode-se acrescentar o fato de serem mais adequadas para conjugação com sistemas biológicos, por apresentarem boa biocompatibilidade e serem semelhantes a muitas macromoléculas em tamanho. Um exemplo emblemático do reconhecimento do alto grau de sensibilidade dos ensaios CLIA reside em sua aplicação na triagem sorológica das bolsas de sangue doado no Brasil, ou seja, como ferramenta laboratorial para garantir a segurança transfusional em relação às doenças transmitidas pelo sangue e seus componentes ou derivados.

c) Ensaio de eletroquimioluminescência: A eletroquimioluminescência é um processo no qual a aplicação de uma corrente elétrica induz uma emissão quimioluminescente a partir dos complexos imunológicos (antígeno-anticorpo ou anticorpo-antígeno), contendo espécies químicas altamente reativas presentes em um eletrodo. Essas espécies reagem entre si, produzindo luz. A vantagem do emprego de uma corrente elétrica para o início da reação é que se pode controlar precisamente

toda a reação. A vantagem desse processo consiste na simplicidade de preparação, na alta estabilidade dos reagentes e em uma grande sensibilidade.

d) Microarranjos Líquidos

A metodologia de microarranjos líquidos, ou ensaios múltiplos baseados em microesferas (do inglês, *multiplex bead-based array*) foi originada a partir da associação da citometria de fluxo ao uso de microesferas como substrato imobilizado para acoplamento de antígenos e anticorpos. Ela tem se mostrado uma ferramenta útil na triagem de insumos para uso diagnóstico e no desenvolvimento de ensaios para mensuração de múltiplos biomarcadores

Nas variadas plataformas disponíveis, diferentes populações de microesferas são formadas a partir de processos de pigmentação interna com quantidades específicas de dois ou mais fluorocromos, que criam padrões excitatórios similares, mas perfis de emissão sutilmente diferentes e únicos. As microesferas, com superfície modificada de forma a permitir a ligação de peptídeos, proteínas e ácidos nucleicos, e que podem ser magnetizadas ou não, são sensibilizadas com moléculas de captura e mantidas em suspensão para propiciar a ligação com o alvo. Após exposição a uma solução com a molécula marcada, o material é aspirado para dentro de um sistema de leitura, que ocorre a excitação. Então, excitação é identificada por um gerador de imagens após exposição a dois feixes de laser, um para diferenciação da população de microesferas e, conseqüentemente, do alvo, e outro para detecção da formação do complexo imune por meio da ligação entre molécula de captura – alvo - molécula de detecção marcada.

Os tipos de ensaios possíveis remetem aos princípios do ELISA, ou seja, podem ser via captura sanduíche, competitiva ou indireta. O arranjo baseado em microesferas é utilizado para o diagnóstico ou triagem de biomarcadores em amostras clínicas, permitindo detectar, quantificar e caracterizar uma gama de alvos de interesse relevantes para doenças infecciosas em imunoensaios, genotipagem, bem como nas atividades de pesquisa e otimização do diagnóstico laboratorial. Com as vantagens relacionadas aos períodos reduzidos de incubação, volume reduzido de amostra, aumento de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade em relação aos testes tradicionais, realizados em plataformas bidimensionais.

Variações da tecnologia podem ser exemplificadas com o uso de micro/nanopartículas cujas populações distintas são formadas a partir de processos de marcações químicas ou físicas que, alternativamente, permitem a identificação e/ou quantificação simultânea de diferentes alvos a partir de sistemas de detecção bastante sensíveis, geralmente baseados em fluorescência.

Um microarranjo proteico para detecção de NS1 (YFV) foi desenvolvido para identificação e diferenciação de flavivírus (infecção x vacinação) com sucesso. Esta tecnologia também vem sendo aplicada à determinação da expressão de antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), ou Antígenos Leucocitários Humanos (HLA), essenciais na avaliação da equivalência entre células, tecidos e órgãos. Estes testes para determinação da presença e diferenciação de anticorpos HLA é parte essencial da avaliação de compatibilidade entre doador e receptor e tornou-se padrão internacional para a realização de transplantes.