

NOÇÕES DE SOROLOGIA APLICADAS À FITOVIROLOGIA

ÁLVARO M. R. ALMEIDA

Documentos, 87 - ISSN 0101-5494



EMBRAPA
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA - CNPSo





REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

presidente

FERNANDO HENRIQUE CARDOSO

ministro da agricultura, do abastecimento e da reforma agrária

JOSÉ EDUARDO DE ANDRADE VIEIRA

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

presidente

ALBERTO DUQUE PORTUGAL

diretores

ELZA ANGELA BATTAGGIA BRITO DA CUNHA

JOSÉ ROBERTO RODRIGUES PERES

DANTE D. SCOLARI

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA

chefe

JOSÉ FRANCISCO FERRAZ DE TOLEDO

chefe adjunto técnico

PAULO ROBERTO GALERANI

chefe adjunto de apoio

LUIZ CÉSAR AUVRAY GUEDES

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à

ÁREA DE DIFUSÃO DE TECNOLOGIA DO CNPSO

Caixa Postal 231 - CEP 86001-970

Fone: (043) 320-4166 - Fax: (043) 320-4186

Londrina, PR

As informações contidas neste documento somente poderão ser reproduzidas com a autorização expressa da Área de Difusão de Tecnologia do CNPSO.

IMPRESSO NO SETOR DE SERVIÇOS GRÁFICOS DO CNPSO

Documentos, 87

ISSN 0101-5494

NOÇÕES DE SOROLOGIA APLICADAS À FITOVIROLOGIA

ÁLVARO M. R. ALMEIDA



EMBRAPA

Centro Nacional de Pesquisa de Soja - CNPSO

Londrina, PR

comitê de publicações

CARLOS CAIO MACHADO
ÁLVARO M. RODRIGUES ALMEIDA
BEATRIZ S. CORRÊA-FERREIRA
IVAN CARLOS CORSO
JOSÉ RENATO B. FARIAS
NORMAN NEUMAIER

setor de serviços gráficos

HÉLVIO BORINI ZEMUNER supervisão gráfica
SANDRA REGINA composição
DANILO ESTEVÃO arte-final
HÉLVIO B. ZEMUNER fotomecânica
AMAURI P. FARIAS impressão e acabamento

ilustração da capa

DANILO ESTEVÃO

capa

SSG

tiragem

300 EXEMPLARES

ALMEIDA, A.M.R. **Noções de sorologia aplicadas à fitovirologia.** Londrina :
EMBRAPA-CNPSO, 1995. 105 p. (EMBRAPA-CNPSO. Documentos, 87).

1. Sorologia. 2. Imunoeletroforese. 3. ELISA. 4. Imunofluorescência. 5.
Métodos. I. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Spja (Londrina, PR). II.
Título. III. Série.

CDD 574. 295

© EMBRAPA-1995
Conforme Lei 5.988 de 14.12.73

apresentação

As doenças causadas por vírus têm provocado redução da produtividade das lavouras de soja e, conseqüentemente, perdas econômicas importantes. Não raro, o diagnóstico das doenças viróticas exige o uso de técnicas especiais devido às próprias características desses patógenos.

A sorologia é uma dessas técnicas que vem sendo usada, há vários anos, com sucesso por ser sensível, prática e rápida. Entretanto, ainda faltam conhecimentos básicos, os quais são necessários para avaliar seus resultados e obter conclusões precisas.

Procurando minimizar esse problema, o Centro Nacional de Pesquisa de Soja tem contribuído, através de publicações e treinamentos a pesquisadores, técnicos agrícolas, laboratoristas e estudantes universitários, de graduação e pós-graduação nesta área e diversas outras áreas do conhecimento.

Este documento, que resume informações úteis sobre as técnicas sorológicas tradicionais e avançadas, estendendo-se por detalhes afetos a outras áreas de pesquisa, dentro da fitopatologia, procura facilitar a tarefa do CNPSO. Diversos exemplos nele incluídos são resultados de pesquisa própria, mas também são citadas várias obras da literatura.

Deste modo, associada à preocupação de gerar tecnologia à agricultura brasileira, o CNPSO compromete-se, também, com a difusão de conhecimentos da pesquisa básica.

José Francisco Ferraz de Toledo
Chefe do CNPSO

1. INTRODUÇÃO	07
2. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS	08
3. ANTICORPOS	11
4. DETERMINANTES ANTIGÊNICOS	16
5. PRODUÇÃO DE ANTISSOROS	17
5.1. Imunização	19
6. MÉTODOS SOROLÓGICOS	24
6.1. Microprecipitina	26
6.2. Difusão dupla em ágar	28
6.3. Imunoelektroforese	34
6.4. Imunofluorescência	41
7. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE VÍRUS PELO TESTE DE ELISA	45
7.1. Descrição do teste de ELISA	46
7.2. Variações descritas do teste de ELISA	48
7.3. Teste de ELISA utilizando o sistema biotina-avidina	57
7.4. Dot-ELISA	59
7.5. Utilização do teste de ELISA na detecção de fitopatógenos	63
7.6. Determinação da concentração ideal dos reagentes	64
8. PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA	69
8.1. Purificação com sulfato de amônia	69
8.2. Purificação adicional por cromatografia de coluna de troca iônica	70
9. PREPARO DO CONJUGADO	71
9.1. Conjugado IgG - fosfatase alcalina	71
9.2. Conjugado IgG - peroxidase	71
10. PREPARAÇÃO DE F(ab') ₂	72
11. SOLUÇÕES TAMPONANTES UTILIZADAS NO TESTE DE ELISA	73

12. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DE ELISA	74
13. ANTICORPOS MONOCLONAIS	77
13.1. Produção de anticorpos monoclonais	79
14. OUTROS USOS DAS TÉCNICAS SOROLÓGICAS	83
14.1. Detecção de teores de hormônios em plantas	83
14.2. Técnicas imunocitológicas	84
15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

ANEXOS

Anexo I - Produção de massa micelial, imunização e produção de antissoro contra fungos	93
Anexo II - Purificação de antígenos por eletroforese	94
Anexo III - Produção de células bacterianas, imunização e produção de antissoro	96
Anexo IV - Determinação do teor de proteína pelo método de Bradford	98
Anexo V - Modelo de ficha para controle de imunização de animais	100
Anexo VI - Modelo de caixa para o manuseio de coelhos durante o processo de sangria	101
Anexo VII - Modelo de ficha para anotação de resultados obtidos com teste de microprecipitina	102
Anexo VIII - Modelo de caixa com luz difusa para avaliação de linhas de precipitação em testes sorológicos de dupla difusão em gel	103
Anexo IX - Lista de representantes de equipamentos e reagentes utilizados em sorologia	104
Anexo X - Modelo de ficha para anotação de valores de absorbância detectados em microplaca de ELISA	105

Noções de sorologia aplicadas à fitovirologia

1. Introdução

A descoberta de que os animais, quando infectados, produzem substâncias capazes de reagir contra um agente infeccioso, podendo paralisar ou reduzir a infecção, permitiu o desenvolvimento da sorologia.

Os mecanismos imunológico e sorológico têm sido utilizados, rotineiramente, na pesquisa agropecuária, auxiliando a diagnosticar os agentes infecciosos, determinar o relacionamento entre vários microrganismos ou substâncias químicas, determinar sua concentração e ainda detectar a presença de diversos compostos antigênicos em cortes histológicos ou em extratos de tecidos vegetais.

Este trabalho pretende demonstrar a utilidade da sorologia, em vários campos de pesquisa, especialmente em fitovirologia e auxiliar aqueles interessados no assunto, descrevendo métodos de uso rotineiro e fornecendo-lhes citações bibliográficas.

2. Aspectos Imunológicos

De acordo com aqueles envolvidos no campo da imunologia, a principal função do sistema imunológico é a de proteger os animais de infecções causadas por agentes estranhos ou de toxinas produzidas por esses agentes. Essa constante vigilância é executada através de células específicas, bem como por proteínas denominadas anticorpos.

Segundo Harlow & Lane (1988), os diferentes mecanismos de defesa podem ser agrupados em duas categorias:

- 1- imunidade não adaptativa: células do sistema imunológico animal respondem, não especificamente, contra células invasoras, através dos macrófagos (fagocitose), através de células lacrimais (lisozimas) ou de células causadoras de lise. Neste caso, repetidas exposições a organismos infecciosos não aumentam a imunidade não adaptativa; e
- 2- imunidade adaptativa: células, denominadas linfócitos, atuam contra determinadas moléculas. Os linfócitos possuem, na sua superfície celular, estruturas específicas denominadas receptores que servem como ligação às moléculas invasoras. O contacto com estas moléculas induz a uma resposta imune específica e duradoura.

As substâncias capazes de induzir a resposta imune são denominadas antígenos e podem ser proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucléicos (Clausen 1988). Pequenas moléculas (haptens) não induzem a resposta imune mas podem fazê-lo se ligadas a macro-moléculas, que auxiliam nessa função.

No organismo humano há cerca de 10 bilhões de linfócitos que se originam na medula óssea (Harlow & Lane 1988). Os linfócitos estão distribuídos em todo o corpo e permitem resposta imediata à infecção em qualquer lugar. Os linfócitos são divididos em três grupos básicos: células B, células T e células T-auxiliares. Todos os três tipos possuem receptores, na sua superfície, que se ligam a antígenos específicos. As células B são responsáveis pela produção de anticorpos. As células T (citotóxicas) causam a lise de células invasoras ou estranhas ao organismo animal. As células T-auxiliares controlam a ação das células B e T. Nos mamíferos, os linfócitos B (LB) se diferenciam

na medula óssea enquanto os linfócitos T (LT) se diferenciam no timo. Nas aves, as células precursoras dos linfócitos B migram para um órgão junto à cloaca, denominado bolsa de Fabricius, onde se diferenciam em LB. Na verdade, a designação dos linfócitos em T e B, se deve à terminologia inglesa: "Timo dependent" e "Bursa dependent" (Klein 1990).

Os linfócitos T não produzem imunoglobulinas mas estimulam a produção de LB. Após entrarem em contacto com o antígeno, os LT liberam várias substâncias com diferentes atividades biológicas, dentre elas, aquelas que estimulam a diferenciação dos LB em plasmócitos, uma célula capaz de sintetizar grande quantidade de anticorpos. Resumidamente, a resposta do sistema imunológico, à infecção, ocorre do seguinte modo:

1. os antígenos, após ultrapassarem a primeira barreira de defesa (pele), são capturados pelos macrófagos (células fagocitárias mononucleares) que exteriorizam, na sua superfície, a estrutura do antígeno (epitopo) que será reconhecida pelo linfócito T auxiliador, ativando-o;
2. os linfócitos T-auxiliares (uma sub-população dos LT), quando ativados, auxiliam na multiplicação e diferenciação dos LB, específicos para aquele antígeno, em células-memória e plasmócitos produtores de anticorpos; e
3. os anticorpos reconhecem o antígeno específico e o "marcam", para posterior destruição pelos macrófagos.

As células-memória, quando sensibilizadas pelo antígeno específico que as originaram anteriormente, estimulam rapidamente a produção de imunoglobulinas.

Esse mecanismo é demonstrado, resumidamente, na Fig. 1.

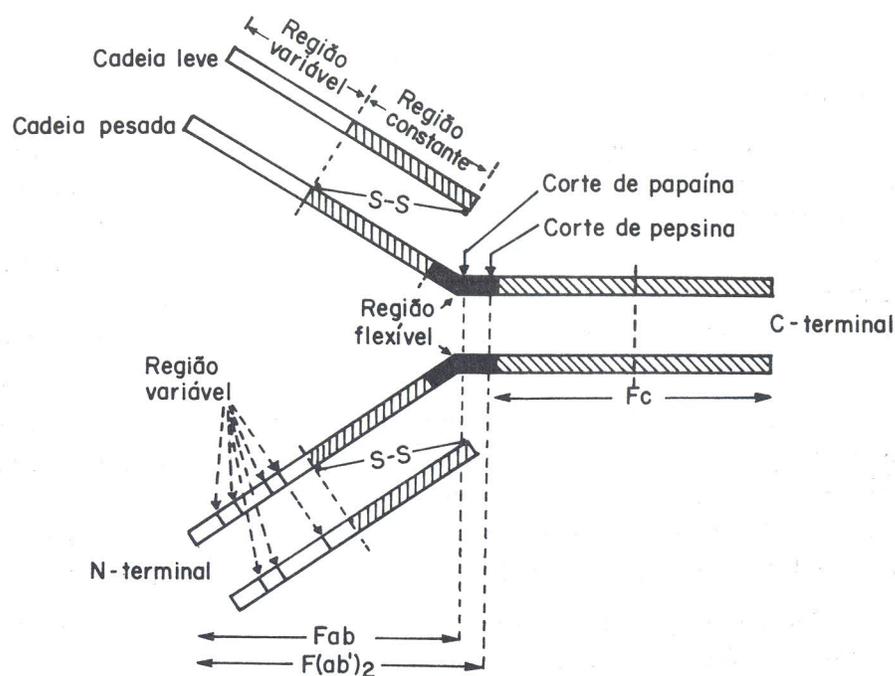


Fig. 2. Representação diagramática da molécula de imunoglobulina G.

TABELA 1. Características das principais imunoglobulinas segundo Regenmortel (1982)

	Peso (Kda)	Concentração %
Ig G	146	70 - 83
Ig M	970	10
Ig A	385	15 - 20
Ig D	184	< 1
Ig E	184	< 1

antigênicos ou epitopos. Cada molécula do anticorpo tem dois ou mais sítios de ligação, denominados paratopos. Cada paratopo reconhece um único epitopo, ou determinante antigênico, do antígeno. Este tópico será mais amplamente discutido no item 4.

Os anticorpos produzidos contra um determinado antígeno podem, muitas vezes, interagir com antígenos diferentes devido à semelhança entre os epitopos presentes nessas moléculas, o que é conhecido como reação cruzada. Este fato é comumente observado em antissoros produzidos contra fungos e bactérias, visto que, diferentes espécies desses organismos possuem epitopos idênticos, originando anticorpos semelhantes.

A ligação anticorpo-antígeno é feita através de diferentes ligações não covalentes, tais como: pontes de hidrogênio, forças de Van Der Waals e ligações hidrofóbicas. Segundo Harlow & Lane (1988), pequenas alterações na estrutura de um antígeno podem reduzir, em até mil vezes, a força de ligação do complexo antígeno-anticorpo.

Os sítios de ligação da molécula de imunoglobulina localizam-se na região de ligação da cadeia leve com a porção N-terminal da cadeia pesada. A porção C-terminal das duas cadeias pesadas juntam-se e formam a fração Fc. As extremidades de cadeias leves e pesadas, na região N-terminal, são extremamente variáveis quanto à seqüência de aminoácidos (Fig. 2). Esta variação está intimamente relacionada ao sítio ativo de ligação com o antígeno.

A região variável da fração Fab das imunoglobulinas (ver Fig. 2), está intimamente relacionada com a formação do sítio de ligação que se une ao determinante antigênico. Segundo Mernaugh et al. (1990) a porção N-terminal de ambas as cadeias do fragmento Fab, contém três sítios de ligação, cada um, constituído por uma seqüência muito variável de aminoácidos. Essas regiões, bem como aquelas que as cercam, são responsáveis pela ligação com o antígeno. As demais regiões da molécula são menos variáveis e são designadas regiões constantes.

Segundo Roitt et al. (1989), estudos de cristalografia, feitos a partir de análises de raio X, demonstraram que as regiões mais variáveis, localizadas nas extremidades dos "braços" das frações Fab, interagem com os antígenos. Essa interação ocorre através da formação de múltiplas ligações não covalentes

entre o antígeno e os aminoácidos da fração Fab, embora outras ligações, consideradas fracas, como pontes de hidrogênio, força eletrostática e força de Van Der Waals, estejam envolvidas. O somatório delas fornece considerável força energética de ligação.

Quando a IgG é tratada com papaína, ocorrerá a hidrólise da molécula com produção de três fragmentos. Dois desses fragmentos possuem tamanho igual e são formados por segmentos das cadeias pesada e leve (Fig. 3). São designados fragmentos Fab ("antigen-binding fragments"). O terceiro fragmento, denominado Fc ("crystallizable fragment"), é constituído pela cadeia pesada e não se liga a nenhum antígeno.

A região Fab, da IgG, está relacionada à ligação com o antígeno. A região Fc intermedia outras funções como a transmissão placentária e a ligação à superfície de células nas quais se encontram os receptores de Fc (Roitt et al. 1989).

Quando a IgG é tratada com pepsina, sua molécula é também hidrolisada, produzindo, no entanto, dois fragmentos Fab, ligados por pontes de dissulfeto, além do fragmento Fc. Neste caso, os fragmentos Fab são denominados $F(ab')_2$ (Fig.3).

O tratamento de IgG com papaína ou pepsina produz fragmentos que são muito úteis em testes sorológicos (ELISA indireto) os quais serão discutidos posteriormente (item 7.2.2.1).

Uma proteína, denominada proteína A, isolada de *Staphylococcus aureus*, possui alta afinidade pela região Fc da IgG (Regenmortel 1980). Esta característica é utilizada numa variação do teste de ELISA e será descrita no item 7.2.2.2.

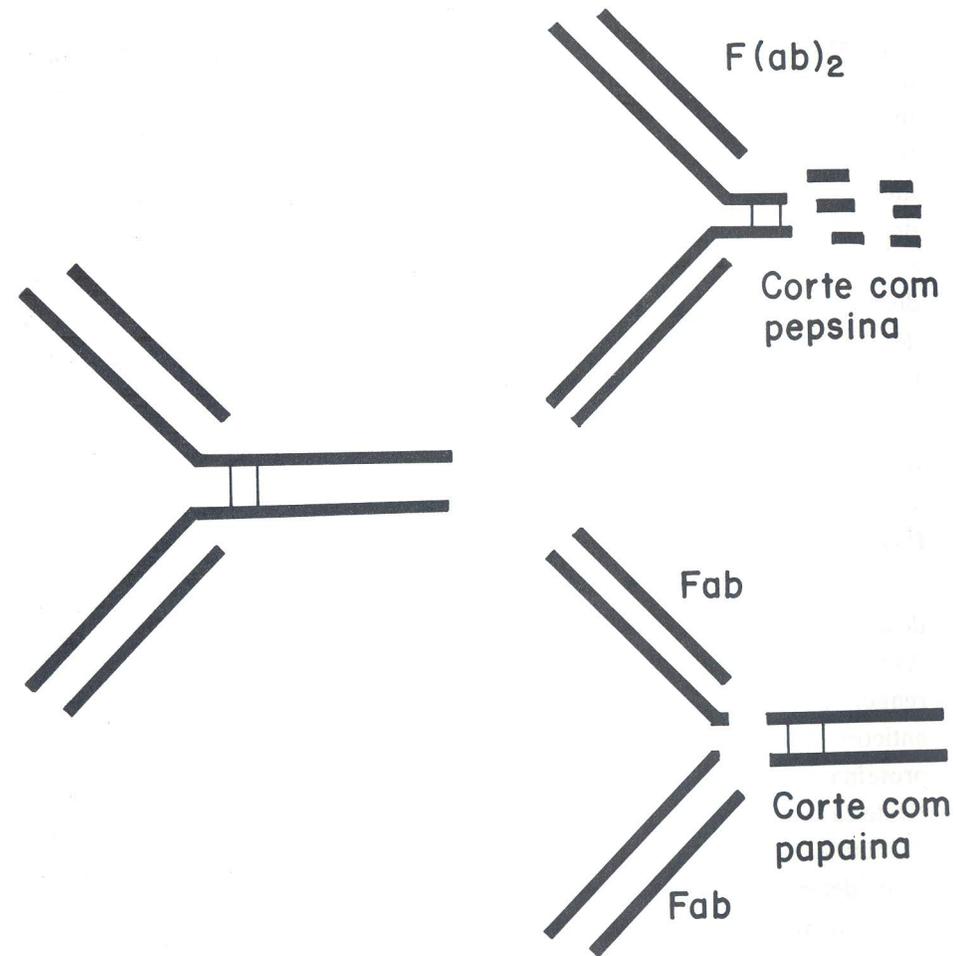


Fig. 3. Molécula de imunoglobulina G tratada com pepsina ou papaína, mostrando a formação das frações Fab e $F(ab)_2$.

4. Determinantes antigênicos

Determinadas moléculas (antígenos) possuem, na sua estrutura, regiões capazes de induzir a formação de anticorpos e que são chamadas determinantes antigênicos ou epitopos. A reação entre o antígeno e o respectivo anticorpo é muito específica, originando a complementariedade tipo chave (antígeno) e fechadura (anticorpo). Um epitopo possui estrutura tridimensional, complementar àquela do sítio de ligação do anticorpo. Os epitopos constituem o sítio de acoplamento entre o linfócito específico daquele epitopo e o sítio do antígeno para o qual determinado anticorpo foi formado. Assim, cada molécula de anticorpo é específica para o epitopo do antígeno ao qual se liga. No caso de proteínas, o tamanho do epitopo corresponde a poucos (cinco a sete) resíduos de aminoácidos (Regenmortel 1982).

É comum considerar-se dois tipos de epitopos: sequencial e conformacional (Sela et al. 1967). O epitopo sequencial consiste na seqüência de cinco a sete resíduos de aminoácidos na forma estrutural nativa da proteína (Fig. 4).

O determinante conformacional é constituído por um número de resíduos de aminoácidos que se encontram no interior da estrutura da macromolécula. Assim, anticorpos produzidos contra um determinado tipo de epitopo não reagem contra outro epitopo diferente. Isto ocorre, por exemplo, quando um anticorpo produzido contra uma proteína nativa deixa de reagir com a mesma proteína, quando é desnaturada e tem sua conformação estrutural alterada. Neste caso, esta proteína poderá (se injetada em um animal) induzir a produção de outros anticorpos diferentes, visto que, outros determinantes são formados. Estes determinantes são conhecidos como criptotopos e somente tornam-se ativos quando o antígeno é tratado com substâncias que o desnaturam, exteriorizando uma região da estrutura que não estava à mostra. Há casos em que o tratamento do antígeno induz a formação de novos determinantes antigênicos, os quais são denominados neotopos.

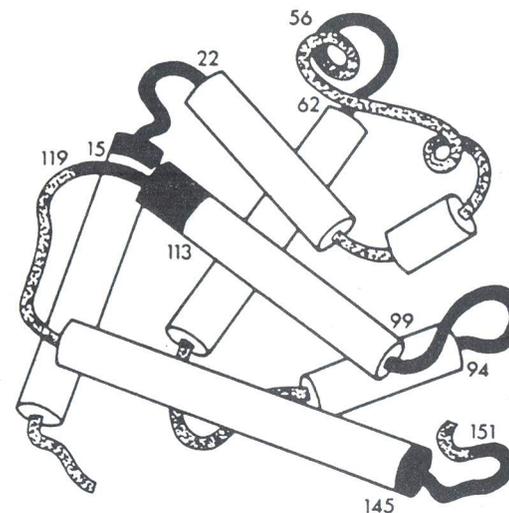


Fig. 4. Estrutura tridimensional da mioglobina. Os sítios antigênicos correspondem às regiões escuras. Os números representam os resíduos de aminoácidos da proteína e correspondem às extremidades dos diferentes epitopos. (Regenmortel 1982).

5. Produção de antissoros

Os procedimentos para obtenção de antissoros são muito variáveis e dependem dos objetivos da pesquisa.

Como o objetivo principal é o diagnóstico ou o estudo de fitoviroses, utilizar-se-á, para exemplificar, a produção de antissoros para vírus purificados de plantas. Em alguns casos, entretanto, utilizou-se também proteínas miceliais e proteínas oriundas de poliedros de baculovírus. O animal escolhido para a produção de antissoros foi o coelho, embora galinhas, ratos e cobaias também possam ser utilizados (além de cavalos, cabritos, etc.). Os coelhos permitem retirar quantidade suficiente de sangue, além de serem de fácil manuseio.

A qualidade do antígeno é muito importante. Sua pureza e integridade estrutural devem ser, sempre, consideradas para evitar reações espúrias que possam, no futuro, comprometer a interpretação dos resultados, dificultando as conclusões.

Após a injeção do antígeno, ocorrem diferentes reações no sistema imunológico do animal, culminando com a produção de anticorpos. A primeira reação, denominada resposta primária é, normalmente, uma reação fraca mas que deixa o organismo animal "alertado" para subseqüentes exposições ao mesmo antígeno. A segunda resposta é muito mais rápida e produz maior concentração de anticorpos. Em resumo, após a primeira injeção, ocorre um período latente antes que qualquer anticorpo apareça no sangue. Em seguida ocorre um aumento do título (concentração do anticorpo) com subseqüente declínio. A este fato, denomina-se resposta primária. Quando uma segunda injeção é ministrada, haverá um aumento rápido do título, cerca de 10 a 100 vezes acima daquele observado na primeira injeção, constituindo-se na resposta secundária (Fig. 5).

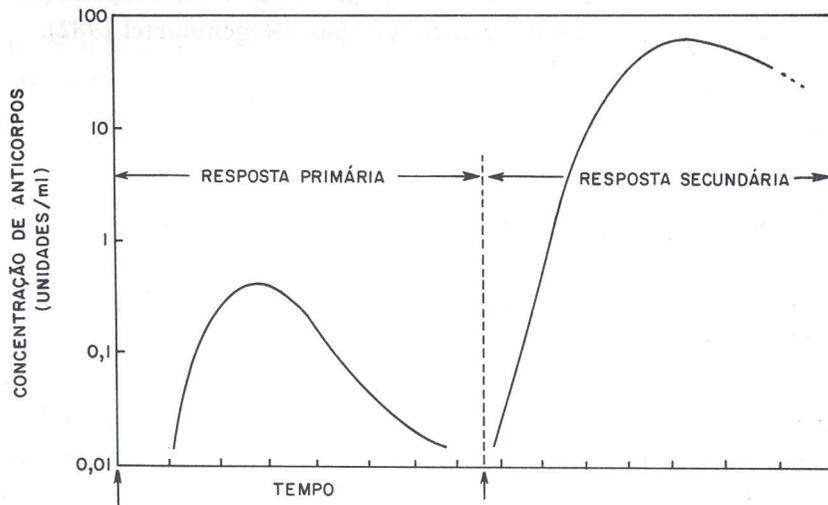


Fig. 5. Respostas primária e secundária de anticorpos, após as injeções de antígeno em coelhos. As setas indicam a primeira e segunda injeções.

5.1. Imunização

Os esquemas de imunização são extremamente variáveis. Alguns pesquisadores fazem combinações de injeções intramusculares (IM) e subcutâneas (SC) ou intradérmicas (ID). Há observações segundo as quais a produção de anticorpos (AC) é maior com injeções por via IM ou SC; intermediária, por via intraperitoneal (IP); e menos efetiva pela via ID.

Injeções intravenosas podem causar choque anafilático e, portanto, não são recomendáveis. Entretanto, quando se faz necessário a utilização dessa via, o antígeno não pode conter adjuvante.

Adjuvantes são reagentes químicos tais como óleo mineral e hidróxido de alumínio, que protegem o antígeno de um catabolismo rápido (Herbert 1978). Uma segunda função do adjuvante é estimular a resposta imune, aumentando a fagocitose e, conseqüentemente, o teor de linfocinas. As linfocinas são substâncias que provocam a reação inflamatória no local da injeção. No caso do adjuvante completo de Freund, o componente ativo e responsável pelo auxílio à infecção é encontrado em *Mycobacterium tuberculosis* e denominado MDP (muramil dipeptídeo). Esse adjuvante injetado (previamente misturado com o antígeno) induz a inflamação local, com proliferação de macrófagos que, entrando em contacto com o antígeno, estimularão os linfócitos B a produzirem os anticorpos (Ac).

Em geral, o adjuvante completo deve ser somente utilizado na primeira injeção e nunca deve ser utilizado em injeções intravenosas (IV). As injeções IV podem causar embolia pulmonar e choque anafilático nos animais. Qualquer toxina, para a qual se pretende obter um antissoro, é perigosa quando aplicada pela via IV. O soro fisiológico e as condições adequadas de salinidade devem ser usadas, sempre que possível.

O adjuvante completo ou incompleto de Freund e o antígeno devem ser misturados na proporção de 1:1, antes da injeção. Essa mistura deve ser feita usando-se seringa com agulha grossa (BD 15). Quando uma gota dessa mistura, colocada na superfície da água, não se dissolve, indica o ponto ideal de mistura para a injeção nos animais, utilizando agulha de calibre mais fino, tipo BD 25x7. Injeções subseqüentes, denominadas injeções de estímulo

("booster"), são aplicadas quando se observa declínio na concentração de anticorpos e utilizadas para aumentar o título do antissoro. Não devem conter adjuvante.

De acordo com Harlow & Lane (1988), a escolha da via de imunização depende de vários fatores:

1. volume a ser injetado;
2. tampão e outros componentes a serem utilizados; e
3. rapidez da resposta imunológica e, conseqüentemente, da liberação do antígeno no sistema circulatório.

Em fitovirologia há várias técnicas de imunização descritas e alguns exemplos são dados a seguir:

- a) IM 1 mês → IM 3 semanas → sangria (Purcifull & Hiebert 1979);
- b) IM 7-10 dias → IM 7-10 dias → IM 10-15 dias → sangria (Lima et al. 1979); e
- c) IM 14 dias → IM 28 dias → Intra-venosa → 14 dias → IM 21 dias → sangria (Agraval & Maat 1964).

Outros exemplos, oriundos de trabalhos conduzidos no CNPSO são:

- a) IM 7 dias → IM 14 dias → sangria (antissoro produzidos contra lipoxigenase); e
- b) IM 7 dias → IM 14 dias → sangria (antissoro produzido contra proteínas de baculovírus).

Uma outra opção, consiste na injeção no linfonódulo da pata, conforme descrição de Oliveira (1975). O autor observou que uma única injeção induziu resposta imunológica mais rápida do que aquelas obtidas em outros esquemas aplicados em trabalhos similares.

Injeções intramusculares são adequadas para antígenos misturados a adjuvante completo. Injeções subcutâneas têm resposta imunológica mais lenta do que intramusculares, sendo recomendadas como "booster". De acordo com Tijessen (1985) não houve vantagem em fazer injeções subcutâneas em diferentes pontos da pele.

A maioria dos pesquisadores aplicam de 1 mg a 10 mg de vírus por injeção. De acordo com Regenmortel (1982), não há correlação entre injeções com concentrações elevadas de vírus e antissoro com título alto. Por questão de segurança, a maioria dos pesquisadores aplicam concentrações acima do necessário, para indução imunológica. Segundo Hildebrand & Hymowitz (1981), duas injeções, com 5 mg de lipoxigenase, aplicadas subcutaneamente no pescoço de coelhos, foram suficientes para produção de antissoro com título satisfatório.

Em experimentos conduzidos no CNPSO - EMBRAPA, com fungos e vírus, as doses têm sido de 10 mg/ml de proteína micelial, 0,5 mg/ml de proteína de poliedros desnaturados e 0,5 mg/ml a 1 mg/ml de vírus de plantas. A produção de massa micelial e a separação de antígenos específicos por eletroforese constam dos Anexos I e II. A produção de células bacterianas, a imunização e a obtenção de antissoro, encontram-se descritas no Anexo III.

No caso de bactérias fitopatogênicas, Nakashima & Nydegger (1986) obtiveram antissoro contra *Pseudomonas solanacearum* utilizando suspensão de 10^9 células por ml, emulsificada em igual volume de adjuvante completo de Freund, injetando de 1 ml a 2 ml por vez. O teor de proteínas pode ser facilmente determinado pelo método de Bradford (1976) (Anexo IV).

Fica claro, pelos exemplos dados, que a dose ótima de antígeno a ser injetada é variável e nem todas as macromoléculas são imunógenos eficientes e têm dificuldades para induzir a produção de anticorpos. Assim sendo, os testes de doses e o uso de adjuvantes podem auxiliar nesta função.

Há relatos orientando para que se evitem injeções nas patas dos animais, devido aos ferimentos causados e por existirem opções menos injuriantes. **Nunca é demais lembrar que todos os cuidados devem ser adotados, de modo a reduzir, ao máximo, o desconforto e a dor dos animais utilizados.**

A obtenção do sangue, em coelhos, é normalmente feita através de pequena incisão transversal da veia marginal da orelha (Fig. 6).

A coleta de sangue, na veia marginal das orelhas do coelho, pode ser iniciada a partir da terceira injeção (cerca de duas a três semanas após a primeira injeção), acompanhada de testes sorológicos para determinação do título. Normalmente, utiliza-se o teste de microprecipitina, mas pode-se

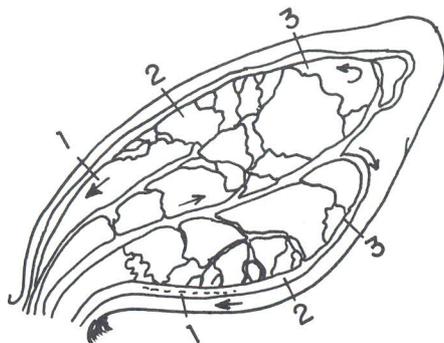


Fig. 6. Esquema de distribuição das veias na orelha de coelhos. A numeração sugere a seqüência de cortes da veia marginal para a coleta de sangue.

também utilizar o teste de difusão dupla em ágar. Os animais devem ficar em jejum, por 12 a 15 horas, antes da sangria, porém com acesso a água, para reduzir o teor de lipídios no soro.

Retiram-se de 5 ml a 10 ml de sangue por animal, apenas para avaliação do título. Amostras maiores (20 ml a 40 ml) serão retiradas quando o título for adequado, em intervalos de sete a dez dias.

Um modelo de ficha para controle dos testes de imunização de animais é apresentada no Anexo V.

O animal deve ser colocado dentro de uma pequena caixa de madeira, com o pescoço sob uma guilhotina móvel para sua imobilização (Anexo VI).

Inicialmente, raspa-se o pêlo da região a ser seccionada. Cobre-se a pele com uma fina camada de vaselina, para evitar a coagulação rápida do sangue e infiltração nos pêlos adjacentes à incisão. Não aplicar no local da incisão, mas ao redor do local da mesma. O corte é feito transversalmente à veia e coleta-se cerca de 20 ml a 30 ml de sangue. A base da veia, junto à cabeça do coelho, deve ser pressionada para que o sangue venoso não retorne. A aplicação de xilol, aplicado na ponta da orelha auxilia no fluxo sangüíneo pois causa dilatação das veias. Outra opção é cobrir a orelha do coelho, por alguns

minutos, com uma toalha aquecida para causar dilatação das veias marginais. Imediatamente após a coleta do sangue, deve-se lavar bem o local de aplicação de xilol com água. Para interromper o sangramento, deve ser aplicado sobre o corte um chumaço de algodão com vaselina, sob pressão. Se persistir o sangramento, deixar o animal na caixa e prender o algodão com vaselina, com um grampo ("clips") por alguns minutos. Retirar quando o animal for transferido para sua gaiola.

Após ser coletado num béquer de vidro, o sangue é deixado à temperatura de 37°C por 1 h. A seguir, desloca-se o coágulo com uma espátula de vidro. A amostra é então transferida para um refrigerador onde permanecerá por 12 a 16 h. Posteriormente, as amostras são centrifugadas a 2500 g por 10 min. Forças centrífugas maiores tendem a romper as hemácias residuais tornando o soro avermelhado. O soro obtido é então dividido em pequenas aliquotas de 1 ml a 2 ml e congelado a -20°C. O armazenamento por longo tempo, a 4°C, induz a precipitação de lipídios que podem ser eliminados através de centrifugação. Os antissoros não devem ser congelados e descongelados repetidamente, pois isto pode causar agregação dos anticorpos, com conseqüente perda de atividade. No entanto, pelo menos um relato não detectou esse efeito (Clausen 1988). Uma alternativa é diluir o AS (1:1) em glicerol 50%, antes do congelamento. O antissoro pode ser mantido em refrigerador, por algumas semanas, desde que se adicione azida de sódio a 0,02%, para evitar a contaminação com microrganismos.

Outra forma de obtenção de anticorpos é através da imunização de galinhas. Os anticorpos são obtidos a partir das gemas dos ovos de galinhas imunizadas. O método descrito por Bar-Joseph & Malkinson (1980) é o seguinte:

1. galinhas adultas, em postura e mantidas em gaiolas individuais, são imunizadas com injeção intravenosa (IV), na asa, seguida de uma intramuscular (IM), no peito. Na injeção IV é aplicado de 10 a 100 ug/ml de imunógeno, dissolvido em 1 ml de solução salina. A injeção IM é aplicada com adjuvante completo de Freund (Difco Laboratories). Duas outras injeções IM serão aplicadas, com intervalos de uma semana;
2. deve-se coletar um ovo de cada galinha antes da imunização, para obtenção do soro pré-imune;

3. os ovos devem ser coletados diariamente, iniciando-se a coleta, sete dias após a primeira imunização, até um total de 25 a 30 ovos. Cada ovo será processado individualmente;
4. a IgY é extraída a partir da gema. Inicialmente, separa-se a gema da clara. Os resquícios da clara (albumina) são separados com leve jato de água;
5. adicionar, a cada gema, 20 ml de tampão PBS, misturando vigorosamente e centrifugar a 10000 g por 20 min. O sobrenadante, contendo a IgY, será utilizado para determinação da atividade em teste de dupla difusão em gel. Nesse teste utilizam-se os orifícios centrais da placa para diluição do AS e os periféricos para diluição do Ag. Outra maneira é determinar o título do As através do teste de ELISA; e
6. armazenar o AS adicionado de glicerol (1:1, v/v) à -20°C.

Outros métodos que reduzem o teor de lipídios e de proteínas contaminantes são descritos por Polson et al. (1980) e Hu et al. (1985).

Os interessados podem encontrar informações adicionais nesses trabalhos, bem como no trabalho de Colariccio et al. (1994).

6 - Métodos sorológicos

Diversos métodos sorológicos estão descritos na literatura. Na Tabela 2 são citados os métodos comumente utilizados em fitovirologia.

Embora várias técnicas estejam disponíveis, apenas aquelas utilizadas no CNPSo serão discutidas neste trabalho. Publicações mais específicas estão relacionadas na literatura consultada (Oliveira et al. 1976, Lima 1979, Lima et al. 1979, Hampton et al. 1990).

Basicamente, o interesse é determinar o título do antissoro obtido, avaliar sua capacidade de diagnose e estudar o relacionamento sorológico entre diferentes estirpes do mesmo vírus ou até com outros vírus. Alternativamente, os mesmos métodos poderão ser utilizados, com pequenas alterações, com baculovírus, fungos e bactérias.

TABELA 2. Tipos de testes sorológicos.

A. PRECIPITAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO
1. Precipitação em tubo
2. Precipitação em lâmina
3. Microprecipitina em placa
B. PRECIPITAÇÃO EM MEIO SEMI-SÓLIDO (ágar-gel)
1. Difusão simples
2. Difusão dupla (Teste de Ouchterlony)
3. Imunoelektroforese
C. AGLUTINAÇÃO
1. Látex
2. Eritrócitos
D. ANTICORPOS CONJUGADOS
1. Fluorescência
2. Isótopos radioativos (I^{125} , H^3)
3. Enzimas

Os testes baseiam-se no fato das reações entre antissoro (As) e antígeno (Ag) formarem precipitado esbranquiçado, facilmente visível ao microscópio estereoscópico.

A precipitação ocorre devido à formação do complexo As-Ag, onde epitopos do Ag se ligam aos sítios específicos, presentes nos respectivos anticorpos. O precipitado formado pela reação antígeno-anticorpo será maior quando as concentrações de Ag e Ac forem as mais adequadas. A explicação para o fato baseia-se na teoria do látice: uma única molécula de Ac liga-se a duas moléculas de Ag, simultaneamente, favorecendo a precipitação. A explicação deste mecanismo é mostrada na Fig. 7. Segundo Regenmortel (1982) esta teoria é muito simplista. Na verdade, existem dois mecanismos envolvidos. Numa primeira fase ocorre a formação de um pequeno complexo antígeno-anticorpo. Posteriormente, segue-se uma fase de forte reação hidrofóbica, na qual o precipitado torna-se insolúvel sob certas condições de pH.

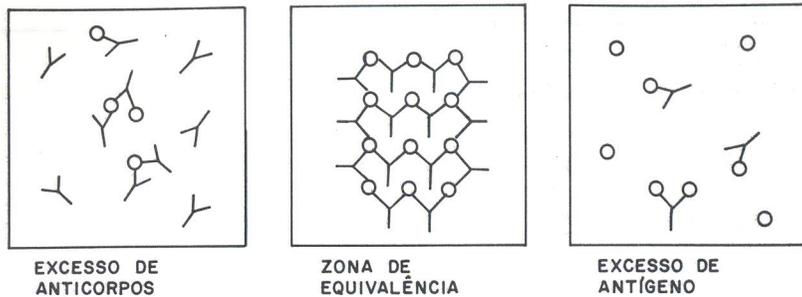


Fig. 7. Demonstração da teoria do látice, para formação de precipitados em testes sorológicos.

Devido ao objetivo desta publicação, apenas quatro testes, dentre aqueles citados na Tabela 2, serão discutidos.

6.1. Microprecipitina

Este método tem sido muito utilizado não só na determinação do título (máxima diluição do antissoro ainda capaz de reagir com o antígeno homólogo), como também na diagnose de vírus de plantas e indexação de material de propagação vegetativa (Sampson & Taylor 1968, Ball 1974). Suas vantagens são: pouco gasto de antissoro, reagentes e material de laboratório e a facilidade na observação dos resultados.

Podem ser utilizadas placas de Petri de plástico ou de vidro. Se forem usadas placas de vidro, estas devem ser tratadas com Formvar 1% (dissolvido em clorofórmio) para promover a formação de uma película hidrofóbica que manterá o formato de gota dos reagentes. Com o auxílio de lápis de cera são traçadas as quadrículas onde serão depositadas as gotas de As e Ag. Um esquema da combinação de diluições de Ag e As é mostrado na Fig.8. Nas colunas são depositadas as diluições de Ag (1:4, 1:8, 1:16...1:512) e nas fileiras as diluições de As (1:2, 1:4, 1:8...1:1028, etc.). O As é diluído em solução salina (NaCl, 0,85%) e o Ag em tampão fosfato de sódio, 0,001M, pH 7.

A homogeneização dos reagentes (uma gota de cada) é realizada com auxílio de palito ou micropipeta, iniciando-se pela quadrícula onde se encontra a maior diluição de ambos os reagentes. Em seguida, cobre-se a placa, mantendo-a em câmara úmida, à temperatura ambiente. As avaliações podem ser feitas em intervalos de 8 h e consistem na observação da formação de precipitados ou floculações esbranquiçadas no interior das gotas.

A maior diluição do As capaz de causar precipitação corresponde ao seu título.

Caso seja necessário, pode-se preparar outra placa com diluições maiores do que a primeira. No Anexo VII, é mostrado um modelo de ficha para avaliação de teste de microprecipitina.

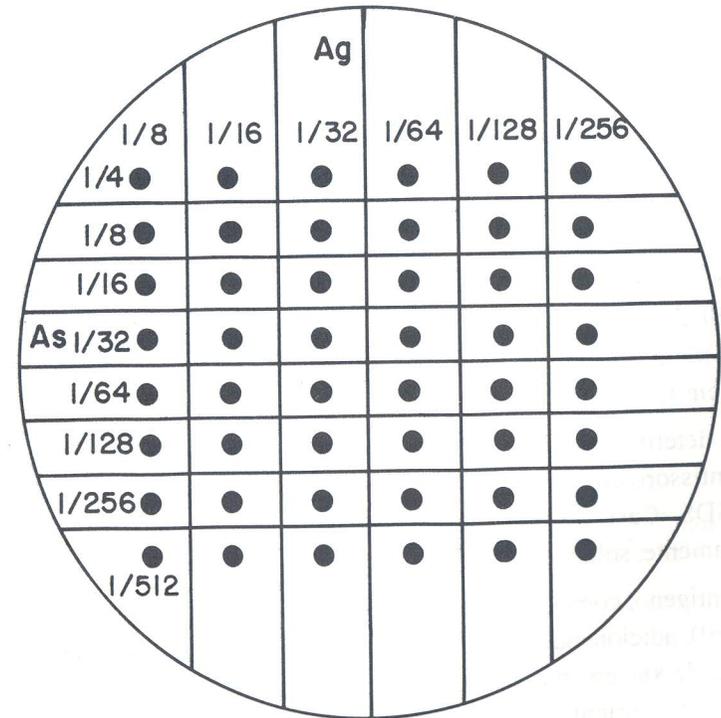


Fig. 8. Diagrama da placa de Petri preparada para o teste de microprecipitina.

6.2. Difusão dupla em ágar

Devido ao interesse em avaliar o relacionamento sorológico entre vírus e à necessidade de determinar o título do antissoro produzido, o teste de difusão dupla em ágar tem sido utilizado mais rotineiramente.

O preparo do meio dependerá da forma da partícula do vírus. Partículas alongadas requerem o uso de dodecil sulfato de sódio (SDS), visto que tais vírus não se difundem facilmente no meio. O SDS degrada a partícula do vírus, quebrando a proteína capsidial, que contém componentes imunoreativos, permitindo, assim, sua difusão no gel. Em alguns casos, pode não haver reação, pois o anticorpo foi produzido contra o vírus intacto, podendo não reconhecer os epitopos que se formam após a dissociação da proteína capsidial pelo SDS. Informações adicionais sobre este teste encontram-se no trabalho de Purcifull & Batchelor (1977).

O meio utilizado nesse teste consiste na mistura de 0,8% de ágar (Noble ágar, Difco), 0,5% de SDS e 1% de azida de sódio dissolvidos em 100 ml de água esterilizada. A azida de sódio contribui elevando a força iônica do meio além de inibir o desenvolvimento de microrganismos. Em geral, após a fusão do meio em banho-maria ou forno de microondas, coloca-se 12 ml por placa (diâmetro de 10 cm). Após a solidificação do ágar, as placas são acondicionadas em saco plástico, para evitar perda de umidade e mantidas em refrigerador. O SDS tende a precipitar em temperaturas entre 2°C a 4°C, dando tom opaco ao meio. Entretanto, quando as placas são retiradas do refrigerador e deixadas em temperatura ambiente, o meio torna-se novamente transparente.

Na determinação do título, Purcifull & Batchelor (1977) recomendam diluir o antissoro em soro normal ao invés de solução salina, quando o meio contém SDS. Caso o soro normal não esteja disponível, pode-se utilizar, alternativamente, solução de NaCl a 0,85%, dissolvida em tampão Tris, pH 7,2.

O antígeno, composto de tecido vegetal infectado, deve ser triturado em água (1g/ml), adicionando-se em seguida, 1 ml de solução de SDS a 3%. Filtrar em gaze e deixar em repouso por 1 a 2 h. Caso o extrato seja liofilizado, utilizar o SDS somente no momento de uso, numa concentração de 0,1% a 1,5%.

Deve-se evitar que o líquido adicionado ao orifício seja extravasado, o que poderá afetar a resolução das linhas de precipitação. As avaliações são feitas 24 e 48 h após a adição dos reagentes às placas, desenhando-se as linhas de precipitação observadas. Caso necessário, fotografa-se a placa utilizando uma caixa com luz difusa, em sala escura (ver modelo no Anexo VIII).

Os vírus esféricos se difundem facilmente no ágar e, conseqüentemente, não necessitam de SDS.

Devido à difusão do Ag e do As, haverá (ou não) a formação de uma linha branca, correspondente ao precipitado do complexo anticorpo-antígeno. A nitidez da linha de precipitação é função da concentração do antígeno e do antissoro. Por essa razão, recomenda-se inicialmente determinar a melhor concentração do Ag e do As. Uma sugestão é utilizar um dos padrões de disposição de Ag e As conforme citado por Piazzi (1959) (Fig.9).

Para estabelecer a diluição máxima do antissoro (título) capaz de ainda reagir com o antígeno que lhe deu origem (reação homóloga), devem ser feitas diluições do antissoro em pequenos tubos de vidro, transferindo-se depois as amostras das diluições para os orifícios periféricos, no sentido horário. No orifício central é colocado o antígeno, sem diluição.

Uma disposição adequada dos orifícios é mostrada na Fig. 10. O modelo permite testar quatro antissoros diferentes ou, quatro diluições de um mesmo

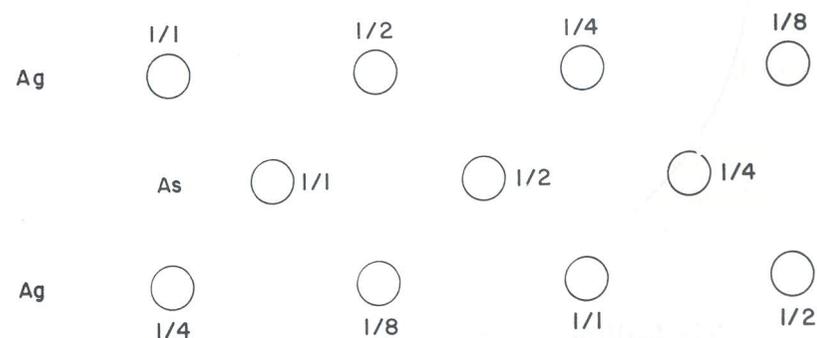


Fig. 9. Posicionamento de antissoro e antígeno, para avaliação da melhor diluição, segundo Piazzi (1959).

antissoro. Os orifícios têm 7 mm de diâmetro, com capacidade para 10 a 12 μ l e estão distanciados entre si em 0,5 mm. É importante observar que a distância entre os orifícios pode interferir na resolução e na interpretação dos resultados. Esta distância tem sido adequada nos trabalhos realizados no CNPSo.

No estudo de relacionamento sorológico entre antissoro e antígenos, utiliza-se o orifício central com o antissoro e os orifícios periféricos com os vários antígenos (Purcifull & Hiebert 1979). Várias combinações podem ser feitas, com os seis orifícios periféricos, permitindo avaliar o relacionamento sorológico dos vários antígenos testados.

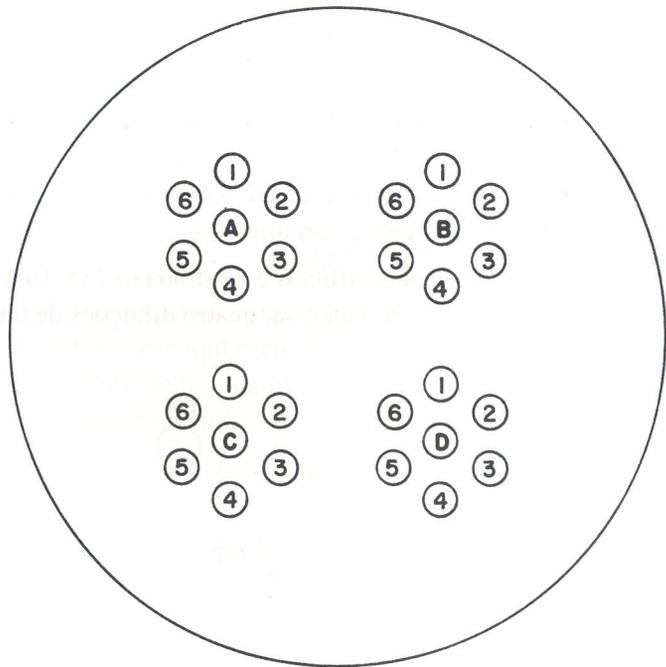


Fig. 10. Modelo da disposição dos orifícios em placa de Petri, com ágar perfurado, para o teste sorológico de difusão dupla. Modelo para quatro diferentes antissoros ou quatro diluições de um mesmo antissoro.

Neste ponto, seria interessante recordar os aspectos discutidos até aqui, referentes aos determinantes antigênicos, aos anticorpos produzidos e os padrões básicos de precipitação. Na Fig. 11 são sumarizadas estas interações e explicada a ocorrência das linhas de precipitação, em diferentes combinações antígeno-anticorpo.

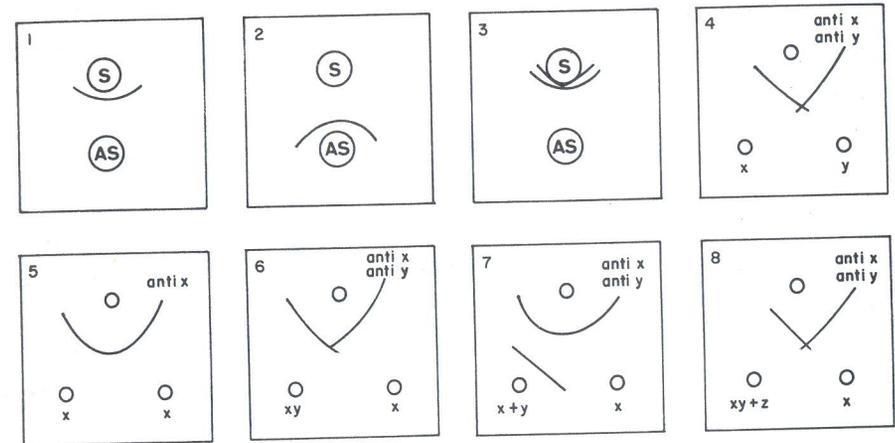


Fig. 11. Precipitações observadas em testes sorológicos de dupla difusão em ágar, com várias combinações antígeno-antissoro.

Os números (1 a 8), na Fig. 11, são para indicar os tipos de reações antígeno-antissoro, como segue:

1. linha de precipitação próxima do antígeno e com curva direcionada em torno do mesmo. Indica que o antígeno difunde-se mais vagarosamente do que o antissoro devido ao maior peso molecular. A linha tende a se curvar em torno do reagente de maior peso molecular;
2. linha de precipitação próxima do antissoro e com curva direcionada em torno deste. Indica que o antissoro (ou sub-unidades deste) se difunde (m) mais rapidamente do que o antígeno;

3. mais de uma linha próxima do antissoro e com curva direcionada em torno dele. Indica que mais de um componente está presente no antígeno ou antissoro. Também pode indicar excesso de antissoro;
4. cruzamento de linhas. Indica que dois antígenos distintos possuem dois epitopos diferentes e que não há identidade;
5. fusão simétrica de linhas. Indica que os antígenos combinam igualmente com o mesmo antissoro;
6. formação de esporão. Neste caso existem determinantes comuns e diferentes, entre dois antígenos. O antissoro possui ambos os componentes. A explicação para a formação do esporão encontra-se descrita na Fig. 12;
7. um dos dois antígenos contém dois tipos distintos de moléculas que migram de forma diferente; e
8. uma das duas moléculas possui epitopos semelhantes entre si e um terceiro pode estar presente apenas na primeira molécula.

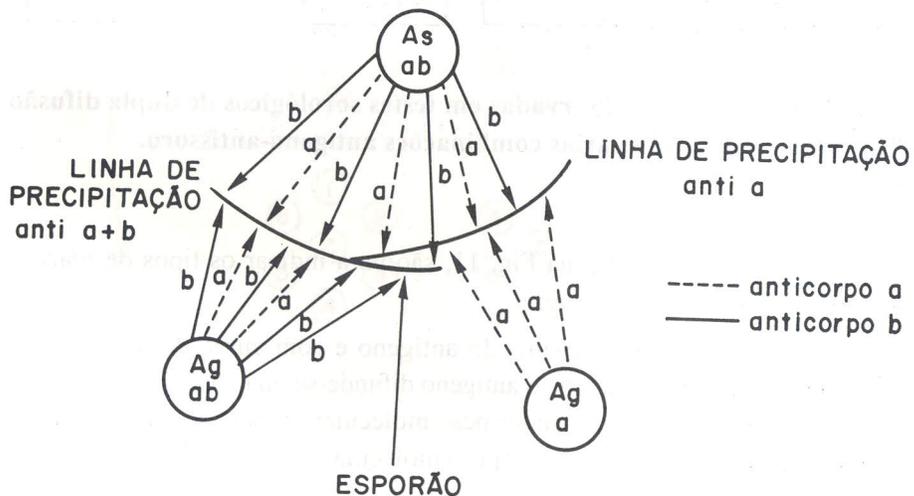


Fig. 12. Descrição da formação de esporão entre duas linhas de precipitação, em teste de difusão dupla em ágar.

Embora o antígeno que irá imunizar os animais deva ser utilizado na forma mais pura possível, às vezes isso não acontece, originando, consequentemente, anticorpos que reagirão com proteínas vegetais, reduzindo assim a eficiência dos testes sorológicos quanto à diagnose. Segundo Singer et al. (1952) cerca de 50% das proteínas vegetais contaminantes de suspensões virais purificadas é constituída pela fração I, presente nos extratos vegetais e corresponde, segundo Kawashima & Wildman (1970), à enzima ribulose bifosfato carboxilase (rubisco). Uma maneira de minimizar esta reação não específica é através da absorção do antissoro com extrato de plantas sadias. No orifício do gel, onde é colocado o antissoro, adiciona-se extrato de tecido sadio (1g/10 ml de tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7). Incuba-se a placa, em câmara úmida, por 4 a 6 h. Esvazia-se o orifício (se necessário) e adiciona-se o antissoro. Ao mesmo tempo, adiciona-se nos orifícios periféricos as amostras infectadas. Os anticorpos "indesejáveis", produzidos contra a contaminação do antígeno, ficarão retidos em torno do orifício do antissoro, podendo formar um anel de coloração difusa. Os demais anticorpos difundir-se-ão no meio de ágar e originarão a(s) linha(s) de precipitação. A comparação entre as placas, com e sem absorção, permitirá, ainda, concluir qual das linhas era causada por antígenos interferentes.

Um fato importante, comentado por Grogan et al. (1964), nos estudos de relacionamento sorológico, utilizando o sistema de dupla difusão em gel, é quanto à posição do antissoro em relação aos antígenos. Cada sítio antigênico na partícula viral estimula a produção de um anticorpo o qual migra, diferentemente, dos outros anticorpos produzidos contra outros sítios. Entretanto, todos os sítios antigênicos, na partícula viral, se difundem juntos. Assim, a colocação do antissoro no orifício central é a forma correta de avaliar o relacionamento sorológico de vírus e evita interpretações errôneas (Lima 1994)². Na Fig. 13, compilada de Grogan et al. (1964), é ilustrado este comentário.

² Comunicação pessoal do Dr. José Albérico Araújo Lima, Prof. da Universidade Federal do Ceará para Álvaro M. R. Almeida, EMBRAPA-CNPSO, em 1994.

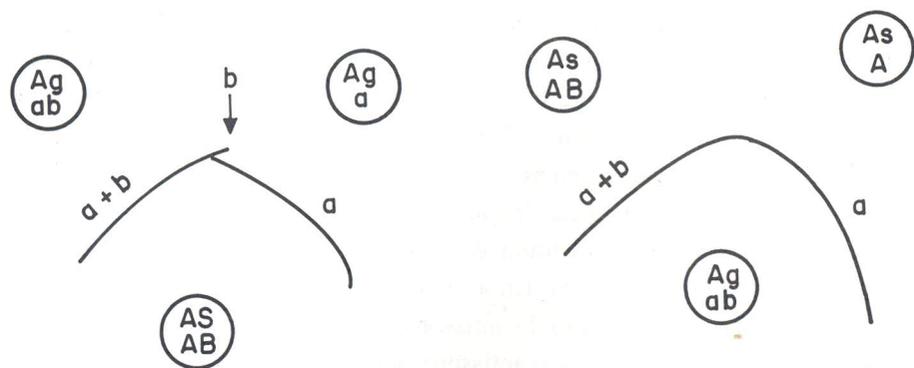


Fig. 13. Efeito da posição do antissoro em teste de dupla difusão em gel, segundo Grogan et al. (1964).

A visualização das linhas de precipitação pode ser muito mais fácil através da câmara de luz difusa cujo diagrama é apresentado no Anexo VIII.

6.3. Imunoelektroforese

A capacidade de anticorpos e antígenos se difundirem, passivamente, num meio poroso, foi associada à capacidade dessas mesmas substâncias de difundirem-se, também, sob a ação de um campo elétrico. A combinação desses dois tipos de difusão deu origem à imunoelektroforese.

Segundo Catty & Raykundalia (1989), este método traz algumas vantagens ao sistema de difusão normalmente utilizado (ex. dupla difusão em ágar), por permitir melhor separação de antígenos diferentes, devido às diferenças na migração de suas moléculas, com diferentes pesos moleculares, presentes no gel submetido ao campo elétrico.

A mobilidade das moléculas em um campo elétrico depende do tipo de solução tampão utilizada. A escolha do tampão dependerá do ponto isoelétrico (PI) do antígeno. Em geral, é aconselhável utilizar o pH acima do PI para que

as proteínas fiquem carregadas negativamente e não reajam com o ágar ou não se desnaturem no meio alcalino. Os constituintes do ágar, como agaropectina, um polisacarídeo sulfurado bem como um polímero de galactose, quando carregados negativamente afetam a migração de compostos antigênicos. Assim sendo, deve-se utilizar ágar de melhor qualidade, normalmente indicado pelo fabricante, para este tipo de trabalho.

Pode haver casos em que se faz necessário utilizar mais de um sistema tampão. Por exemplo, as glicoproteínas com baixo PI devem ser separadas em pH variando de 3,5 a 4,5. Entretanto, a reação subsequente envolvendo o antissoro, não poderá ser feita em pH ácido (Clausen 1988), o que exigirá novo tampão para auxiliar a difusão dos dois compostos: antígeno e antissoro.

Segundo Tremaine (1990), em geral se utiliza, para esta técnica, pH entre 7 e 8, bem como tampão da cuba com baixa molaridade o que redundará em baixa produção de calor durante a corrida. A desvantagem do método é o gasto excessivo de antissoro.

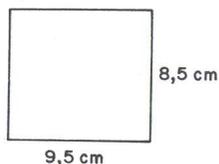
6.3.1. Método de Grabar & Williams

É o método clássico para detecção de um ou vários antígenos numa amostra.

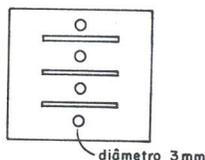
Descrição:

Preparar o gel dissolvendo 1g de ágar em 100 ml de tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,2. Numa placa de vidro de 8,5 x 9,5 cm, previamente desengordurada, distribuir 11 ml do meio fundido em banho-maria. Deixar esfriar e transferir para refrigerador por 15 a 20 min. afim de endurecer o gel. Com o auxílio de um bisturi cortar o sulco, conforme indicado na Fig. 14, sem contudo retirá-lo. Em seguida, perfurar o meio, retirando o miolo do orifício por sucção. O miolo do sulco será retirado após a corrida. No orifício, adicionar o antígeno misturado a 3 µl de solução marcadora (10 mg de azul de bromofenol; 0,5 ml de tampão Tris-HCl 1M, pH 8,5; 9,5 ml H₂O; 10 ml glicerol). A placa é então transferida para a cuba de eletroforese horizontal onde as bordas da placa, contendo o gel, são cobertas com papel de filtro. O

A - Distribuição da agarose na placa.

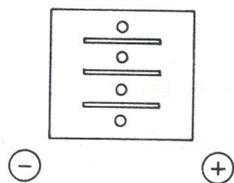


B - Corte dos sulcos e orifícios.

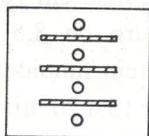


C - Colocação do antígeno nos orifícios.

D - Eletroforese.



E - Retirada do miolo dos sulcos e colocação do antissoro.
Incubação em câmara úmida 12-16 h.



F - Aparecimento de linhas de precipitação.

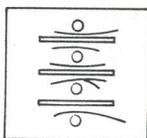


Fig. 14. Descrição da técnica imunoeletroforética segundo Grabar & Williams (1953).

tampão do tanque (Tris-HCl 0,005 M, pH 7,2) difundir-se-á no papel de filtro por higroscopicidade. A fonte de energia, regulada para 7V/cm, é ligada por 1 h. Neste caso, 70V por 1 h. Decorrido esse tempo, retirar o miolo de ágar do sulco, adicionar o antissoro e transferir a placa para câmara úmida por 12 a 16 h. Após o período de incubação, pode-se visualizar as linhas de precipitação. Um exemplo pode ser visto na Fig. 15.

Para colorir a placa é necessário deixá-la em solução salina (0,9% de NaCl) sob leve agitação, trocando-se a solução por seis vezes num período de 48 h para retirar o excesso de antissoro do meio. Em seguida, lavar suavemente em água destilada por 3 a 4 h. **Cuidado: durante as lavagens, o gel pode se desprender da placa.** Cobrir a placa com várias folhas de papel de filtro, prensados com um peso (500 g). Terminar a secagem à temperatura ambiente e colorir por 20 min. com solução de "coomassie blue" R-250 (0,5g de coomassie, solubilizada em 100 ml da solução composta de metanol:água:ácido acético 450:450:100 ml). Descolorir na mesma mistura de etanol, ácido acético e água, sob leve agitação. Secar a placa à temperatura ambiente. Este método tem apresentado bons resultados para análise comparativa de isolados de *Phomopsis sojae* e *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*, oriundos de sementes e plantas de soja.

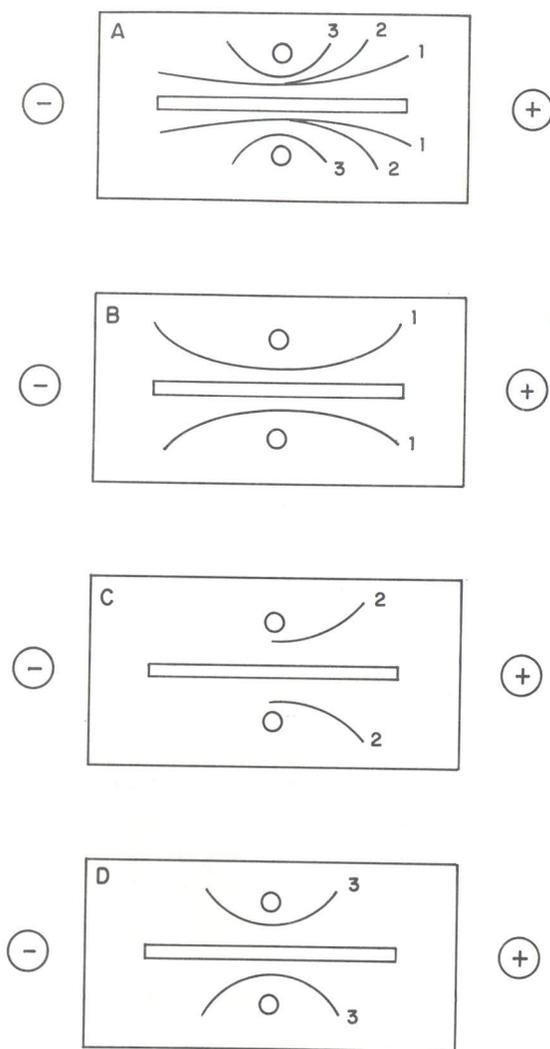


Fig. 15. Interpretação do resultado obtido em imunoeletroforese, utilizando o método de Grabar & Williams (1953). A amostra, neste caso, reagiu com o antissoro utilizado, produzindo três linhas de precipitação (A), indicando a presença de três antígenos (B, C e D).

6.3.2. Método de Clarke & Freeman

Descrição:

Preparar quatro placas. Na placa 1 coloca-se apenas a agarose enquanto que na placa 2, coloca-se a agarose misturada ao antissoro (a temperatura do meio deve estar em torno de 45°C para adição do AS). A placa é então dividida em três faixas, conforme o modelo mostrado na Fig. 16. Em cada faixa, na extremidade do catodo (-), é feito um orifício. Assim, em cada placa, podem ser colocadas três amostras, sendo uma amostra por faixa. Terminada a eletroforese (a 7V/cm por 1h) as faixas são cortadas, com auxílio de um bisturi e transferidas para a mesma posição, na placa 2. Como na placa 1 haviam três amostras, serão necessárias três placas 2, que serão denominadas placa 2A, 2B e 2C. A ligação entre os dois géis deve ser bem feita, para não haver espaços vazios entre eles. A placa é submetida a outra eletroforese por 3 a 4 h, alterando-se, entretanto, a direção da corrida. O antígeno difunde-se no meio contendo antissoro, originando, após um período de incubação de 12 a 24 h em câmara úmida, as linhas de precipitação. Em seguida são realizadas a lavagem e a coloração da placa, conforme descrito anteriormente. Este método permitiu a diferenciação de raças fisiológicas de *Colletotrichum graminicola*, isolado de sorgo, segundo Paiva et al. (1990).

Moldes plásticos para testes de imunoeletroforese bem como outros equipamentos podem ser adquiridos do fabricante Pharmacia (LKB 2117-401 Multiphor immunoelectrophoresis Kit).

Cada antígeno reagirá com o anticorpo específico originando uma ou várias linhas de precipitação. Muitos antígenos serão identificados pela posição das linhas de precipitação. A área abaixo de cada linha de precipitação é proporcional à quantidade do antígeno.

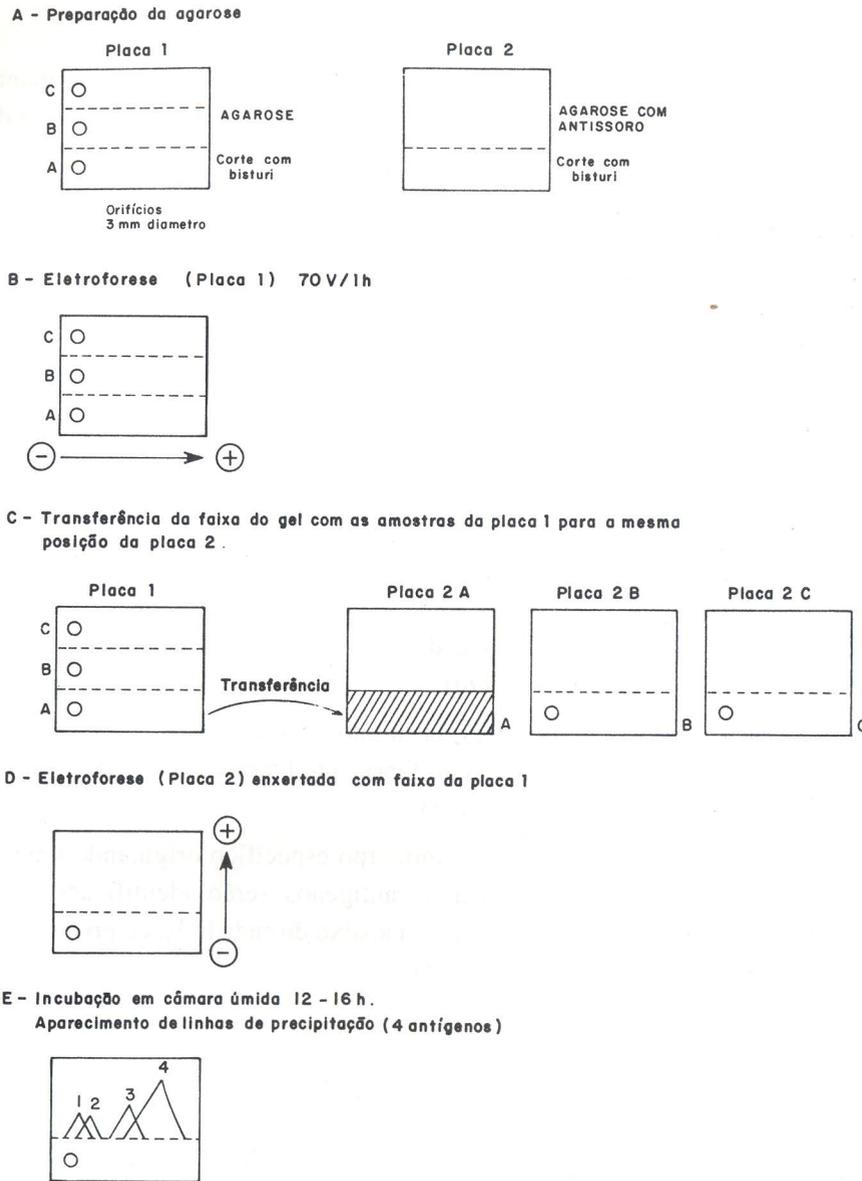


Fig. 16. Descrição da técnica imunoeletroforética, segundo Clarke & Freeman (1968).

6.4. Imunofluorescência

Enquanto o teste de ELISA permite detectar e quantificar um determinado imunógeno em solução ou num extrato vegetal, a técnica de imunofluorescência permite detectar um determinado antígeno no tecido vegetal analisado, bem como sua distribuição nas diferentes partes da planta (Craig et al. 1979, Gingery 1978, Lei & Agrios 1986).

O princípio é o mesmo do teste de ELISA e baseia-se na ligação de um composto químico, denominado fluorocromo, à IgG. Quando submetido à luz ultravioleta torna-se fluorescente, permitindo, assim, localizar o antígeno homólogo.

O fluorocromo absorve a luz em determinado comprimento de onda e a emite em um comprimento de onda maior. Os filtros utilizados nos microscópios bloqueiam as ondas oriundas do fluorocromo permitindo a passagem apenas da emissão fluorescente. Atualmente, há microscópios adequados para esta técnica, cuja iluminação ultravioleta origina-se no topo do microscópio (epiluminescência), atinge o espécimem e retorna como luz fluorescente (Fig. 17).

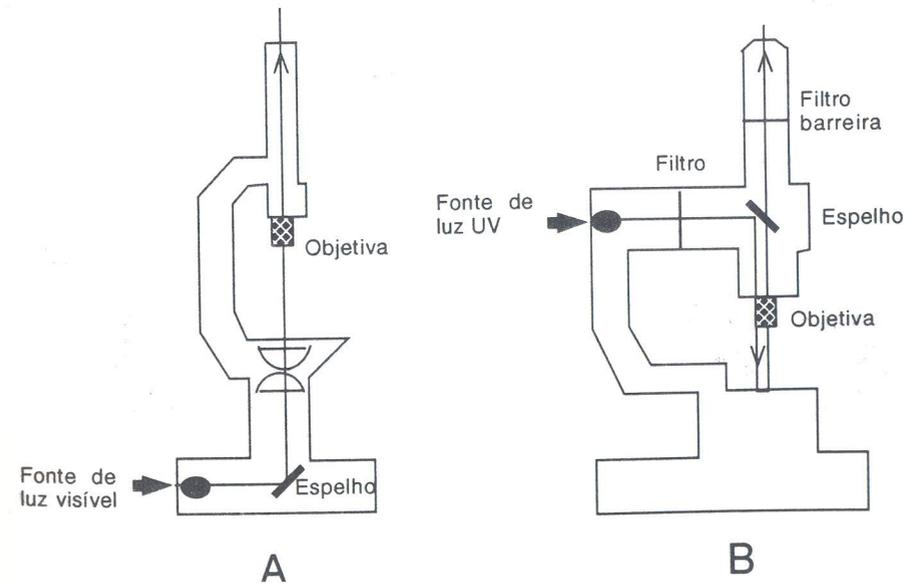


Fig. 17. Comparação de sistemas de iluminação de microscópios com luz visível (A) e luz ultravioleta (B).

Essa técnica pode ser dividida em imunofluorescência direta e indireta. Na direta (Fig. 18A), o fluorocromo é ligado à IgG que reconhecerá o antígeno nos cortes de tecidos vegetais ou nos protoplastos. Na indireta (Fig. 18B), o fluorocromo é ligado a um segundo anticorpo, produzido em um segundo animal, contra o primeiro anticorpo, o qual ligar-se-á ao antígeno.

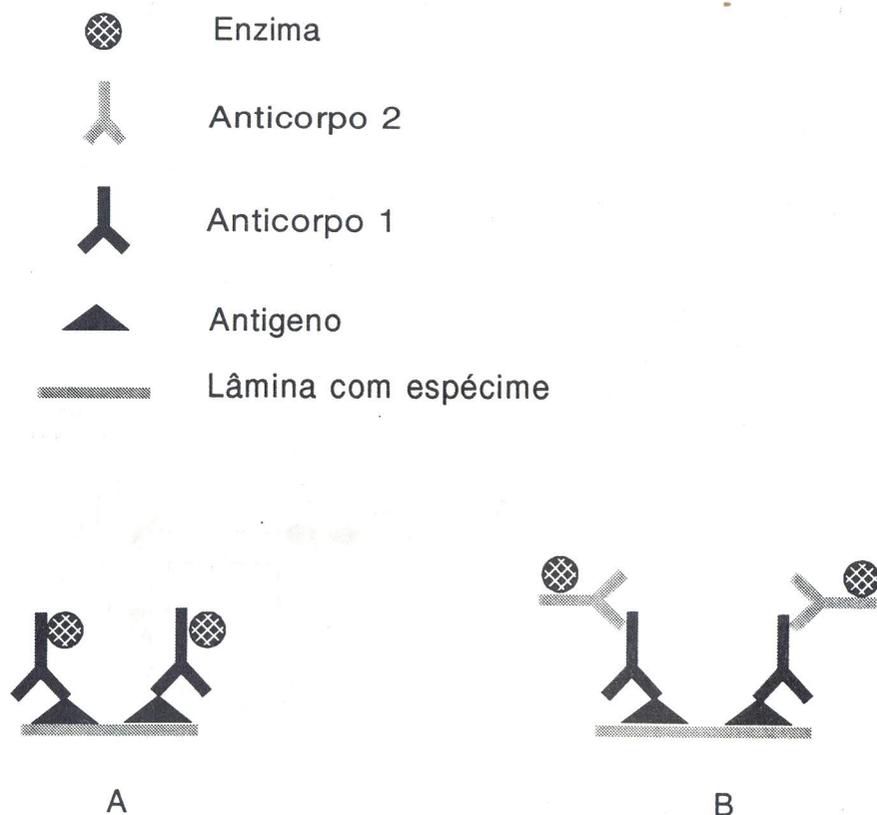


Fig. 18. Esquema de imunofluorescência direta (A) e indireta (B).

As vantagens do método indireto são:

- 1) maior sensibilidade causada pelo efeito amplificador da segunda reação (IgG - anti IgG). Haverá maior número de moléculas do conjugado (IgG - fluorocromo) ligadas a cada molécula da IgG; e
- 2) um mesmo conjugado produzido contra um segundo animal (anti IgG), serve para testar vários antígenos, tornando-se mais econômico. Uma alternativa é utilizar a proteína A conjugada ao fluorocromo. A proteína A, conjugada ao fluorocromo, se ligará à IgG.

A ligação do fluorocromo às moléculas de IgG é trabalhosa. Assim sendo, àqueles interessados em mais detalhes sobre esse tópico recomenda-se a leitura do artigo de Gingery (1990). Entretanto, a melhor sugestão é adquirir os produtos de empresas especializadas, cujos endereços são mostrados no Anexo IX.

Os fluorocromos normalmente utilizados são:

- 1) isotiocianato de fluoresceína (Sigma F 4151), que emite luz verde; e
- 2) isotiocianato de tetrametilrodamina (Sigma T 5268), que emite luz vermelha. Entretanto, o isotiocianato de fluoresceína é o mais comumente utilizado devido ao seu baixo custo.

O método para detecção de infecção por vírus, em tecidos infectados é o seguinte:

- 1) proceder o corte do tecido que será analisado, em micrótomo de congelamento, ou outro tipo adaptado para blocos de inclusão de tecido em parafina;
- 2) transferir o corte, com 4 a 6 microns de espessura, para uma lâmina de vidro, previamente limpa com acetona, etanol ou metanol, para auxiliar a aderência do corte. O adesivo de Haupt é útil: dissolver 1 g de gelatina em 100 ml de água a 90°C. Resfriar a mistura e adicionar 15 ml de glicerina. Misturar e filtrar. Adicionar formalina 4% para evitar contaminação com microorganismos;
- 3) lavar vagarosamente, durante 5 min., por imersão, a lâmina com o corte da amostra em tampão PBS contendo albumina de soro bovino a 1%. Essa solução bloqueará os espaços responsáveis por reações não específicas;

- 4) escorrer o excesso de solução e secar as bordas com papel de filtro;
- 5) manter a lâmina em local úmido;
- 6) cobrir a amostra com 10 a 20 µl de antissoro e incubar em câmara úmida à temperatura ambiente, por 30 a 60 min.;
- 7) lavar o excesso de antissoro com tampão PBS (1% BSA) conforme item 3, por três vezes, durante 10 min.;
- 8) cobrir o corte com o conjugado anti IgG acoplado ao fluorocromo;
- 9) repetir o item 7, escorrer o excesso e secar as bordas com papel de filtro;
- 10) adicionar uma gota de glicerina tamponada, pH 9,5, cobrir com lamínula e selar as extremidades com esmalte; e
- 11) observar ao microscópio de fluorescência com filtro compatível com o fluorocromo utilizado.

No caso da imunofluorescência direta, o conjugado composto pela IgG e o fluorocromo, será aplicado na etapa correspondente ao item 6, seguindo-se então os procedimentos descritos nos itens 7, 9 e 10.

A visualização é feita em microscópio equipado com luz ultravioleta, condensador de campo escuro, filtros adequados ao fluorocromo utilizado e objetiva de imersão. Objetivas planocromáticas, por exemplo, não transmitem luz UV (Roberts 1986). Normalmente, os fabricantes de microscópios com equipamentos adaptados à imunofluorescência fornecem indicações de filtros e lentes, específicos para este trabalho.

Uma preocupação constante refere-se ao uso de controles. Devido à ocorrência de autofluorescência com organelas vegetais é necessário comparar tecidos infectados com tecidos sadios para auxiliar nas conclusões.

7. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE VÍRUS PELO TESTE DE ELISA

A utilização de imunoglobulina conjugada a uma enzima, para detecção de antígenos e anticorpos, foi sugerida por Avrameas (1969). Entretanto, o uso do conjugado com a finalidade de detectar e quantificar a imunoglobulina G foi descrita por Engvall e Perlmann (1971), que denominaram esse método de ELISA (**Enzyme Linked Immunosorbent Assay**).

Devido à sensibilidade desse método na diagnose e quantificação de antígenos específicos, ele foi muito utilizado no diagnóstico de vírus de seres humanos e de animais (Voller et al. 1974, Crowther & Abul-El-Zein 1979).

A introdução do método de ELISA na fitovirologia deveu-se ao trabalho pioneiro de Voller et al. (1976) seguido por outro descrito por Clark & Adams (1977). Posteriormente sua utilização estendeu-se para as áreas da micologia e da bacteriologia. Atualmente, ELISA tornou-se importante método auxiliar nos trabalhos com vírus de plantas e de outros patógenos como fungos (Mohan 1988; Hampton et al. 1990), bactérias (Malin et al. 1985, Caron & Copeman 1985) e substâncias imunológicas tais como toxinas, alcalóides (Tietjen et al. 1985, Morgan et al. 1983, Treimer & Zenk 1978), ácido abscísico (Daie & Wyse 1982) e ácido giberélico (Atzon & Weiler 1983). Na Tabela 3 é mostrada a comparação entre a sensibilidade do teste de ELISA com outras técnicas sorológicas citadas anteriormente na Tabela 2.

TABELA 3. Sensibilidade na detecção de antígenos através de diferentes técnicas sorológicas (Regenmortel 1982).

Técnicas Serológicas	Limite de detecção
Difusão dupla de ágar	2-20 µg/ml
Precipitina	1-10 µg/ml
Imunodifusão radial	0,5-10 µg/ml
Precipitação com látex	5-20 ng/ml
ELISA	5-10 ng/ml
Imunoadsorção em microscopia eletrônica	1-10 ng/ml

O método de ELISA é também considerado um teste sorológico para identificação e quantificação de vírus de plantas e outros antígenos apresentando, contudo, maior sensibilidade. Entretanto, seu sucesso dependerá, além de outros fatores, da qualidade do antissoro produzido contra um antígeno específico (vírus, bactéria, micélio de fungo, etc), do suporte físico utilizado, da preparação do conjugado, das padronizações quanto às concentrações adequadas dos reagentes e do extrato vegetal que contém o vírus. Às vezes, o extrato vegetal contém substâncias que interferem nos resultados podendo originar falsos positivos, mesmo com tecido sadio.

7.1. Descrição do teste de ELISA

ELISA baseia-se no princípio clássico da sorologia, onde o antígeno é reconhecido pelo antissoro (Imunoglobulina) que lhe deu origem, formando o complexo anticorpo-antígeno, associado a propriedades colorimétricas.

A coloração do meio ocorre devido à ação de determinada enzima sobre um substrato cromogênico. A enzima é previamente conjugada à imunoglobulina (Ig). Por exemplo, quando se utiliza fosfatase alcalina conjugada à Ig, o substrato adicionado é o p-nitrofenilfosfato dissódico que inicialmente é incolor. Ao ser transformado pela ação da enzima em p-nitrofenolfosfato, a solução torna-se amarelada. A intensidade desta coloração será medida em espectrofotômetro (em geral mede-se a absorbância) com filtro adequado para o comprimento de onda de 405 nm. Para outras enzimas são utilizados outros comprimentos de onda. Neste trabalho, comumente os exemplos vão considerar essa enzima. No caso de se utilizar a peroxidase, os possíveis substratos e respectivos comprimentos de onda, utilizados na medida da absorbância, são apresentados na Tabela 4.

De acordo com Clark e Bar-Joseph (1984), várias enzimas são citadas para a obtenção de conjugados. Entretanto, fosfatase alcalina e peroxidase ("horseradish peroxidase") têm sido utilizadas mais comumente na diagnose de vírus de plantas. A fosfatase alcalina, embora mais cara que a peroxidase,

apresenta as seguintes vantagens: liga-se facilmente à imunoglobulina através do glutaraldeído e sua reação cinética com o substrato é linear.

A ligação da peroxidase ("horseradish peroxidase") à imunoglobulina requer mais trabalho, utilizando-se para tal, de periodato de sódio. Sua reação cinética não é linear e a ação enzimática é, progressivamente, inibida (auto-inibição) durante a hidrólise do substrato. Além disso, muitos extratos vegetais contêm esta enzima. Outro fato é sua inativação em presença de azida de sódio. Utilizando peroxidase e orto-fenilene diamine, como substrato, a leitura da absorbância deverá ser realizada a 492 nm. A solução deve apresentar coloração laranja-escuro.

A sensibilidade do método de ELISA pode ser aumentada através do uso de substratos fluorogênicos como o fosfato 4-metil-umbeliferil (Torrance & Jones 1982) e fosfato 3-orto-metilfluoresceína (Morley & Jones, 1980). Entretanto, sua utilização requer o uso de fluorímetro, o que dificulta seu emprego.

Substratos radioativos também têm sido utilizados para aumentar a sensibilidade do teste de ELISA. No entanto, estes testes necessitam de equipamentos mais sofisticados, caros e exigem maior atenção, nível de treinamento na condução do teste e cuidados com os produtos radioativos.

Outra técnica que procura aumentar a sensibilidade, através da amplificação da reação, foi descrita por Guesdon et al. (1969) utilizando biotina e avidina. Devido à alta afinidade de ligação entre essas duas substâncias e à facilidade de ligação entre a biotina e a IgG, elas têm sido muito utilizadas no teste de ELISA.

McLaughlin et al. (1981) mencionam uma melhoria no teste de ELISA para detecção de vírus de plantas apenas alterando o tempo e a temperatura das diversas reações que compõem este teste. Os autores observaram que o período de incubação da IgG pode ser reduzido. Porém, a redução de tempo para a incubação do antígeno reduziu a adsorção do mesmo à placa.

7.2. Variações Descritas do Teste de ELISA

Segundo Koenig & Paul (1982a), as variações no teste de ELISA diferem na sensibilidade e na capacidade de detectar vírus sorologicamente relacionados.

Embora existam diversas variações do teste de ELISA, todas elas dependem de um princípio básico: macromoléculas aderem a vários tipos de suportes físicos, tais como plásticos, borracha, vidro, silicone e membranas de nitrocelulose ou nylon, através de adsorção (interações hidrofóbicas não covalentes). Essas ligações possuem força suficiente para promover a adesão das macromoléculas ao suporte físico. Entretanto, algumas poucas moléculas se desprendem do suporte após as diversas e vigorosas lavagens, requeridas pelo teste.

Basicamente, podemos classificar o teste em ELISA direto e ELISA indireto. No primeiro caso utiliza-se a IgG e o conjugado produzidos em apenas um animal e, no segundo caso, utilizam-se duas IgG, uma para reconhecer o antígeno e outra (anti-IgG) produzida em diferente espécie de animal, que reconhece a primeira IgG, com a qual se ligará.

A primeira aplicação desta técnica em fitovirologia foi descrita por Clark & Adams (1977), que a denominaram ELISA sanduíche duplo de anticorpos (Fig. 19A). Contudo, diversos pesquisadores têm verificado que essa técnica possui alta especificidade. Assim sendo, estirpes de um mesmo vírus podem não ser detectadas por determinada imunoglobulina (Barbara et al. 1978, Koenig 1978, Rochow & Carmichael 1979, Lister & Rochow 1979, Regenmortel & Burckhard 1980). Isto pode conduzir a sérios inconvenientes quando se trabalha com a diagnose de fitovirose devido à possibilidade de se obter resultados negativos de infecção quando, na verdade, a amostra está infectada com uma estirpe diferente daquela utilizada na preparação do antissoro.

Além disso, o teste de ELISA direto requer uma imunoglobulina e seu respectivo conjugado, para cada vírus a ser detectado, o que torna o método mais caro.

O desenvolvimento do método de ELISA indireto (Fig. 19B), permitiu a detecção de estirpes de um mesmo vírus que, embora sejam sorologicamente

relacionados, apresentam maior variação entre si e podem ser detectados indiscriminadamente (Torrance 1980, Regenmortel & Buckhard 1980, Koenig 1981, Barbara & Clark 1982). Nesse método, o conjugado é preparado a partir de anti-imunoglobulina, obtida de uma espécie animal diferente daquela que originou o antissoro contra o vírus. O método indireto é útil em trabalhos com vírus cuja concentração, após a purificação, é baixa (maior sensibilidade), quando existe pouca disponibilidade de antissoro e em diagnose, visto que o vírus é detectado independentemente da estirpe.

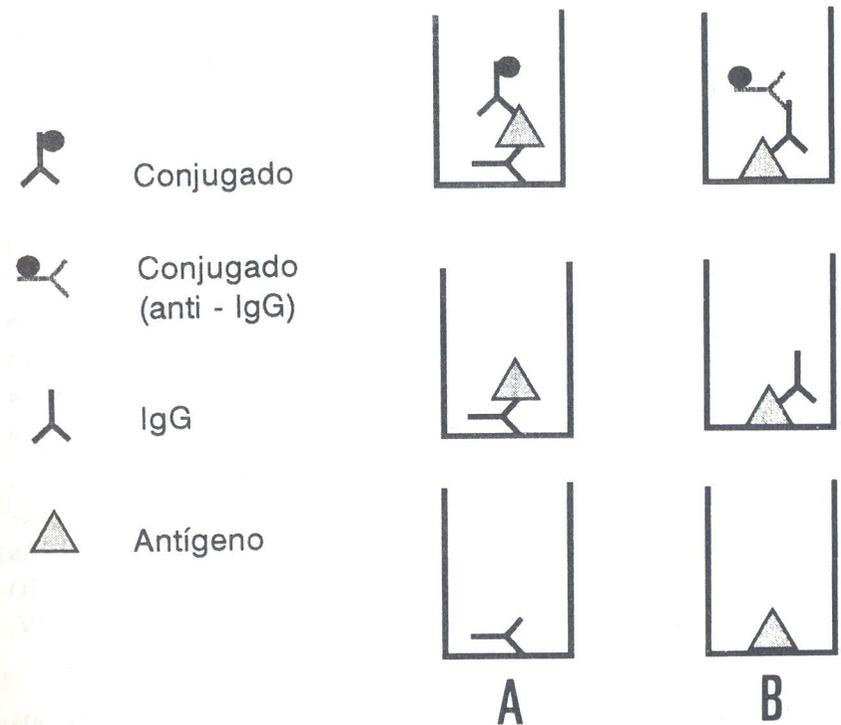


Fig. 19. Esquemas do teste de ELISA sanduíche duplo, segundo Clark & Adams (1977) (A) e ELISA indireto (B), segundo Koenig & Paul (1982a).

Atualmente, diversas variações do teste de ELISA são conhecidas e são demonstradas através da Fig. 20 (Koenig & Paul 1982a, 1982b).

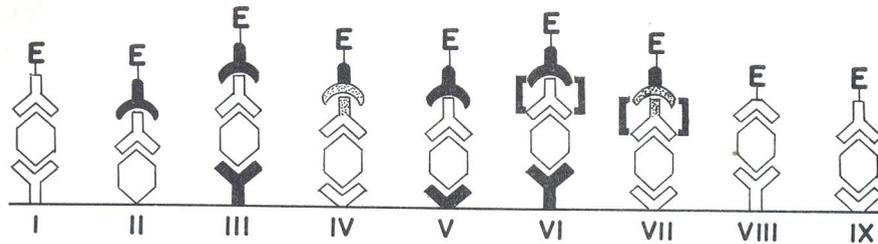


Fig. 20. Variações do teste de ELISA segundo Koenig & Paul (1982a)

As partículas virais são representadas por um hexágono. Anticorpos específicos ao vírus e fragmentos Fab ou F(ab')₂ são representados por símbolos em forma de Y ou V. A fração Fc e as globulinas são representadas por formas arredondadas. A enzima é representada pela letra E. A cor branca ou preta representa anticorpos originários de dois animais diferentes. A área achureada, nos anticorpos, indica reação entre a porção Fc do anticorpo específico contra o vírus e a fração Fc correspondente do anticorpo.

As colunas I, VIII e IX representam ELISA direto em placas pré-cobertas com anticorpos completos (I, VIII) ou fragmentos F(ab')₂ (IX). As colunas II a VII representam ELISA indireto em placas não pré-cobertas (II) ou pré-cobertas com anticorpos completos (III e VI) ou fragmentos F(ab')₂ (IV, V, VII).

Outras variações, mais recentes, têm sido descritas em diversos trabalhos. Entretanto, não serão aqui discutidas. Os interessados podem consultar os trabalhos de D'Arcy et al. (1989), Peterschmitt et al. (1992), Ellis & Wiczorek (1992).

Fica claro, portanto, que a escolha do método mais adequado dependerá de vários fatores, que devem ser analisados conjuntamente, como por exemplo: a praticidade, o número de amostras a serem analisadas, a sensibilidade requerida no diagnóstico e o interesse de identificação de novas estirpes do vírus dentro das amostras coletadas.

7.2.1. Descrição do teste de ELISA direto tipo sanduíche duplo

As etapas para esta técnica são as seguintes:

- 1) adicionar aos orifícios da placa, de 100 a 200 µl da solução da IgG dissolvida em tampão de cobertura (pH 9,6). A concentração da IgG deve ser determinada previamente através de curva padrão (ver item 7.6);
- 2) incubar a 37°C, por 2 a 3 h, ou 4°C, por 12 a 18 h. Manter a placa em saco plástico com papel toalha umedecido;
- 3) esvaziar os orifícios da placa e lavá-los com PBS-Tween, utilizando uma piseta. Os extratos de folhas, sementes e micélio, tendem a aderir à placa. Por isso, a lavagem deve ser feita com auxílio de uma pipeta, dirigindo-se o jato para cada orifício, individualmente. A placa deve ser mantida inclinada durante a lavagem. Após cada lavagem, deixar a solução nos orifícios, por 3 min., entre cada lavagem. Fazem-se três lavagens por vez;
- 4) adicionar de 100 a 200 µl da amostra aos orifícios da placa;
- 5) repetir item 2;
- 6) repetir item 3;
- 7) adicionar de 100 a 200 µl do conjugado (por exemplo, IgG ligada a fosfatase alcalina), aos orifícios da placa;
- 8) repetir item 2;
- 9) repetir item 3;
- 10) adicionar de 100 a 200 µl de substrato (p-nitrofenilfosfato);
- 11) aguardar a formação de coloração até intensidade adequada (absorbância entre 0,3 e 0,8). Marcar o tempo para comparações futuras;

- 12) adicionar 40 µl de NaOH 3N aos orifícios da placa; e
- 13) efetuar a leitura em espectrofotômetro a 405 nm.

Os aparelhos para leitura de placas de ELISA permitem mudar o filtro de iluminação de acordo com o sistema conjugado-substrato que está sendo utilizado. Assim, o comprimento de onda adequado deve ser estabelecido antes do início do trabalho, conforme as recomendações descritas na Tabela 4.

TABELA 4. Enzimas e substratos comumente utilizados no teste de ELISA e respectivos comprimentos de onda para avaliação da absorvância.

Enzima	Substrato	Comprimento de onda (nm)
Fosfatase alcalina	p-nitrofenilfosfato	405
Peroxidase	o-fenileno diamino	492
	azino-etilbentiazoline sulfonado	650
	tetrametilbenzidina	450

Quando não se dispõe de uma leitora de placas de ELISA, pode-se diluir a amostra em 1 ml de água destilada e efetuar a leitura em espectrofotômetro, calibrado para o comprimento de onda adequado à enzima utilizada, usando cuveta de quartzo com 1 cm de largura. Neste caso, a reação na placa deve ser mais longa afim de que a coloração possa ser mais forte, visto que haverá diluição posteriormente.

7.2.2. Descrição do teste de ELISA indireto

As etapas para este teste são:

- 1) adicionar aos orifícios da placa, de 100 a 200 µl da amostra triturada e diluída em tampão de cobertura (pH 9,6);

- 2) incubar a 37°C, por 2 a 3 h, ou a 4°C, por 12 a 18 h. Manter a placa dentro de um saco plástico com papel toalha umedecido;
- 3) esvaziar os orifícios e lavá-los com PBS-tween. Lavar por três vezes deixando a solução nos orifícios por três min., entre cada lavagem;
- 4) adicionar aos orifícios de 100 a 200 µl da imunoglobulina preparada em coelho contra o antígeno testado. A concentração da IgG e do antígeno, devem ser determinadas previamente (item 7.6);
- 5) repetir item 2;
- 6) repetir item 3;
- 7) adicionar aos orifícios, de 100 a 200 µl da solução anti-imunoglobulina, obtida de cabra, conjugada à enzima (Sigma A 8025). A diluição adequada é indicada pelo fabricante;
- 8) repetir item 2;
- 9) repetir item 3;
- 10) adicionar de 100 a 200 µl do substrato aos orifícios;
- 11) aguardar a formação de coloração até a intensidade desejável (absorvância entre 0,3 e 0,8). Marcar o tempo;
- 12) adicionar 40 µl de NaOH 3N aos orifícios; e
- 13) efetuar a leitura em espectrofotômetro.

Diferentes sistemas deste teste são mostrados na Fig. 20.

7.2.2.1. Descrição do teste de ELISA indireto utilizando fração ab

Segundo Koenig & Paul (1982b), a cobertura da placa com anticorpos intactos ou com F(ab')₂, em ELISA indireto, apresentou maior sensibilidade do que o teste de duplo sanduíche. Devido à sua menor reatividade, F(ab')₂ deve ser utilizado em solução mais concentrada do que sua respectiva IgG intacta. Isto exige testes iniciais para estabelecer a melhor concentração. A

descrição, segundo Barbara & Clark (1982) é a seguinte:

- 1) cobrir os orifícios da placa com concentração adequada de $F(ab')_2$ (ver itens 7.6 e 10) diluída em tampão de cobertura (carbonato de sódio, pH 9,6). Incubar a 37°C, por 2 a 4 h;
- 2) lavar a placa e adicionar aos orifícios as amostras diluídas em tampão PBS, contendo 0,5 ml/l de Tween 20 e 2 g/l ovalbumina. Deixar durante a noite, a 4°C;
- 3) lavar a placa e adicionar a IgG específica do antígeno estudado. Incubar a 37°C, por 2 a 4 h;
- 4) lavar a placa e adicionar anti-IgG conjugada a enzima (Sigma A8025). Incubar a 37°C, por 2 a 4 h;
- 5) lavar a placa e adicionar o substrato. Interromper a reação quando houver coloração adequada utilizando NaOH 3N; e
- 6) proceder a leitura de absorvância, ajustando-a em 1,06 à 280 nm.

Em todos os testes, caso sejam observadas reações não específicas, essas podem ser minimizadas cobrindo-se os orifícios com solução de NaCl 0,1 M e 1% de albumina de soro bovino e incubando-se as placas a 37°C, por 1 h. Isto é feito após a lavagem das placas de modo a retirar o excesso de antígeno, adicionado anteriormente.

O diagrama desta técnica é mostrado na Fig. 20.

7.2.2.2. Descrição do teste de ELISA indireto utilizando proteína A.

Este método utiliza a característica da proteína A de se ligar à fração Fc da IgG e não interferir na ligação da IgG com antígenos. A proteína A é isolada a partir da parede celular da bactéria *Staphylococcus aureus*. O peso molecular estimado dessa proteína varia de 42 a 56 Kdal e é estável numa ampla faixa de pH.

Descrito por Edwards & Cooper (1985), este método de ELISA indireto utiliza a proteína A em duas aplicações. Suas vantagens são:

1. o antissoro bruto pode ser utilizado sem necessidade de purificar a IgG;
2. apresenta menor especificidade quando comparado ao ELISA direto;
3. um mesmo conjugado pode ser utilizado com vários antissoros; e
4. é adequado para a quantificação de relações sorológicas entre vírus de um mesmo grupo (Hugues & Thomas 1988, Daniels & Campbell 1992).

A proteína A (Sigma P6031) é dissolvida em água (1 mg/ml), diluindo-se, posteriormente, em tampão cobertura. Os testes de calibração devem considerar diluições de todos os reagentes: proteína A, antissoro e antígeno. A diluição do conjugado é determinada pelo fabricante.

O teste segue as seguintes recomendações:

- 1) cobrir os orifícios da placa com proteína A, diluída em tampão cobertura (1:1000 pode ser adequado). Incubar a placa a 37°C, por 2 h;
- 2) lavar a placa três vezes com PBS-Tween;
- 3) cobrir os orifícios da placa com antissoro (1:1000 pode ser adequado). Incubar a placa a 37°C, por 2 h;
- 4) lavar a placa três vezes com PBS-Tween;
- 5) adicionar o antígeno nos orifícios da placa. Incubar a placa a 37°C, por 2 h;
- 6) lavar a placa três vezes com PBS-Tween;
- 7) cobrir os orifícios da placa com antissoro (1:1000 pode ser adequado). Incubar a placa a 37°C por 2 h;
- 8) lavar a placa três vezes com PBS-Tween;
- 9) adicionar o conjugado (proteína A e enzima). O conjugado a ser utilizado deve estar de acordo com a enzima utilizada: Peroxidase (Sigma P6651) ou Fosfatase alcalina (Sigma 9650). Incubar a placa a 37°C, por 2 h;
- 10) lavar a placa três vezes com PBS-Tween; e

- 11) adicionar o substrato: para fosfatase alcalina utilizar P-nitrofenilfosfato (Sigma 104/105), 1,0 mg/ml; para peroxidase utilizar o-fenilamina diamina (Sigma P 3804), 0,7 mg/ml.

Os tampões para solubilização dos substratos são específicos:

1. substrato o-fenilamina diamina (OFD): Solução de 0,025M de acetato de sódio, pH 5,5. Dissolver a OFD para uma concentração de 0,5 mg/ml. Adicionar H₂O₂ para concentração final de 0,03%(vol) e colocar imediatamente nos orifícios da placa. Deixar reagir por 20 a 30 min., no escuro, à temperatura de 28 a 30°C. A OFD degrada rapidamente. Por isso a solução deve ser preparada no momento de uso. A leitura da absorbância deve utilizar filtro para comprimento de onda de 492 nm;

2. substrato tetrametilbenzidina: segundo Clark & Bar-Joseph (1984), para peroxidase, este substrato é superior a OFD por ser mais estável e ter menor reação não específica. Preparar uma solução estoque de acetato de sódio 1M, pH 5,8 ajustado com ácido cítrico. Preparar uma solução estoque de 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (TMB) (Sigma T 5525) 10 mg/ml, dissolvido em dimetil sulfoxide (Sigma D 8779) e armazenar a 4°C. Diluir 2 ml do tampão concentrado em 20 ml água destilada. Adicionar 2 ml da solução de TMB e 0,02 ml de água oxigenada 6% (para uma concentração final de 0,006%). Colocar imediatamente nos orifícios da placa incubando por 20 a 30 min. Paralisar a reação com 50 µl de H₂SO₄ 3M. Efetuar a leitura com filtro de 450 nm; e

3. substrato p-nitrofenil fosfato (Sigma 104/105): utilizado para a enzima fosfatase alcalina. O tampão é preparado da seguinte maneira: 97 ml de dietanolamina, 800 ml de água. Misturar e ajustar o pH para 9,6 com HCl 1N e completar volume para 1000 ml com água destilada.

As reações são paralisadas com 30 µl de NaOH 3N (fosfatase alcalina) ou de 50 µl de H₂SO₄ 3M (peroxidase).

Uma outra variação desta técnica, com o uso de F(ab')₂, pode ser esquematizada da seguinte forma, subentendendo as etapas de incubação e lavagem:

- 1) cobertura da placa com F(ab')₂;
- 2) adição da amostra;
- 3) adição de IgG;
- 4) adição do conjugado (proteína A ligada à enzima); e
- 5) adição do substrato;

As lavagens e incubações seguem a regra geral, já descrita.

Como não há fração Fc no primeiro anticorpo utilizado para cobrir a placa, a proteína A ligar-se-á apenas à IgG que possui a fração Fc.

7.3. Teste de ELISA utilizando o sistema biotina - avidina

Biotina, também conhecida como vitamina H, é uma pequena molécula com peso molecular de 244 dal. Liga-se, fortemente, à avidina que é uma glicoproteína presente na clara de ovo. A avidina tem peso molecular de 70 Kdal e liga-se à enzima peroxidase ou fosfatase alcalina. A biotina, por sua vez, liga-se à IgG, sendo utilizada com um segundo anticorpo à semelhança do teste de ELISA indireto. Atualmente, diversas empresas têm produzido kits, para pronto uso, utilizando estreptavidina, uma proteína tetramérica purificada de *Streptomyces avidinii* e muito similar à avidina.

Neste método, o primeiro anticorpo liga-se ao antígeno o qual liga-se ao segundo anticorpo biotilado. Quando a avidina, ligada à enzima, é adicionada, liga-se à biotina presente no segundo anticorpo. A enzima age sobre o substrato causando a coloração do meio.

A representação gráfica do efeito amplificador do sistema avidina-biotina pode ser visualizado na Fig. 21. Cada molécula do antígeno liga-se a um anticorpo que possui, ainda, outros sítios de ligação que, por sua vez, se ligarão a outras moléculas do segundo anticorpo ao qual está ligado a biotina. Assim, cada molécula do antígeno será detectada por várias moléculas do segundo anticorpo, aumentando a sensibilidade do teste.

As IgG, ligadas à biotina, são comercialmente disponíveis nos representantes da Sigma, Bio-Rad e Boehringer-Mannheim (Anexo IX).

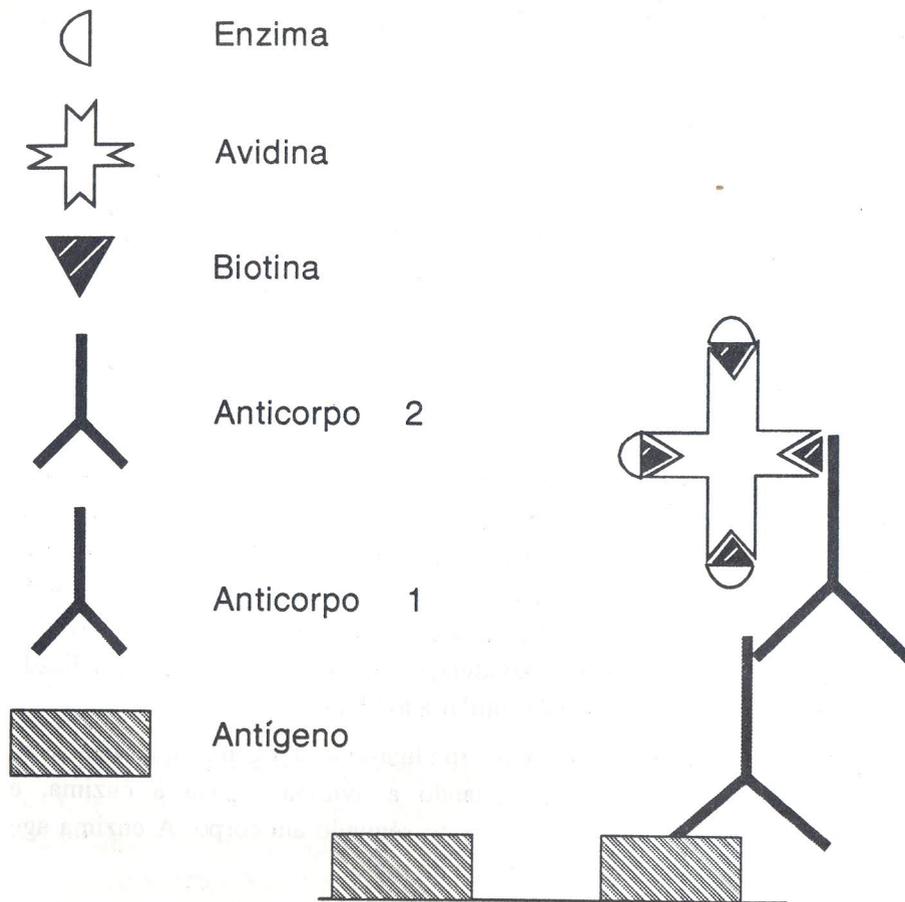


Fig. 21. Diagrama do efeito amplificador do sistema biotina-avidina, em testes de ELISA.

7.4. Dot-ELISA

O uso do teste de ELISA, em placas de poliestireno, foi logo adaptado para outros materiais como polivinil ou membranas de nitrocelulose ou náilon (Batteiger et al. 1982, Hawkes et al. 1982). O polivinil apresenta a desvantagem de induzir maior reação não específica do que o poliestireno.

As membranas de náilon têm mais capacidade de ligação do que as de nitrocelulose. Segundo Gersoni & Palade (1983), as membranas de náilon retêm cerca de 480 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de proteína enquanto que as membranas de nitrocelulose retêm apenas 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Além disso, membranas de náilon são hidrofóbicas e apresentam maior resistência ao manuseio e aos solventes orgânicos.

Basicamente, o sistema funciona como no ELISA indireto, com a vantagem de não necessitar da leitora de placas. No entanto, não permite avaliações quantitativas. O antígeno é colocado na membrana utilizando-se um molde de plástico que prensa a membrana e direciona a posição dos orifícios onde é colocado o antígeno (Fig. 22). A seguir, faz-se um bloqueio dos sítios da membrana, não ocupados pelo antígeno, adicionando-se, posteriormente, a IgG. Uma anti-IgG conjugada à enzima é finalmente adicionada. Ao se colocar a membrana sob uma solução de substrato apropriado, as manchas decorrentes da reação positiva são visualizadas. Segundo Berger et al. (1985), este método permite detectar até 0,5 ng de vírus em uma preparação purificada.

Banttari & Goodwin (1985), utilizaram a membrana de nitrocelulose, como suporte físico, no método de ELISA duplo sanduíche. A modificação do método, feita por Pereira (1985)³ é a seguinte:

1. imergir a membrana de nitrocelulose (0,45 μm) em água destilada;
2. imergir a membrana com IgG, diluída em tampão cobertura, incubando-se por 4 h, à temperatura ambiente;
3. lavar com tampão TH (Tris-HCl 0,01M, NaCl 0,9%, Tween 80 0,05%, pH 7,4) por 30 min.;

³ Comunicação pessoal da Dra. Ana Maria N. Pereira, prof. da Escola de Agronomia de Evora, Portugal, para Álvaro M. R. Almeida, EMBRAPA-CNPSO, em 1985.

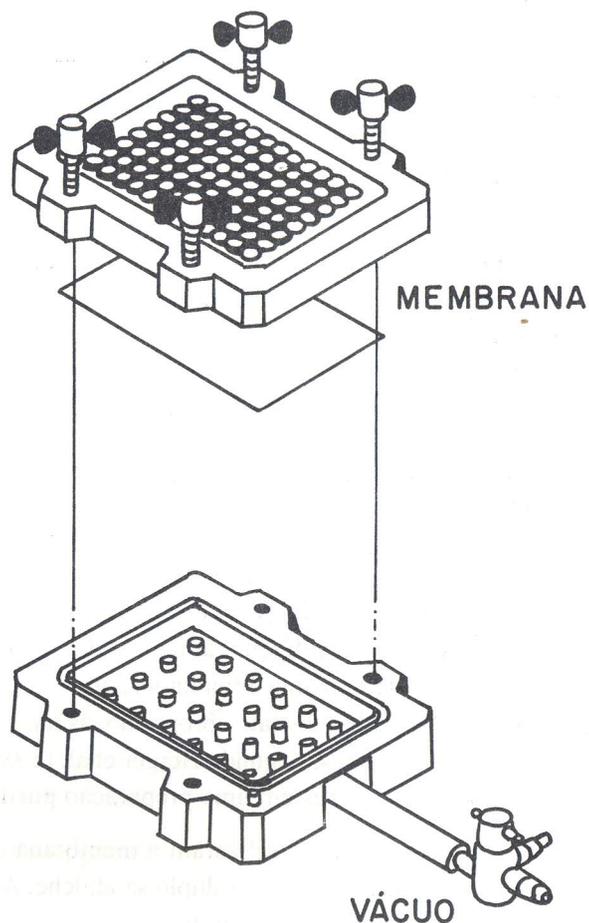


Fig. 22. Modelo de equipamento, em acrílico, utilizado para a técnica Dot-ELISA. A membrana de nitrocelulose fica prensada entre as placas de acrílico (1 cm espessura).

4. imergir a membrana em solução bloqueadora (3% albumina de soro bovino diluída em tampão TH). Incubar por 1 a 2 h, a 37°C. Para membranas de náilon deve-se aumentar a concentração da albumina bovina (10%) e também o tempo de incubação (12 a 16 h). Outro sistema de solução bloqueadora utiliza leite em pó desnatado;
5. colocar a membrana sobre papel de filtro (Whatman N° 1), do mesmo tamanho, previamente saturado com tampão TH e, em seguida, adaptar no molde plástico;
6. aplicar amostras de 10 a 100 µl em cada orifício do molde. No caso de não se dispor do molde, colocar 2 a 10 µl das amostras com micropipeta, espaçadas em 5 mm;
7. incubar durante a noite, a 4°C, em câmara úmida;
8. retirar a membrana do molde e lavar cinco vezes com água destilada. Em seguida, lavar com tampão TH, contendo 2% Triton X-100 e mais quatro vezes em tampão TH;
9. imergir a membrana no conjugado, cuja diluição foi estabelecida anteriormente. Incubar à temperatura ambiente, por 4 h, sob leve agitação;
10. lavar cinco vezes em tampão TH (30 min. cada lavagem);
11. imergir a membrana no substrato e, no caso de utilizar a enzima fosfatase alcalina no conjugado, usar solução 1:1 de "naphtol AS-MX phosphate" (Sigma N 4875); 0,1% em 0,2M Tris-HCl, pH 8,2 e "Fast red TR salt" (Sigma F8764); 6mg/ml em 0,2. M Tris-HCl, pH 8,2. A Sigma comercializa também a solução pronta (Sigma F4648). A solução de "fast red" deve ser filtrada em papel de filtro Whatman N°1 antes de ser utilizada; e
12. a reação é, geralmente, adequada entre 30 min. e 1 h. Paralisar a reação, lavando a membrana com água deionizada. Depois de seca, a membrana deve ser guardada em local escuro para evitar perda de cor.

Uma outra variação de Dot ELISA, denominado Dot ELISA indireto foi descrito por Hsu et al. (1990) e tem apresentado bons resultados no diagnóstico de sementes de soja infectadas pelo vírus do mosaico comum da soja. O extrato

das sementes é obtido triturando as mesmas em tampão de extração com 0,2% Triton X-100.

Neste caso, seguem-se os seguintes passos:

- 1) imergir a membrana em tampão TBS: solução salina (0,15M), Tris-HCl (0,05 M), pH 7,5;
- 2) dispor uma alíquota de 10 a 50 µl de extrato vegetal em cada orifício, sobre a membrana, utilizando equipamento de acrílico. Com micropipeta, dispor de 10 a 50 µl das amostras, espaçadas de 5 mm;
- 3) deixar secar por 5 a 10 min. à temperatura ambiente;
- 4) imergir a membrana em solução bloqueadora contendo TBS, 0,05% de Tween 20, 2% de PVP 20000 e 2% albumina de soro bovino. Incubar por 30 a 60 min. à temperatura ambiente;
- 5) transferir para solução contendo IgG específica diluída conforme testes preliminares. Incubar por 1 a 2 h, sob leve agitação, à temperatura ambiente;
- 6) lavar a membrana em água destilada. Lavar em solução TBS com Tween 20, a 0,05%, quatro vezes, em 30 min., com leve agitação;
- 7) incubar a membrana em uma solução contendo um segundo anticorpo conjugado à enzima, diluído conforme recomendação do fabricante ou conforme resultados preliminares, por 60 min.;
- 8) lavar a membrana conforme descrito no item 6; e
- 9) incubar a membrana no substrato específico por 15 a 30 min.. Deverá surgir coloração. Secar a membrana e guardar no escuro.

Em ambos os testes, caso se utilize peroxidase, o substrato adequado é preparado da seguinte maneira:

- 1) solução A: 0,5 mg de 4-cloronaftol dissolvido em 1 ml de tampão TBS;
- 2) solução B: misturar 60 µl de H₂O₂ (água oxigenada a 30%) congelada, em 100 ml de TBS;
- 3) misturar as duas soluções e usar imediatamente; e

- 4) após coloração da membrana, lavá-la em tampão Tris-HCl 0,01M, contendo EDTA 0,05M, pH 7,5.

7.5. Utilização do teste de Elisa na detecção de fitopatógenos

7.5.1. Fungos

Os métodos imunológicos têm sido utilizados na detecção de fungos nas sementes e em outros órgãos de propagação vegetativa. Johnson et al. (1982), utilizaram o teste de ELISA para detecção de *Epichloe typhina* em festuca (*Festuca* sp. L.) demonstrando a rapidez e a eficiência do método.

Gleason et al. (1987), demonstraram que um mínimo de 250 ng de micélio de *Phomopsis longicolla*, liofilizado, foi detectado pelo teste de ELISA indireto. O antissoro reagiu também com preparações de *Diaporthe phaseolorum* var. *sojae* e *D. p.* var. *caulivora* mas não reagiu contra sete outros patógenos de sementes de soja.

Outro exemplo da utilização do teste de ELISA para caracterização de isolados de fungos é descrito por Kitagawa et al. (1989). Esses autores, trabalhando com um antissoro preparado contra um isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, denominado F504, conseguiram, através de alterações na metodologia do teste, reduzir as reações cruzadas com nove isolados de *Fusarium*, além de não detectar qualquer reação com outras espécies de fungos estudados.

7.5.2. Bactérias

Similarmente aos fungos, as técnicas sorológicas são ferramentas de grande utilidade no diagnóstico de bactérias fitopatogênicas. Entretanto, devido à complexidade das células bacterianas, com grande número de determinantes antigênicos, há enorme dificuldade para produzir anticorpos policlonais com alta especificidade. Malin et al. (1985), procuraram estabelecer condições para detectar *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, em sementes de feijão, as quais

são fonte de inóculo primário desse patógeno. Os autores utilizaram os testes de ELISA e Dot-ELISA e concluíram que o Dot-ELISA foi o mais adequado para a diagnose dessa bactéria nas sementes de feijão.

Thaveechai & Schaad (1986) demonstraram que as membranas protéicas de 35 isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, isolados com cloreto de lítio e utilizadas para produção de antissoro, permitiram separar essa bactéria de outras espécies, embora as reações cruzadas entre os isolados da mesma espécie não fossem eliminadas.

Com o advento dos anticorpos monoclonais, as reações cruzadas foram eliminadas ou reduzidas. Desta forma, o teste de ELISA e suas diversas variações têm sido de grande valia na diagnose e na taxonomia de bactérias (Permar & Gottwald 1989). Esses mesmos autores desenvolveram anticorpos monoclonais capazes de diagnosticar a infecção causada por um isolado de *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, específico de laranjais da Flórida (EUA).

Recentemente, Rott et al. (1994) conseguiram separar tres serovares de *Xanthomonas albilineans*, a partir de 215 isolados, utilizando três antissoros e as técnicas de ELISA, imunofluorescência e Dot-ELISA.

7.6. Determinação da concentração ideal dos reagentes

O primeiro passo para utilização do teste de ELISA, é estimar a concentração ideal dos reagentes empregados: antígeno, imunoglobulina e conjugado. Segundo Clark e Bar-Joseph (1984), as concentrações ótimas são aquelas que maximizam as diferenças entre os valores do controle e os menores valores da amostra infectada. Resumidamente, procura-se maximizar a proporção positivo: negativo (P/N). Isto é obtido a partir de diluições dos reagentes. Na Fig. 23 é mostrado um exemplo da combinação de diluições de IgG, conjugado e antígeno, para ELISA direto, tipo duplo sanduíche. O mesmo esquema pode ser utilizado no ELISA indireto. Nesse caso, utiliza-se a diluição do conjugado (anti-IgG) determinada pelo fabricante. Pode haver casos em que é necessário titular o conjugado.

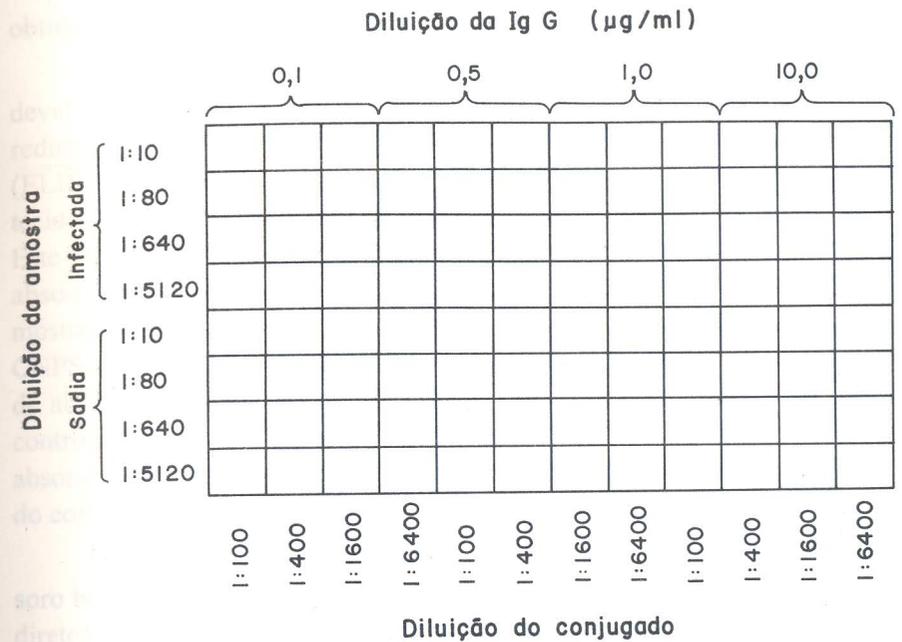


Fig. 23. Esquema de microplaca para calibração das concentrações ótimas de Ig, conjugado e amostras infectadas e sadias, utilizando o teste de ELISA direto, tipo sanduíche duplo.

A calibração do antissoro (IgG), geralmente, fornece uma curva de absorbância do tipo sigmóide (Barbara & Clark 1982, Clark & Bar-Joseph 1984), conforme ilustrado na Fig. 24.

Na região do platô, os valores obtidos não dependem apenas da interação entre antígeno e anticorpo, mas de outros fatores como competição intermolecular e saturação dos sítios de ligação. A região de resposta linear é a mais utilizada, visto que pequenas variações na concentração do antígeno refletem grandes variações nos valores de absorbância. A região de resposta proporcional pode ser utilizada quando não se estabelece, convenientemente, os parâmetros anteriores.

É importante considerar que, ao promover combinações de diluições do antígeno, imunoglobulina e conjugado, procura-se verificar as concentrações que produzam maior relação P/N.

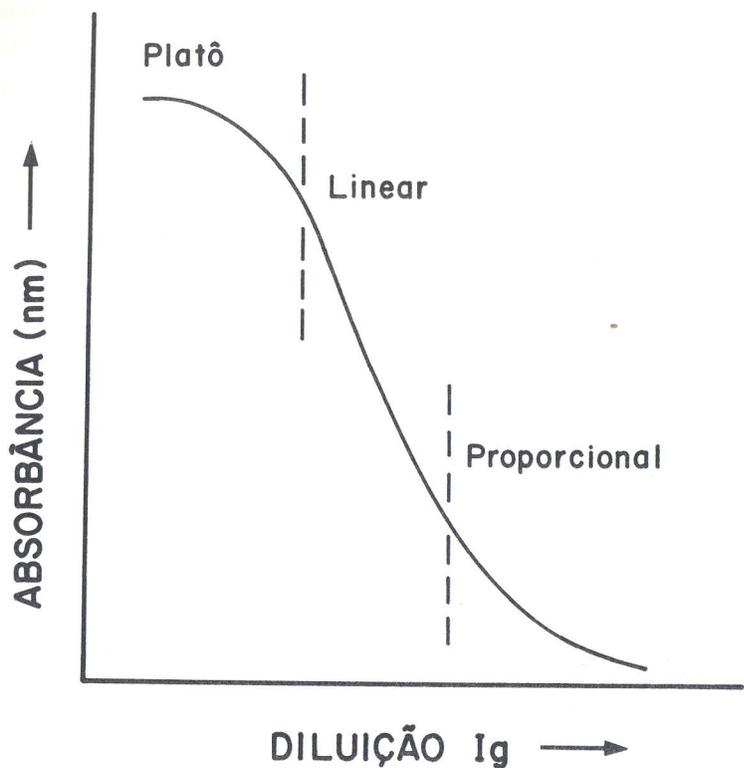


Fig. 24. Exemplo de curva obtida na calibração do teste de ELISA.

As diluições de cada reagente são feitas no mesmo tampão. Entretanto, são utilizados tampões diferentes para cada reagente. Geralmente, o tecido infectado ou sadio é macerado em tampão cobertura (ELISA indireto) ou PBS (ELISA direto sanduíche duplo). A imunoglobulina é diluída em tampão cobertura (ELISA direto sanduíche duplo) ou PBS (ELISA indireto) e o conjugado, em PBS. É necessário realizar estudos prévios para estabelecer os melhores tampões, bem como outros antígenos, para alguns vírus. No CNPSo, em trabalhos com vírus de soja, baculovírus e fungos bons resultados têm sido

obtidos com os tampões comumente citados.

Às vezes, são observadas reações não específicas com o tecido sadio devido à presença de anticorpos para proteína vegetal. Essas reações podem ser reduzidas quando o conjugado (ELISA direto) ou a imunoglobulina-IgG (ELISA indireto) são tratados com solução de PBS, contendo o filtrado do tecido sadio macerado (1g tecido sadio/ 9 ml PBS) e incubados por 3 h, a 37°C. Este procedimento reduz, sensivelmente, as reações não específicas, através da absorção das proteínas do tecido vegetal, presentes na amostra. Na Fig. 25 é mostrado o exemplo da curva de calibração obtida com antissoro produzido no CNPSo, contra o vírus do mosaico severo do caupi, isolado de soja. Os valores de absorbância, obtidos com ELISA indireto, mostraram que os valores do controle reduzem a relação P/N e mascaram as conclusões. No entanto, ao se absorver a IgG com tecido de caupi sadio, houve sensível declínio nos valores do controle.

Outra possibilidade, para reduzir essas reações, é adicionar albumina de soro bovino (3,0%) à solução de PBS, antes da adição do conjugado (ELISA direto) ou da imunoglobulina (ELISA indireto) e incubar durante a noite, a 4°C ou 1 h e 30 min., a 37°C, seguindo após a lavagem, com a adição do conjugado e, posteriormente, do substrato.

Quando, na execução do teste, aparecer reação positiva com o controle, três problemas podem ter ocorrido:

1. o antígeno utilizado contém determinantes antigênicos detectados pelo conjugado;
2. o antígeno foi utilizado em alta concentração, causando ligação não específica com o conjugado; e
3. o antígeno foi utilizado em baixa concentração, não havendo cobertura eficiente da placa, deixando espaços que serão preenchidos pelo conjugado.

A titulação dos reagentes, especialmente do conjugado, pode resolver o problema.

A utilização eficiente deste teste requer, inicialmente, que se estabeleça as concentrações adequadas dos reagentes utilizados: imunoglobulina G, antígeno e conjugado.

Um exemplo de ficha para anotação dos valores de absorbância observados em microplacas, no teste de ELISA, é mostrado no Anexo X.

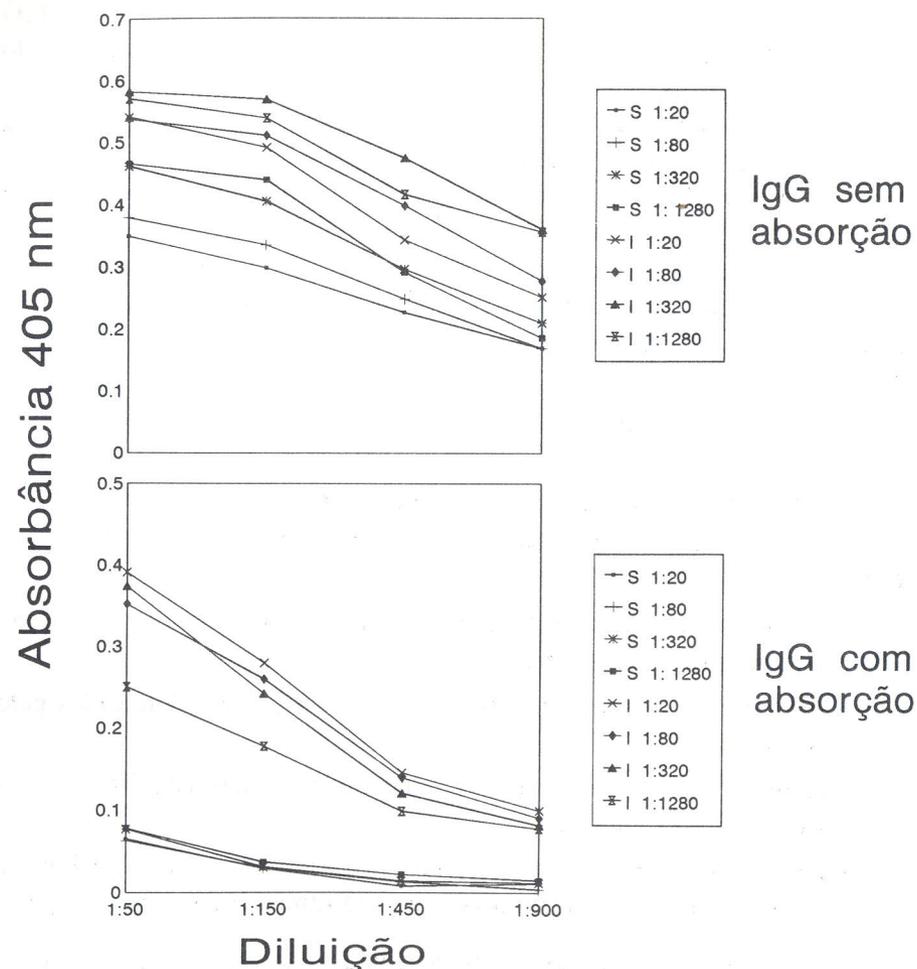


Fig. 25. Curva de calibração do teste de ELISA indireto, utilizando diferentes diluições de IgG contra o vírus do mosaico severo do caupi, com e sem absorção por tecido sadio. I = tecido infectado; S = tecido sadio. Conjugado de fosfatase alcalina produzido em cabra e utilizado na diluição de 1:5000.

8. Purificação da imunoglobulina

Embora nos métodos sorológicos comumente utilizados (precipitina, difusão em gel, etc.) seja empregado o antissoro clarificado, obtido diretamente dos animais imunizados, para ELISA é necessário proceder à purificação da imunoglobulina, para eliminar contaminantes como albuminas e lipídios. Segundo Tijessen (1985), as vantagens de utilizar imunoglobulina (Ig) pura são: 1) a quantidade de enzima necessária para conjugar determinada quantidade de Ig é reduzida cerca de dez vezes; 2) há grande redução na coloração induzida por reação não específica ("background"); e 3) maior quantidade de Ig pode ser imobilizada no suporte físico (placa ou membrana) aumentando, assim, a capacidade de detecção do método.

Normalmente, o método de purificação utilizado combina o uso de sulfato de amônio e cromatografia em coluna de troca iônica.

8.1. Purificação com sulfato de amônia

É o método mais comumente utilizado para purificar imunoglobulina, a partir de antissoro recém-coletado. O sulfato de amônio precipita as globulinas enquanto as albuminas permanecem em solução. Os lipídios, presentes no antissoro, são considerados contaminantes e não são separados por este método.

Etapas do processo:

- 1) adicionar 8 ml de água destilada a 2 ml de antissoro;
- 2) adicionar 10 ml de solução saturada de sulfato de amônio, por gotejamento e sob agitação constante;
- 3) deixar em repouso por 30 a 60 min., à temperatura ambiente;
- 4) centrifugar a 8.000 g por 10 min. e coletar o precipitado;
- 5) dissolver o precipitado em 2ml de PBS 50%; Repetir os itens 1 até 5;
- 6) dialisar três vezes (1 litro de PBS 50%, por vez), num intervalo de 18 h, com agitação, à temperatura de 5 a 8°C;

- 7) centrifugar a 3.000 g, por 10 min. Coletar o sobrenadante;
- 8) determinar a concentração de Ig em espectrofotômetro, a 280 nm e diluir de modo a obter absorvância de 1,4 (equivalente a 1 mg proteína/ml); e
- 9) filtrar (filtro 0,2 µm), adicionar 0,04% de azida de sódio (NaN₃), para prevenir contaminações com microorganismos e armazenar a 4°C.

8.2. Purificação adicional por cromatografia de coluna de troca iônica

Quando se fizer necessário um alto grau de pureza, a imunoglobulina pode ser purificada através da cromatografia com DEAE-celulose ("anion-exchanger"), de acordo com as seguintes etapas:

- 1) utilizar, como coluna, uma pipeta de 10 ml ou seringa de vidro de 10 ml;
- 2) utilizar algodão como retentor;
- 3) a coluna deve ter cerca de 8 cm de altura e 1,2 a 1,4 cm de diâmetro;
- 4) preparar a coluna com DEAE celulose, hidratada de acordo com as instruções do fabricante. Algumas marcas disponíveis são: DEAE-Sephadex A-50, da Pharmacia e Cellex D, da BIO-RAD;
- 5) lavar a coluna, várias vezes, com PBS (50%) até que o pH do efluente seja igual ao pH do PBS adicionado. Não deixar que o nível do eluente na coluna baixe além da superfície da DEAE celulose;
- 6) aplicar, na superfície da coluna, 2 ml da solução de Ig purificada anteriormente com sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄. Utilizar PBS (50%) como eluente (lavagem da coluna), por gotejamento;
- 7) coletar as frações (1 ml) do eluente em tubos de 5 ml (15 a 20 tubos);
- 8) medir a densidade ótica, a 280 nm, em espectrofotômetro e juntar as frações com leitura superior a 0,8 (absorvância); e
- 9) A solução de IgG obtida deve ser diluída com PBS (50%) até que se obtenha absorvância igual a 1,4 (equivalente a 1 mg/proteína por ml).

9. Preparo do conjugado

9.1 Conjugado IgG - fosfatase alcalina

O processo segue a seguinte ordem:

- 1) misturar 10 mg de Ig purificada com 1 ml (5 mg) da enzima fosfatase alcalina (Sigma VII-NT);
- 2) adicionar, vagarosamente e sob agitação (5 min.), glutaraldeído (solução 10%, recém preparada) para a concentração final de 0,06%. A solução de glutaraldeído 10% pode ser conservada em frasco escuro, a 4°C, por até dois meses;
- 3) deixar em temperatura ambiente por 1 a 3 h. Uma coloração palha poderá, ou não, desenvolver-se;
- 4) dialisar quatro vezes, com 500 ml PBS por vez, a 4°C, sob agitação, durante 18 h para remover o glutaraldeído. Na primeira diálise adicionar 0,05% de NaN₃ ao PBS; e
- 5) adicionar igual volume de solução de albumina bovina (10 mg/ml) e armazenar a 4 a 6°C. Caso não tenha sido utilizado azida de sódio (0,03%), na purificação da IgG, deve-se fazê-lo agora para conservar o conjugado.

9.2 Conjugado IgG - peroxidase, segundo Mackenzie (1990)

As etapas do processo são:

1. dissolver 5mg de peroxidase em 1,25 ml de tampão acetato de sódio 0,01M, pH 7,5;
2. adicionar 0,25 ml de periodato de sódio (NaIO₄) 0,1M, deixando no escuro, por 1h, à temperatura ambiente;

3. dialisar três vezes em tampão acetato de sódio 0,001M, pH 4,5, por 12 a 16 h, à 4°C;
4. adicionar 2mg de IgG, dissolvida em 0,2 ml de tampão carbonato de sódio 0,2 M, pH 9,5. Manter por 2 a 3 h, à temperatura ambiente, com leve agitação;
5. adicionar 0,25 ml de borohidrato de sódio (NaBH₄) (4 mg/ml) e deixar a 4°C, por 3h ou durante uma noite. Alternativamente, pode-se usar 0,25 ml de ácido ascórbico (5mg/ml); e
6. dialisar três vezes com PBS, por 16 h, a 4°C.

10. Preparação de F(ab')₂, segundo Converse & Martin (1990).

Proceder da seguinte forma:

- 1) dialisar 2 mg de IgG por 16 a 18 h, a 4°C, mudando o tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 4, por três vezes, utilizando um volume total de 1500 ml;
- 2) preparar a solução estoque de pepsina (1 mg/ml). Adicionar 90 µl à solução de IgG;
- 3) incubar 16 a 18 h, a 37°C;
- 4) dialisar por 12 a 18 h, a 4°C, com três trocas de tampão PBS, num total de 1500 ml;
- 5) ajustar a concentração de F(ab')₂ para 1 mg/ml utilizando o valor de absorvância de 1,06 (280 nm);
- 6) adicionar azida de sódio na concentração final de 0,02% e armazenar a 4°C; e
- 7) determinar a concentração ótima através do método descrito no item 7.6, para ser utilizado como anticorpo de captura nos testes de ELISA.

11. Soluções tamponantes utilizadas no teste de ELISA

1. Solução de PBS (pH 7,4) - Preparação para 1 l

- 8,0 g NaCl
- 0,2g KH₂PO₄
- 2,9g Na₂HPO₄.12H₂O
- 0,2g KCl

Solubilizar os reagentes em água destilada e em seguida completar o volume com água destilada para 1 l. Determinar o pH da solução final.

É conveniente preparar solução estoque, concentrada dez vezes e diluir quando necessário. A solução estoque apresentará o pH menor que 7,4.

2. Solução de PBS-Tween 0,05%

- 0,5 ml Tween 20 e solução de PBS (0,05%)

3. Tampão de cobertura (pH 9,6) (manter em refrigerador)

- 1,59g Na₂CO₃
- 2,93g NaHCO₃

Solubilizar os reagentes em água destilada e, em seguida, completar o volume com água destilada para 1 l.

4. Tampão de extração

- 1 l PBS-Tween 20 e 2% PVP (20 g/l)
- PVP = polivinilpirrolidona solúvel PM 40.000

O PVP reduz a interferência dos fenóis e taninos, que ocorrem nas plantas e são liberados durante a trituração. Em algumas espécies vegetais,

esses compostos ocorrem em baixa concentração e o PVP não é utilizado (ex. soja).

5. Tampão conjugado (manter em refrigerador)

- 1 l de PBS-Tween 20, 2% de PVP e 0,2% de ovoalbumina

6. Tampão do substrato (pH 9,8) para fosfatase alcalina (Conservar em refrigerador)

- 97 ml dietanolamina
- 0,2g NaN_3
- 800 ml H_2O

Solubilizar a dietanolamina em 800 ml de água destilada e ajustar o pH em 9,8 com HCl 1N concentrado. Adicionar água destilada, completando o volume para 1 l.

A partir deste ponto, inicia-se a calibração dos reagentes a serem utilizados, determinando as concentrações ótimas dos mesmos.

12. Interpretação dos resultados de ELISA

Uma das dificuldades na diagnose das amostras de plantas supostamente infectadas, através do método de ELISA, está no momento de decidir se os valores de absorbância obtidos são, realmente, diferentes daqueles obtidos com a amostra sadia (controle). Isto foi observado por Sutula et al. (1986), durante o estabelecimento de níveis divisores entre reações positivas e negativas.

O ideal seria que os valores de absorbância das amostras analisadas fossem distribuídas como é mostrado na Fig. 26. Entretanto, é comum encontrar valores distribuídos, como ilustrado na Fig. 27, onde os valores obtidos para amostras de tecidos de soja, infectados com o vírus do mosaico comum da soja, são iguais ou ligeiramente superiores àqueles obtidos com tecidos sadios. Se considerarmos esses valores (amostras 5, 8, 10, 16 e 17), na

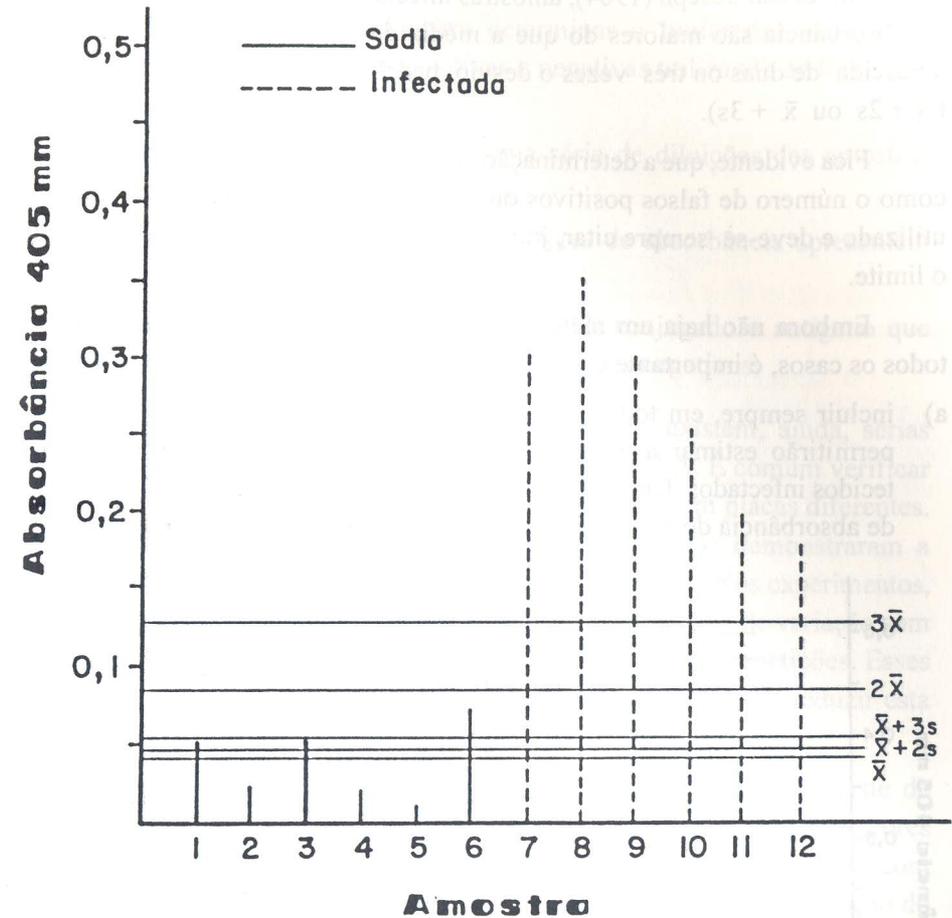


Fig. 26. Resultado do teste de ELISA, obtidos com sementes de soja infectadas pelo vírus do mosaico comum da soja.

diagnose, como negativos, configurar-se-á resultado falso negativo, visto que os extratos dessas amostras, foram infectivos, quando inoculadas mecanicamente em plântulas de soja.

Para determinar o valor de absorbância limite, que permite diagnosticar amostras infectadas e sadias, várias sugestões têm sido apresentadas. De acordo

com Clark & Bar-Joseph (1984), amostras infectadas são aquelas cujos valores de absorvância são maiores do que a média das absorvâncias do controle, acrescida de duas ou três vezes o desvio padrão calculado para o controle ($\bar{x} + 2s$ ou $\bar{x} + 3s$).

Fica evidente, que a determinação do limite na diagnose por ELISA, bem como o número de falsos positivos ou falsos negativos, depende do método utilizado e deve-se sempre citar, junto aos resultados, como foi estabelecido o limite.

Embora não haja um método exclusivo, que possa ser utilizado para todos os casos, é importante considerar alguns pontos:

- a) incluir sempre, em todos os testes, dez amostras de tecidos sadios, que permitirão estimar a média e o desvio padrão para comparação com tecidos infectados. Um bom conhecimento prévio da variação dos valores de absorvância do controle, auxilia na interpretação dos resultados;

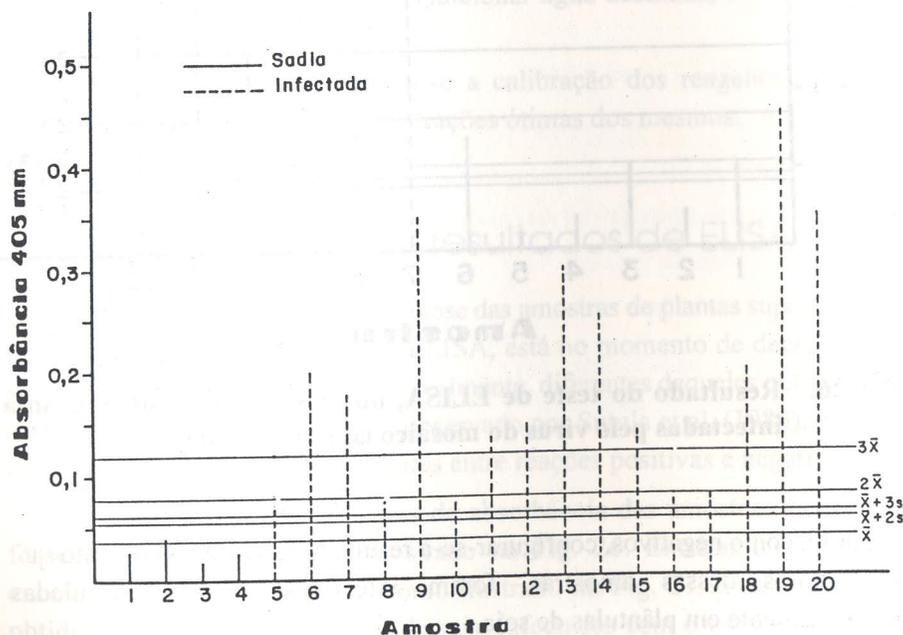


Fig. 27. Resultado do teste de ELISA indireto, obtido com sementes de soja infectadas pelo vírus do mosaico comum da soja.

- b) estabelecer qual o método para determinar o limite dos valores de absorvância entre amostras positivas e negativas utilizando as fórmulas: $\bar{x} + 2s$; $\bar{x} + 3s$; $2\bar{x}$, $3\bar{x}$, etc.;
- c) incluir sempre, em cada análise, uma série de diluições das amostras sadias e infectadas;
- d) repetir o teste para amostras cujos valores de absorvância apresentem dificuldades de diagnóstico; e
- e) determinar as diluições adequadas de IgG, conjugado e antígeno que permitam eliminar os falsos positivos ou falsos negativos.

Embora todas estas observações sejam úteis, existem, ainda, sérias dificuldades na análise dos resultados obtidos por ELISA. É comum verificar variações entre repetições, tanto na mesma placa quanto em placas diferentes. Em artigo publicado recentemente Bauske et al. (1994) demonstraram a necessidade de utilizar delineamento estatístico apropriado. Nos experimentos, as médias para o mesmo tratamento apresentavam coeficiente de variação com valores entre 3,8% e 20,3%, o que sugere variação entre as repetições. Esses autores sugeriram o uso de blocos casualizados como forma de reduzir esta variação. No CNPSo, variações de até 20%, têm sido detectadas.

A quantificação do teor de um determinado antígeno, pelo teste de ELISA, em uma amostra, requer a obtenção de uma curva padrão com teores conhecidos do antígeno e respectivos valores de absorvância. Segue-se com a obtenção da equação de regressão, que permitirá estimar a concentração do antígeno, na amostra estudada.

Um modelo de ficha, para anotação dos valores das absorvâncias detectados em microplacas de ELISA, é mostrado no Anexo X.

13. Anticorpos Monoclonais (AMC)

Como a "superfície" das proteínas (ou outros imunógenos) possui diversos determinantes antigênicos (ou epítomos), fica claro que a resposta imunológica não produzirá apenas um, mas diversos anticorpos, contra cada

epitopo presente no imunógeno. Porisso, é denominado antissoro policlonal. Esse antissoro possui, portanto, vários anticorpos que apresentam diferentes graus de afinidade para com seus respectivos antígenos. É possível até, que determinado anticorpo tenha maior afinidade para com um antígeno diferente daquele que lhe deu origem.

A partir do trabalho de Kohler & Milstein (1975), utilizando o método de hibridização de células somáticas, foi possível produzir, separadamente, um anticorpo específico para um único epitopo. A este anticorpo deu-se o nome de anticorpo monoclonal.

A técnica baseia-se na fusão do linfócito B (produtor de anticorpos) com uma célula cancerosa (mieloma), induzindo, assim, a multiplicação desordenada dos linfócitos B. Dessa forma, é possível manter, indefinidamente, "in vitro" esse linfócito que irá produzir um único "tipo" de anticorpo.

Os anticorpos monoclonais são extremamente importantes nos estudos de taxonomia viral, nos estudos epidemiológicos com diferentes isolados geográficos de fungos (Ferguson et al. 1987), bactérias (Yuen et al. 1987) e vírus (Nutter et al. 1993) e na análise de epitopos presentes em proteínas capsidiais. São utilizados, também, na identificação de viroses de difícil purificação, com baixa concentração viral e onde a produção de anticorpos policlonais é de difícil obtenção (Sander & Dietzgen 1984). Neste caso, devido ao seu tamanho, os camundongos utilizados na produção de AMc requerem pequenas doses de imunógeno para sua sensibilização, em comparação com coelhos.

É importante ressaltar que os AMc são específicos para determinados epitopos e não específicos para um determinado vírus. Na verdade, esta propriedade tem sido explorada por diversos pesquisadores, permitindo separar vírus muito relacionados (Porta et al. 1989). No entanto, para avaliação do relacionamento entre diversos isolados, deve-se utilizar anticorpos policlonais. Outro problema, levantado por Dore et al. (1988) refere-se às alterações estruturais que as partículas virais podem sofrer nos testes de ELISA. Como o tampão cobertura tem pH 9,6, pode causar mudanças na estrutura das proteínas, impedindo a ação de AMc que não reconhecerá o novo epitopo (neotopo). Culver & Sherwood (1988), referindo-se à detecção de vírus em sementes, demonstraram que o teste de ELISA indireto, utilizando AMc, foi mais

sensível do que o teste indireto e ELISA sanduíche duplo, com anticorpos policlonais. A grande vantagem do uso de AMc é sua reprodutibilidade, devido à interminável disponibilidade de AMc.

Muitos AMc não precipitam antígenos virais, em teste de dupla difusão em ágar, tornando o seu uso limitado nestes testes.

13.1. Produção de anticorpos monoclonais

13.1.1. Imunização de ratos

Os ratos das linhagens BALB/c ou STU foram, geneticamente, "melhorados" para produzir grandes quantidades de anticorpos e, porisso, são usados nesses trabalhos. Os ratos, com dois a quatro meses de idade, são imunizados com antígeno cuja concentração variava de 60 µg até 6 mg. A primeira imunização é feita com adjuvante completo de Freund via subcutânea ou intraperitonealmente (Wieczorek et al. 1984). Para aumentar o título, sugere-se outra injeção via intraperitoneal ou intravenosa com adjuvante incompleto quatro dias antes da extração do baço. O baço extraído será macerado e passado por peneira de 75 mesh. As células resultantes devem ser mantidas em tampão apropriado.

13.1.2. Fusão de células

As células de mieloma, utilizadas nesse tipo de trabalho, não produzem anticorpos ou não secretam anticorpos. Há várias linhagens disponíveis para aquisição no comércio. A fusão entre as células de mieloma e linfócitos B, extraídos do baço dos ratos, se dá pelo uso de PEG (polietileno glicol PM 6000). Normalmente utiliza-se 1,5 ml PEG 40% por 10⁸ células. A mistura, em tampão apropriado, é colocada nos orifícios de placas de poliestireno, apropriadas, contendo o meio designado HAT. Nesse meio, apenas as células fundidas (agora designadas hibridomas) desenvolver-se-ão. (Fig. 28 e 29).

13.1.3. Clonagem

Após três semanas, as células que se multiplicarem no meio HAT serão produtoras de anticorpos contra o antígeno utilizado na imunização dos ratos. Neste ponto, testa-se por ELISA para verificar qual dos orifícios contém hibridomas (ELISA positivo). Os orifícios com reação positiva são utilizados, isoladamente, para a diluição máxima dos hibridomas, a fim de obter um único hibridoma, separado da mistura, de cada orifício original. Este procedimento é repetido por duas a três vezes. Deste modo, obtém-se um único hibridoma, produzindo o anticorpo de interesse. Ao final do trabalho, tem-se diversos hibridomas iguais e outros que sintetizam diferentes anticorpos, obtendo-se, assim, vários AMc. Este procedimento, entretanto, requer avaliações adicionais. Assim sendo, caso já existam isolados de um mesmo vírus que apresentem alguma variabilidade quanto ao aspecto sorológico, esses poderão ser utilizados para a separação dos AMc. Em outros casos, pode-se utilizar uma proteína conhecida que, após hidrólise com certas proteases, serão testadas com os vários AMc obtidos. Segundo Clausen (1988), os AMc, à semelhança de anticorpos produzidos em ovos de galinha, apresentam reduzida precipitação em testes de difusão em agarose e, portanto, não são indicados para esses testes. Esquemas desse método podem ser vistos nas Fig. 28 e 29.

Uma descrição mais detalhada sobre a produção de anticorpos através de clonagem é fornecida por Jordan (1990).

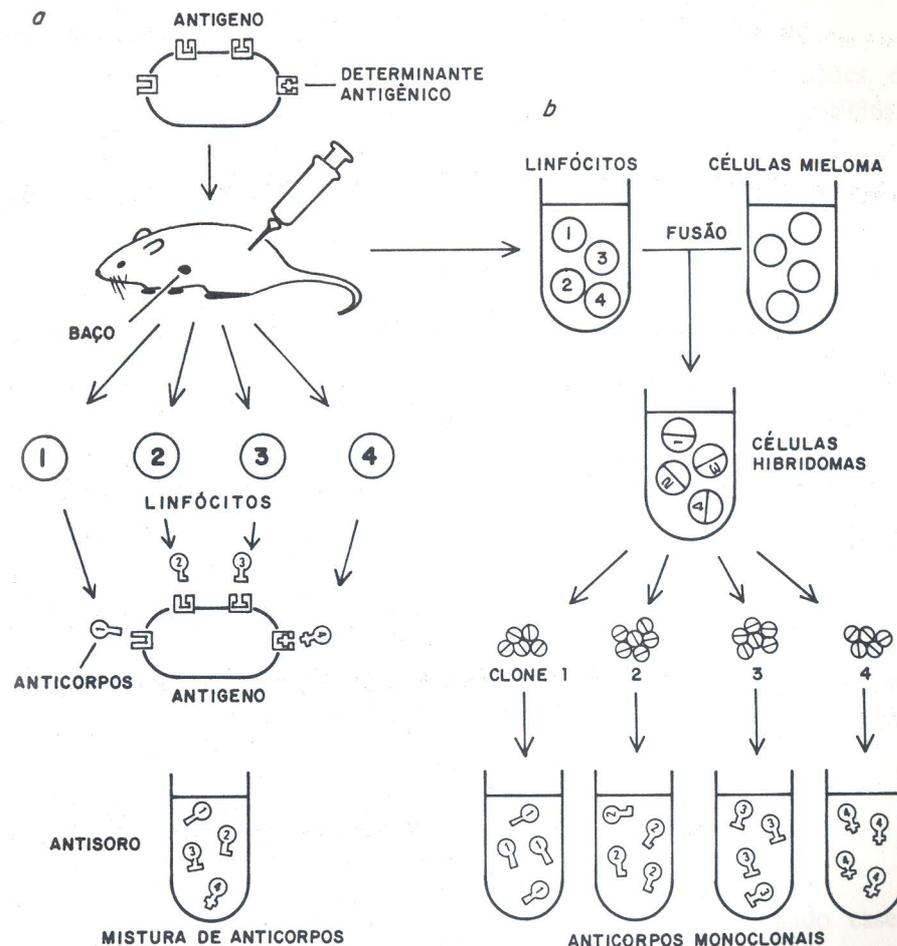


Fig. 28. Esquema dos procedimentos para a obtenção de anticorpos monoclonais.

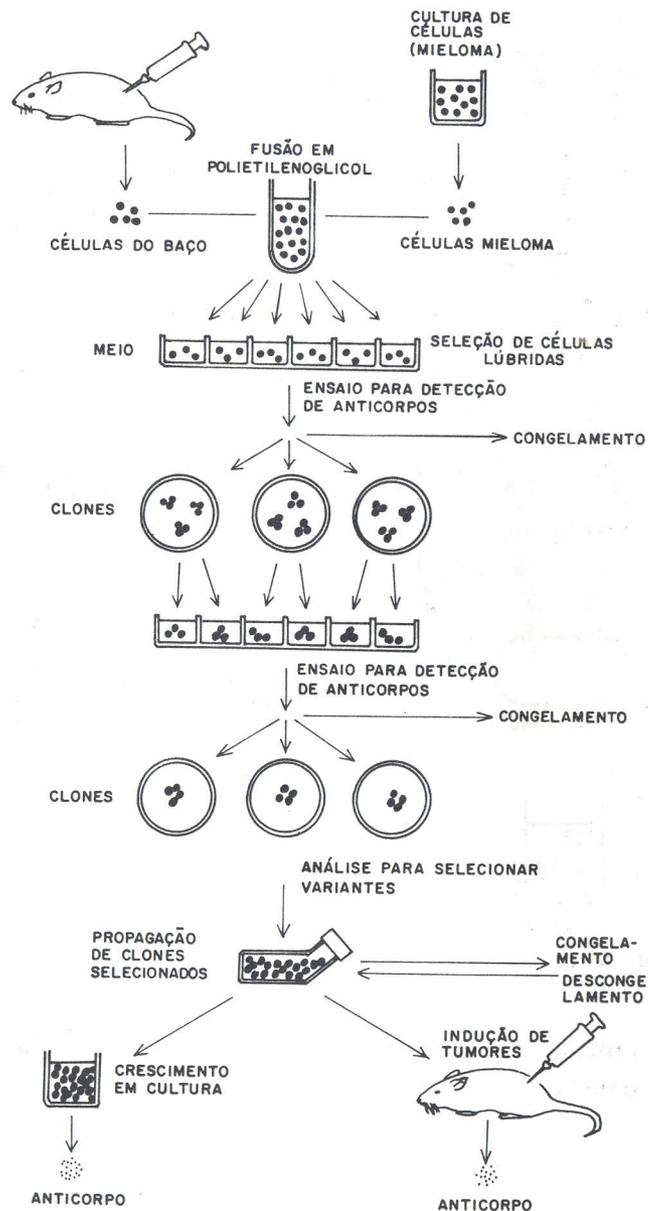


Fig. 29. Esquema dos procedimentos para a produção de anticorpos monoclonais.

14. Outros usos das técnicas sorológicas

Após conhecer as técnicas sorológicas e suas diversas variações, é possível utilizá-las diretamente ou ajustá-las a outros objetivos (Wang 1986). Alguns exemplos serão dados a seguir.

14.1. Detecção dos teores de hormônios em plantas

Normalmente, os teores de hormônios produzidos por organismos vivos têm sido quantificados através de técnicas de purificação e fracionamento, a partir de extratos brutos. Isto requer grandes quantidades de extrato purificado. As análises quantitativas, a partir de pequenas quantidades de amostras são, quase sempre, impossíveis de serem feitas pelos métodos convencionais ou então requerem demasiado tempo e equipamentos sofisticados. O uso do teste de ELISA, através de antissoros de alta qualidade, produzido para testes qualitativos e quantitativos de hormônios, tem permitido que essas avaliações sejam realizadas facilmente, utilizando, inclusive, extratos semi-purificados. Alguns exemplos são os testes realizados com os ácidos indolacético e abscísico, várias giberelinas, citocininas e outras proteínas (Fuchs & Fuchs 1969, Jones & Chen 1976, Hirel et al. 1982, Weiler 1982). Entretanto, existem algumas dificuldades quanto ao uso de ELISA com estes objetivos:

1. determinação de curva de resposta; e
2. ocorrência de reações cruzadas (reações não específicas).

O uso de anticorpos monoclonais (AMc) tem solucionado esse problemas. Entretanto, os AMc não são facilmente obtidos como-pode parecer. Além de dispendiosa, sua produção exige laboratório apropriado, pessoal treinado, tempo em torno de três meses e, ao final, podem ocorrer resultados frustrantes. No entanto, os AMc vêm sendo desenvolvidos, em vários países, para esse tipo de estudo e apresentam grande especificidade (Trione & Morris 1983, Mertens et al. 1985).

14.2. Técnicas imunocitológicas

É sabido que os tecidos vegetais contêm inúmeras enzimas. Por diversas vezes, houve interesse de determinar, em cortes histológicos feitos em órgãos vegetais, onde essas enzimas de interesse estão localizadas. Embora não seja possível avaliar sua atividade.

De posse de um antissoro, preparado contra a enzima de interesse, é possível avaliar sua localização num sistema celular organizado. Neste caso, o antissoro é ligado a uma molécula de isotiocianato de fluoresceína que, quando submetida a luz ultra-violeta, fluoresce e apresenta coloração verde-amarelada. Outro composto fluorescente utilizado é o isotiocianato de tetrametilrodamina. As dificuldades iniciais são: purificação da enzima, preparo do antissoro, obtenção de cortes histológicos adequados e redução de autofluorescência. A autofluorescência, observada em cortes sob luz UV, é uma desvantagem e é devida à presença de compostos fenólicos, lignina, celulose e clorofilas. Sua interferência depende do comprimento de onda e dos corantes utilizados.

A maneira de reduzir essa interferência, causada pela autofluorescência, é tratar os cortes com solução azul de EVANS. Utilizando luz UV e filtro de 495 nm, observa-se que os tecidos corados pelo azul de Evans (Evans blue; Sigma E 2129) ficarão vermelhos, enquanto que as partes coradas com o conjugado (antissoro + corante) ficarão amarelo-esverdeadas, permitindo, assim, uma melhor análise das estruturas celulares.

Agradecimentos

O autor expressa seus agradecimentos a José Marcos G. Mandarino, pelas constantes revisões e discussões do texto; a Carlos Caio Machado, Gedi J. Sfredo e Léo P. Ferreira, da EMBRAPA-CNPq; a Addolorata Colariccio e Aluísio P. C. Alba, do Instituto Biológico de São Paulo; Rogério F. de Souza, do Departamento de Biologia, da Universidade Estadual de Londrina, pela revisão do texto e sugestões; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo suporte financeiro que permitiu a aquisição dos reagentes utilizados neste trabalho.

15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAVAL, H.; MAAT, D.Z. Serological relationships among polyhedral plant viruses and production of high-titre antisera. *Nature*, v.202, p.674-675, 1964.
- ALFENAS, A.C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G.C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991. 242p.
- ATZON, R.; WEILER, E.W. The immunoassay of gibberelins. 2. Quantitation of GA3, GA4 and GA7 by ultrasensitive solid-phase enzyme immunoassays. *Planta*, v.159, p.7-11, 1983.
- AVRAMEAS, S. Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. *Immunochemistry*, v.6, p.43-52, 1969.
- BALL, E.M. **Serological tests for the identification of plant viruses**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1974. 31p.
- BANTTARI, E.E.; GOODWIN, P.H. Detection of potato viruses S, X, and Y by enzyme-linked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot-ELISA). *Phytopathology*, v.69, p.202-205, 1985.
- BARBARA, D.J.; CLARK, M.F. A simple indirect ELISA using F(ab)₂ fragments of immunoglobulin. *Journal of General Virology*, v.58, p.315-322, 1982.
- BARBARA, D.J., CLARK, M.F.; THRESH, J.M.; CASPER, R. Rapid detection and serotyping of prunus necrotic ringspot virus in perennial crops by enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of Applied Biology*, v.90, p.395-399, 1978.
- BAR-JOSEPH, M.; MALKINSON, M. Hen egg yolk as a source of antiviral antibodies in the enzyme-linked immunosorbent assay: a comparison of two plant viruses. *Journal of Virological Methods*, v.1, p.179-183, 1980.
- BATTEIGER, B.; NEWHALL, W.J.; JONES, R.A. The use of Tween 20 as a blocking agent in the immunochemical detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *Journal of Immunological Methods*, v.55, p.297-307, 1982.
- BAUSKE, E.M.; HEWINGS, A.D.; KOLB, F.L.; CARMER, S.G. Variability in enzyme-linked immunosorbent assays and control of experimental error by use of experimental designs. *Plant Disease*, v.78, p.1206-1210, 1994.
- BERGER, P.H.; THORNBURY, D.W.; PIRONE, T.P. Detection of picogram quantities of potyviruses using a dot blot immunobinding assay. *Journal of Virological Methods*, v.12, p.31-39, 1985.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.

- CARON, M.; COPEMAN, R.J. Effect of heating on the sensitivity and specificity of an enzyme immunoassay (EIA) for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* serogroup I. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.7, p.41-46, 1985.
- CATTY, D.; RAYKUNDALIA, C. ELISA and related enzyme immunoassay. In: CATTY, D. ed. **Antibodies: a practical approach**. New York: IRL Press, 1989. 203p.
- CHAKRABORTY, B.N.; PURKAYASTHA, R.P. Serological relationship between *Macrophomina phaseolina* and soybean cultivars. **Physiological Plant Pathology**, v.23, p.197-205, 1983.
- CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v.34, p.475-483, 1977.
- CLARK, M.F.; BAR-JOSEPH, M. Enzyme immunosorbent assay in plant virology. In: MARAMOROSH, K.; KOPROWSKI, H. eds. **Methods in virology**. New York: Academic Press, 1984. p.51-85.
- CLARKE, M.H.G.; FREEMAN, T. Imunoelectrophoresis. **Clinical Science**, v.35, p.403, 1968.
- CLAUSEN, J. **Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules**. New York: Elsevier, 1988. 464 p.
- COLARICCIO, A.; EIRAS, M.; VICENTE, M.; CHAGAS, C.M.; HARAKAWA, R. Diagnóstico do isolado *Musa* sp. do vírus do mosaico do pepino através de anticorpos obtidos de gemas de ovos de galinha. **Summa Phytopathologica**, v.20, p.48, 1994.
- CONVERSE, R.; MARTIN, R. Enzyme-linked immunosorbent assay. In: HAMPTON, R.O.; BALL, E.M.; DE BOER, S.H. eds. **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: a laboratory manual**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1990. p.179-204.
- CRAIG, S.; GOODCHILD, D.J.; MILLER, A. Immunofluorescence and localization of pea storage protein in glucol metacrylate embedded tissue. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.27, p.1312-1316, 1979.
- CROWTHER, J.R.; ABU-EL ZEIN, E.M.E. Detection and quantification of foot and mouth disease virus by enzyme labelled immunosorbent assay (ELISA). **Journal of General Virology**, v.42, p.597-602, 1979.
- CULVER, J.N.; SHERWOOD, J.L. Detection of peanut stripe virus in peanut seed by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody. **Plant Disease**, v.72, p.676-679, 1988.
- DAIE, J.; WYSE, R. Adaptation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to the quantitative analysis of abscisic acid. **Analytical Biochemistry**, v.119, p.365-371, 1982.
- DANIELS, J.; CAMPBELL, R.N. Characterization of cucumber mosaic virus isolates from California. **Plant Disease**, v.76, p.1245-1250, 1992.

- D'ARCY, C.J.; TORRANCE, L. MARTIN, R.R. Discrimination among luteoviruses and their strains by monoclonal antibodies and identification of common epitopes. **Phytopathology**, v.79, p.869-873, 1989.
- DORE, L.; WEISS, E.; ALTSCHUH, D.; REGENMORTEL, M.H.V. VAN Visualization by electron microscopy of the location of tobacco mosaic virus epitopes reacting with monoclonal antibodies in enzyme immunoassay. **Virology**, v.162, p.279-289, 1988.
- EDWARDS, H.L.; COOPER, J.I. Plant virus detection using a new form of indirect ELISA. **Journal of Virological Methods**, v.11, p.309-319, 1985.
- ELLIS, P.J.; WIECZOREK, A. Production of monoclonal antibodies to beet western yellows virus and potato leaf roll virus and their use in luteovirus detection. **Plant Disease**, v.76, p.75-78, 1992.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v.8, p.871-874, 1971.
- FERGUSON, M.W.; AYERS, A.R.; WYKOFF, K.L. Use of clustering methods with monoclonal antibodies for taxonomy analysis of *Phytophthora* and for screening and clustering antibodies. **Phytopathology**, v.77, p.1750, 1987.
- FUCH, S.; FUCH, Y. Immunological assay for plant hormones using specific antibodies to indolacetic acid and gibberelic acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.192, p.528-530, 1969.
- GERALDI, M.A.P.; KIMATI, H. Caracterização patogênica e serológica de *Colletotrichum graminiicola* do trigo. **Summa Phytopathologica**, v.8, p.16-28, 1982.
- GERSONI, J.M.; PALADE, G.E. Protein blotting: principles and application. **Analytical Biochemistry**, v.131, p.1-15, 1983.
- GINGERY, R.E. An immunofluorescence test for maize chlorotic dwarf virus. **Phytopathology**, v.68, p.1526-1529, 1978.
- GINGERY, R.E. Fluorescent antibody test, viruses. In: HAMPTON, R.O.; BALL, E.M.; DE BOER, S.H. eds. **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: a laboratory manual**. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1990. p.287-293.
- GLEASON, M.L.; GHABRIAL, S.A.; FERRIS, R.S. Serological detection of *Phomopsis longicolla* in soybeans seeds. **Phytopathology**, v.77, p.371-375, 1987.
- GRABAR, P.; WILLIAMS JUNIOR, C. A. Imunoelectrophoresis. **Biochemistry et Biophysica Acta**, v.10, p.193, 1953.
- GROGAN, R.G.; TAYLOR, R.H.; KIMBLE, K.A. The effect of placement of reactants on immunodiffusion precipitin patterns. **Phytopathology**, v.54, p.163-166, 1964.
- GUESDON, J.L.; TERNYNCK, T.; AVRAMEAS, S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.27, p.1131-1135, 1969.

- HAMPTON, R.O.; BALL, E.M.; DE BOER, S.H.M. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: a laboratory manual. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1990. 389p.
- HARLOW, E.D.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726p.
- HAWKES, R.; NIDAY, E.; GORDON, J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. **Analytical Biochemistry**, v.119, p.142-147, 1982.
- HERBERT, W.J. Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animals. In: WEIR, D.M. **Handbook of experimental immunology.** Oxford: Blackwell, 1978. p.A3.1-A3.15.
- HILDEBRAND, D.F.; HYMOVITZ, T. Two soybean genotypes lacking lipoxygenase-1. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.58, p.583-586, 1981.
- HIREL, B.; PERROT-RECHENMANN, C.; MAUDINAS, B.; GADAL, P. Glutamine synthetase in alder (*Alnus glutinosa*) root nodules. Purification, properties and cytoimmunochemical localization. **Plant Physiology**, v.55, p.197-203, 1982.
- HSU, H.T.; HIBINO, H.; CABAUTAN, P.Q. Development of serological procedures for rapid, sensitive, and reliable detection of rice grassy stunt virus. **Plant Disease**, v.74, p.695-698, 1990.
- HU, J.S.; ROCHOW, W.F.; DIETERT, R.R. Production and use of antibodies from hen eggs for the SGV isolate of barley yellow dwarf virus. **Phytopathology**, v.75, p.914-919, 1985.
- HUGUES, J.; THOMAS, J. The use of protein A-sandwich ELISA as a mean for quantifying serological relationships between members of the tobamovirus group. **Annals of Applied Biology**, v.112, p.117-126, 1988.
- JOHNSON, M.C.; PIRONE, T.P.; SIEGEL, M.R.; VARNEY, D.R. Detection of epichloe typhina in tall fescue by means of enzyme-linked immunosorbent assay. **Phytopathology**, v.72, p.647-650, 1982.
- JONES, R.L.; CHEN, R.F. Immunohistochemical localization of -amylase in barley aleurone cells. **Journal of Cell Science**, v.20, p.183-198, 1976.
- JORDAN, R. Monoclonal. In: HAMPTON, R.O.; BALL, E.M.; DE BOER, S.H. eds. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: a laboratory manual. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1990. p.55-78.
- KAWASHIMA, N.; WILDMAN, S.G. Fraction I protein. **Annual Review of Plant Physiology**, v.21, p.325-358, 1970.
- KITAGAWA, T.; SAKAMOTO, K.F.; OGURA, H. Novel enzyme immunoassay for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and for general detection of various *Fusarium* species. **Phytopathology**, v.70, p.162-165, 1989.
- KLEIN, J. **Immunology.** Cambridge: Blackwell Scientific, 1990. 508p.

- KLEMENT, Z.; MAVRIDIS, A.; RUDOLPH, K.; VIDAVER, A. Inoculation of plant tissues. In: **Methods in phytobacteriology.** Bucarest: Akadémia Kiadó, 1990. 568p.
- KOENIG, R. ELISA in the study of homologous and heterologous reactions of plant viruses. **Journal of General Virology**, v.40, p.308-309, 1978.
- KOENIG, R. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. **Journal of General Virology**, v.55, p.53-62, 1981.
- KOENIG, R.; PAUL, H.L. Variants of ELISA in plant virus diagnosis. **Journal of Virological Methods**, v.5, p.113-125, 1982a.
- KOENIG, R.; PAUL, H.L. Detection and differentiation of plant viruses by various ELISA procedures. **Acta Horticulturae**, v.127, p.147-158, 1982b.
- KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v.256, p.495-497, 1975.
- LEI, J.D.; AGRIOS, G.N. Detection of virus infection and spread by immunofluorescent staining of enzyme-treated leaves. **Phytopathology**, v.76, p.1031-1033, 1986.
- LIMA, J.A.A. Testes sorológicos para identificação de vírus de leguminosas. **Fitopatologia Brasileira**, v.4, p.215-225, 1979.
- LIMA, J.A.A.; PURCIFULL, D.E.; HIEBERT, E. Purification, partial characterization, and serology of blackeye cowpea mosaic virus. **Phytopathology**, v.69, p.1252-1258, 1979.
- LISTER, R.M.; ROCHOW, W.F. Detection of barley yellow dwarf virus by enzyme-linked immunosorbent assay. **Phytopathology**, v.69, p.649-654, 1979.
- LUCAS, L.T.; GROGAN, R.G. Serological variation and identification of *Pseudomonas lachrymans* and other pathogenic *Pseudomonas non-species*. **Phytopathology**, v.59, p.1909-1912, 1969.
- McLAUGHLIN, M.R.; BARNETT, O.W.; BURROWS, P.M.; BAUM, R.H. Improved ELISA conditions for detection of plant viruses. **Journal of Virological Methods**, v.3, p.13-25, 1981.
- MALIN, E.; BELDEN, E.L.; ROTH, D. Evaluation of the radioimmunoassay, indirect enzyme linked immunosorbent assay, and dot blot assay for the identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.7, p.217-222, 1985.
- MACKENZIE, D. Globulin conjugation methods. In: HAMPTON, R.O.; BALL, E.M.; DE BOER, S.H. eds. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: a laboratory manual. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1990. p.87-92.
- MERNAUGH, R.; MERNAUGH, G.; NOVACS, G. Antigens and antibodies. In: HAMPTON, R.O.; BALL, E.M.; DE BOER, S.H. eds. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: a laboratory manual. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1990. p.3-14.

- MERTENS, R.; EBERLE, J.; ARNSCHIEDT, A.; LEDEBUR, A.; WEILER, E.W. Monoclonal antibodies to plant growth regulators. II. Indole-3-acetic acid. **Planta**, v.166, p.389-393, 1985.
- MOHAN, S.B. Evaluation of antisera raised against *Phytophth fragariae* for detecting the red core disease of strawberries by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Plant Pathology**, v.37, p.206-216, 1988.
- MORGAN, M. R. A.; MCNERNEY, R.; MATTHEW, J. A.; COXON, D.T.; CHAN, H. W. S. An enzyme-linked immunosorbent assay for total glycoalkaloids in potato tubers. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.34, p.593-598, 1983.
- MORLEY, S.J.; JONES, D.G. A note on a highly sensitive modified ELISA technique for Rhizobium strain identification. **Journal of Applied Bacteriology**, v.49, p.103-109, 1980.
- NAKASHIMA, J.; NYDEGGER, U. Detección de *Pseudomonas solanacearum* mediante técnicas serológicas de latex y ELISA. **Fitopatología**, v.21, p.46-51, 1986.
- NUTTER, F.W.; HILL, J.H.; SCHULTZ, P.M. The use of monoclonal antibodies to model the field spread of soybean mosaic virus. **Phytopathology**, v.83, p.1363, 1993.
- OLIVEIRA, A.R. Considerações sobre anti-soros obtidos pela técnica de injeção de antígeno no linfonódulo. **Summa Phytopathologica**, v.1, p.61-64, 1975.
- OLIVEIRA, A.R.; ALBA, A.P.C.; FIGUEIREDO, M.B. Serologia aplicada ao estudo de vírus de plantas. **Summa Phytopathologica**, v.2, p.69-96, 1976.
- PAIVA, E.; PEIXOTO, M.J.V.V.; FERREIRA, A.S.; CASELA, C.R. Diferenciação imunológica de raças fisiológicas de *Colletotrichum graminicola* do sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v.15, p.299-302, 1990.
- PERMAR, T.A.; GOTTWALD, J.H. Specific recognition of a *Xanthomonas campestris* Florida citrus nursery strain by a monoclonal antibody probe in a microfiltration enzyme immunoassay. **Phytopathology**, v.79, p.780-783, 1989.
- PETERSCHMITT, M.; QUIOT, J.B.; REYNARD, B.; BAUDIN, P. Detection of maize streak virus antigens over time in different parts of maize plants of a sensitive and so-called tolerant cultivar by ELISA. **Annals of Applied Biology**, v.121, p.641-653, 1992.
- PIAZZI, S.E. A simple method for preliminary immunodiffusion test of antigen-antibody systems having unknown ratios of reaction. **Analytical Biochemistry**, v.27, p.281-284, 1959.
- POLSON, A.; BARBARA von WECHMAR, M.; REGENMORTELL, M.H.V. VAN Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. **Immunological Communications**, v.9, p.475-493, 1980.
- PORTA, C.; DEVERGNE, J.C.; CARDIN, L.; BRIAND, J.P.; REGENMORTELL, M.H.V. Van Serotype specificity of monoclonal antibodies to cucumber mosaic virus. **Archives of Virology**, v.104, p.271-285, 1989.

- PURCIFULL, D.E.; BATCHELOR, D.L. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulphate (SDS)-treated plant virus and plant viral inclusions. Gainesville: University of Florida. 1977. 39p. (Bulletin, 788).
- PURCIFULL, D.E.; HIEBERT, E. Serological distinction of watermelon mosaic virus isolates. **Phytopathology**, v.69, p.112-116, 1979.
- REGENMORTELL, M.H.V. VAN; BURCKARD, J. Detection of a wide spectrum of tobacco mosaic virus strains by indirect Enzyme-linked immunosorbent assays. **Virology**, v.106, p.327-334, 1980.
- REGENMORTELL, M.H.V. VAN **Serology and immunochemistry of plant viruses**. New York: Academic Press, 1982. 302 p.
- ROBERTS, K. Antibodies and the plant cell surface: practical approaches. In: WANG, T.L. eds. **Immunology in plant science**. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. p.89-110.
- ROCHOW, W.F.; CARMICHAEL, L.E. Specificity among barley yellow dwarf viruses in enzyme immunosorbent assays. **Virology**, v.95, p.415-420, 1979.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology**. 2.ed. London: Grower Medical Publishing, 1989. 600p.
- ROTT, P.; DAVIS, M.J.; BAUDIN, P. Serological variability of *Xanthomonas albilineans*, causal agent of leaf scald disease of sugarcane. **Plant Pathology**, v.43, p.344-349, 1994.
- SAMPSON, P.J.; TAYLOR, R.H. A comparison of the electron microscope, microprecipitation tests, and indicator plants for the detection of potato viruses S, X, and Y. **Phytopathology**, v.58, p.489-493, 1968.
- SANDER, E.; DIETZGEN, R.G. Monoclonal antibodies against plant viruses. **Advances in Virus Research**, v.29, p.131-167, 1984.
- SELA, M.; SCHECHTER, B.; SCHECHTER, I.; BOREK, F. Antibodies to sequential and conformational determinants. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** 32: 537-545, 1967.
- SINGER, S.J.; EGGMAN, L.; CAMPBELL, J.M.; WILDMAN, S.G. The proteins of green leaves. IV. A high molecular weight protein comprising a large part of the cytoplasmic proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.197, p.233-239, 1952.
- STEWART, M.W. **Antibodies: their structure and function**. New York: Chapman & Hall, 1984. 96p.
- SUTULA, C.L.; GILLET, J.M.; MORRISEY, S.M.; RAMSDELL, D.C. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. **Plant Disease**, v.70, p.722-726, 1986.
- THAVEECHAI, N.; SCHAAD, N.W. Serological and electrophoretic analysis of membrane protein extract of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* from Thailand. **Phytopathology**, v.76, p.139-147, 1986.

- TIETJEN, K.; HAMMER, D.; MATERN, U. Determination of toxin distribution in *Alternaria* leaf spot diseased tissue by radioimmunoassay. **Physiological Plant Pathology**, v.26, p.241-257, 1985.
- TIJESSEN, P. Practice and theory of enzyme immunoassays. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. In: BURDON, R.H.; KNIPPENBERG, P.H. van. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Amsterdam: Elsevier, 1985. v.15, 549p.
- TONEGAWA, S. The molecules of the immune system. **Scientific American**, v.253, n.4, p.122-131, 1985.
- TORRANCE, L. Use of Clq to detect plant viruses in an enzyme-linked immunosorbent-type assay. **Journal of General Virology**, v.51, p.229-232, 1980.
- TORRANCE, L.; JONES, R.A.C. Increase sensitivity of detection of plant viruses obtained by using fluorogenic substrate in enzyme-linked immunosorbent assay. **Annals of Applied Biology**, v.101, p.501-509, 1982.
- TREIMER, J.F.; ZENK, M.H. Enzymic synthesis of corynanthe-type alkaloids in cell cultures of *Cartharanthus roseus*: quantitation by radioimmunoassay. **Phytochemistry**, v.17, p.227-231, 1978.
- TREMAINE, J. Imuno-osmophoresis. In: HAMPTON, R.O.; BALL, E.M.; DE BOER, S.H. eds. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens: a laboratory manual. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1990. p.175-178.
- TRIONE, E.J.; MORRIS, R.O. Monoclonal antibodies against cytokinins. **Plant Physiology**, v.72, p.114. 1983. Supplement.
- VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; HULDT, G.; ENGVALL, E. A microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay and its application to malaria. **Bulletin of the World Health Organization**, v.51, p.209-211, 1974.
- VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D.E.; CLARK, M.F.; ADAMS, A.N. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of General Virology**, v.33, p.165-167, 1976.
- WANG, T.L. Immunology in plant science. Cambridge: University Press, 1986. 227p.
- WEILER, E.W. An enzyme-immunoassay for cis (+) abscisic acid. **Physiological Plantarum**, v.54, p.510-514, 1982.
- WIECZOREK, A.; RONALD, W.P.; MARTIN, R. Monoclonal antibodies techniques. Ontario: Agricultural Canada Research Station, 1984. 7p. mimeo.
- YUEN, G.Y.; ALVAREZ, A.M.; BENEDICT, A.A.; TROTTER, K.J. Use of monoclonal antibodies to monitor the dissemination of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Phytopathology**, v.77, p. 366-370, 1987.

— ANEXO I —

Produção de massa micelial, imunização e produção de antissoros de fungos.

Fungos, devidamente isolados e caracterizados, podem ser utilizados como imunógenos. Diversos trabalhos realizados no Brasil e no exterior relatam estudos sorológicos com fungos (Geraldi & Kimati 1982, Chakraborty & Purkayastha 1983, Gleason et al. 1987, Mohan 1988).

Descrição do método:

1. transferir pequenos fragmentos de meio sólido contendo o fungo para frascos erlenmeyer (250 ml) contendo meio de cultura líquido. A incubação é, geralmente, feita à temperatura ambiente, sob leve agitação. Fungos de soja, utilizados no CNPSo para esse estudo, geralmente produzem massa micelial suficiente após 10 ou 12 dias de incubação;
2. filtrar o meio em papel de filtro Wathman Nº 1, à vácuo. Lavar com água destilada e secar, parcialmente, o micélio, em papel de filtro, retirando o excesso de umidade. As amostras podem ser então congeladas até o momento do uso;
3. triturar, em almofariz, 1 g do micélio com 5 ml de solução salina. Manter o extrato em refrigerador, por 4 h. Em seguida, centrifugar a 5000 g, por 10 min. e utilizar o sobrenadante na determinação do teor de proteínas. As amostras, com a concentração de proteínas conhecida, poderão ser congeladas ou utilizadas imediatamente. Há pesquisadores que utilizam esporos, ao invés de micélio, para a produção de antissoros; e
4. misturar 0,5 ml de antígeno com igual volume de adjuvante de Freund e aplicar nos animais por via intramuscular. Para os testes posteriores de avaliação do título do antissoro, por microprecipitina ou dupla difusão em gel, utilizar as amostras previamente congeladas.

Outra opção para o preparo de antígenos é citada por Gleason et al. (1987). Esporos de *Phomopsis longicolla*, coletados do meio de cultura, foram distribuídos em placa de Petri contendo meio de BDA (batata - dextrose - ágar). A massa de esporos germinados foi coletada, lavada, concentrada por centrifugação, liofilizada e posteriormente macerada. O material, armazenado sob congelamento, foi utilizado como antígeno para a produção de antissoros, bem como nos testes de ELISA.

— ANEXO II —

Purificação de antígeno por eletroforese

A sorologia tem sido utilizada na identificação de isolados de fungos. Entretanto, o antissoro policlonal preparado contra proteínas oriundas de micélio de um determinado fungo, comumente reagem com proteínas de outros fungos, demonstrando a ocorrência de determinantes antigênicos comuns. A solução encontrada por alguns pesquisadores foi a identificação de proteínas não comuns. Isto pode ser conseguido submetendo a amostra do extrato micelial à eletroforese. Após a coloração do gel com "coomassie blue", as bandas das proteínas, que não são comuns à todas as amostras e que poderão discriminar os isolados de interesse, são eluídas do gel e utilizadas como antígeno (Fig. 1). O fragmento de gel, contendo a proteína de interesse (não comum) é triturado em almofariz, adicionando água destilada esterilizada e essa solução é então injetada no animal. Outro método consiste em lavar o fragmento de gel com água destilada e liofilizá-lo. Em seguida, adicionar água destilada (0,5 ml), incubar à temperatura ambiente, por 2 a 4 h e injetar no animal. O título do antissoro dependerá da concentração protéica na amostra e do número de injeções.

A descrição do método de eletroforese e da extração das proteínas miceliais pode ser encontrada em Alfenas et al. (1991).

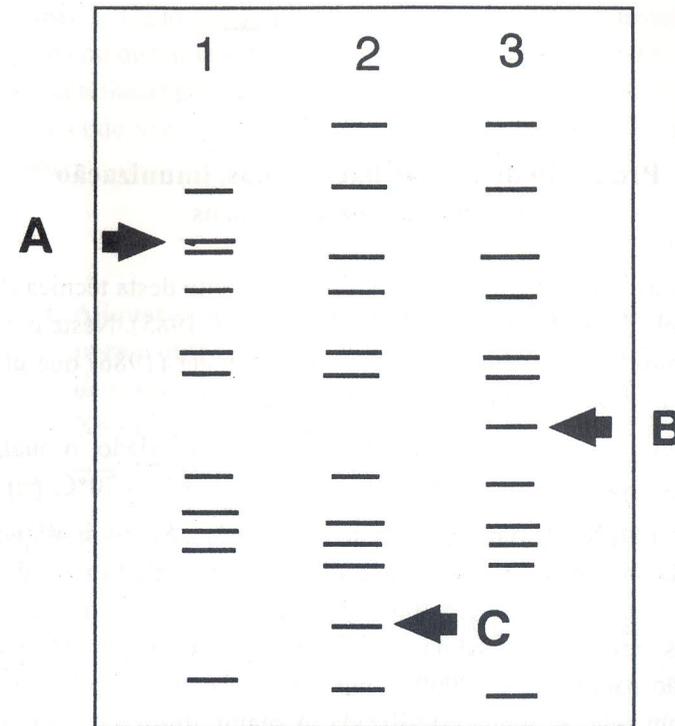


Fig. 1. Zimograma obtido a partir de eletroforese de proteínas de fungos, mostrando as bandas capazes de induzir a produção de anticorpos e que podem separar os tres isolados. As bandas A, B e C podem ser extraídas do gel e utilizadas como imunógenos específicos para cada fungo estudado.

— ANEXO III —

Produção de células bacterianas, imunização e produção de antissoros

Diversos métodos têm sido descritos à respeito desta técnica (Lucas & Grogan 1969, Caron & Copeman 1985, Malin et al. 1985). Nesta publicação, descreveremos o método de Nakashima & Nydegger (1986) que utilizaram isolados de *Pseudomonas solanacearum*;

1. estabelecer, inicialmente, a cultura em meio apropriado, o qual, após a inoculação, deve ser incubado à temperatura de 28°C a 30°C, por 48 h;
2. preparar soluções de BaCl₂ (1%) e de H₂SO₄ (1%). Misturar aliquotas pré-determinadas das duas soluções, conforme apresentado na Tabela 1, e medir as absorvâncias. Em tubo de cultura, ressuspender a massa de bactérias em solução salina NaCl 0,85%, esterilizada. Centrifugar a suspensão bacteriana a 12000 g, por 5 min., lavando o precipitado duas vezes com solução salina esterilizada. A seguir, diluir a suspensão para a concentração de 10⁹ células por ml, por comparação, utilizando colorímetro, através da leitura comparativa das absorvâncias, conforme descrição de McFarland, citado por Klement et al. (1990). Utilizando a tabela, podemos verificar que a concentração estimada de células bacterianas correspondente ao valor 4, na escala de McFarland, equivale a 1,2 x 10⁹ células/ml;
3. efetuar a sangria do animal para obtenção do antissoro normal ou pré-imune;
4. misturar 1 ml da suspensão de células bacterianas à igual volume do adjuvante incompleto de Freund. Após homegeneização, aplicar essa solução por via intramuscular ou subcutânea (seis locais diferentes, no dorso do animal). Quatro injeções posteriores, sem adjuvante, serão realizadas com intervalos de dez dias entre cada uma delas; e

5. determinar o título do antissoro obtido utilizando os testes de micro-precipitina ou de dupla difusão em gel, com concentração em torno de 10⁹ células bacterianas por ml de solução salina. No teste de microprecipitina, a leitura pode ser feita de 3 a 6 h após a mistura do antígeno com o antissoro.

TABELA 1. Aliquotas de cloreto de bário e de ácido sulfúrico necessárias para a obtenção de turbidez correspondente às concentrações de células bacterianas/ml, em análises colorimétricas. Fonte: Klement et al. (1990).

Escala de McFarland	BaCl ₂ ml	H ₂ SO ₄ ml	Nº células bacterianas x (10 ⁸ cel./ml)
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12
5	0,5	9,5	15
6	0,6	9,4	18
7	0,7	9,3	21
8	0,8	9,2	24
9	0,9	9,1	27
10	1,0	9,0	30

— ANEXO IV —

Determinação da concentração de proteínas pelo método de BRADFORD (1976).

1. PREPARO DOS REAGENTES

1.1. Reagente de Bradford

Dissolver 200 mg de azul brilhante de coomassie (Coomassie brilliant blue G-250 - Sigma B5133) em 50 ml de etanol ou metanol. Deixar a solução sob agitação constante durante 2 h. Após a homogeneização, adicionar, lentamente, 100 ml de H₃PO₄ (ácido fosfórico) a 85%. Deixar a mistura sob agitação constante por 2 h. Após essa segunda homogeneização, deixar a solução em repouso por 24 h e, a seguir, completar o volume, com água destilada deionizada, para 1000 ml. Deixar em repouso por mais 24 h e, então, filtrar em membrana milipore, poro de 0,45 µm (duas camadas). A solução deve apresentar cor marron-clara (cor de chá). Acondicionar em frasco escuro (frasco âmbar, envolto em folha de papel alumínio) e armazenar em refrigerador (4°C).

1.2. Tampão Tris-HCl

O tampão Tris-HCl é obtido dissolvendo 7,47 g de Trizma base em 80 ml de água destilada deionizada e titulando essa solução com HCl concentrado, até pH 6,8. Completar o volume para 1000 ml com água destilada deionizada. Armazenar à temperatura ambiente.

2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

Inicialmente, deve-se estimar a curva padrão, utilizando albumina bovina cristalizada como padrão e o reagente de Bradford como reagente de cor.

3. CURVA PADRÃO

1. Preparar soluções de albumina nas seguintes concentrações: 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 e 1400 µg/ml de tampão Tris-HCl, pH 6,8.
2. Adicionar, em tubos de ensaio, 5 ml do reagente de Bradford e 0,1 ml das soluções padrão de albumina.
3. Homogeneizar e, em seguida, determinar a densidade ótica das soluções em espectrofotômetro, regulado para um comprimento de onda de 595 nm.
4. Traçar a curva padrão, utilizando a equação de regressão linear que será obtida a partir dos valores das concentrações de albumina e das absorbâncias correspondentes. Analogamente, determinar a densidade ótica das amostras após a reação das mesmas com o reagente de Bradford e estimar a concentração de proteína pela equação de regressão obtida.
5. Exemplo da determinação da equação de regressão

Suponha os seguintes valores:

Concentração BSA (µg/ml)	Absorbância nm
200	0.25
400	0.75
600	1.20
800	1.75
1000	2.00
1200	2.25
1400	2.50
(Y)	(X)

A equação da regressão linear é: $Y = a + bX$;

A equação obtida com os dados acima é: $Y = 10,3182 - 516,61X$;

A leitura da amostra desconhecida foi 0,8. Substituindo este valor na equação tem-se: $Y = 10,3182 - 516,61 \times (0,8)$ e $Y = 423,6$;

Isto significa que a amostra estudada tem 423,6 µg de proteína por ml;

Detalhes relacionados à obtenção da regressão podem ser encontrados em livros de estatística.

— ANEXO VII —

Modelo de ficha para anotação de resultados obtidos com teste de microprecipitina.



EMBRAPA
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA

Setor de Virologia

TESTE DE MICROPRECIPITINA

Antígeno _____ Data ____/____/____
 Antissoro _____
 Temperatura _____ °C. Duração Incubação _____ hr
 Observações _____

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						
E						

Coluna = diluição antissoro
 Linha = diluição antígeno

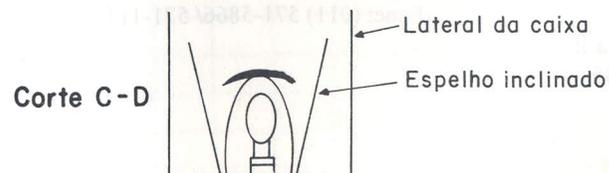
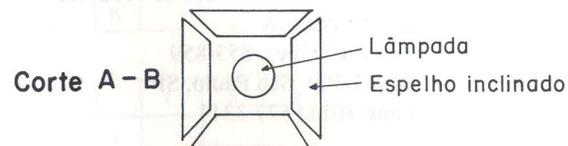
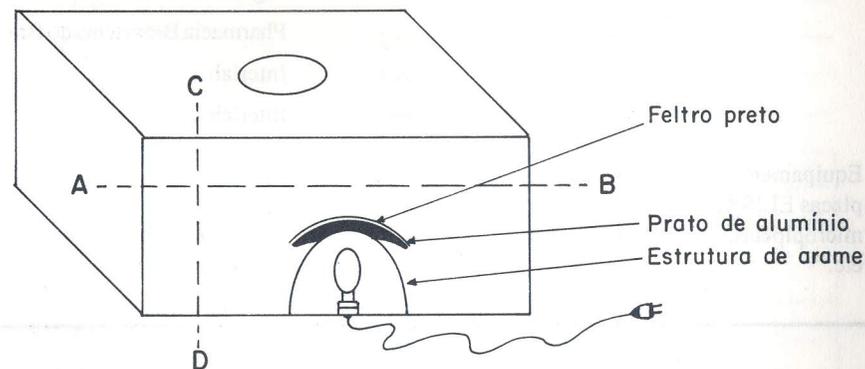
RESULTADOS

Diluição Antissoro	Diluição Antígeno					
	1 ()	2 ()	3 ()	4 ()	5 ()	6 ()
A ()						
B ()						
C ()						
D ()						
E ()						

— ANEXO VIII —

Modelo de caixa com luz difusa para observação de linhas de precipitação em testes sorológicos de dupla difusão em gel. Todo o interior da caixa deve ser pintado com tinta preta fosca.

CAIXA LUZ DIFUSA



**IMPRESSO NO SETOR DE SERVIÇOS GRÁFICOS
do Centro Nacional de Pesquisa de Soja**

Rod. Carlos João Strass (Londrina-Warta) - Acesso Orlando Amaral

Fone: (043) 320-4166 - Fax: (043) 320-4186 - Telex: 432208

Cx. Postal 231 - 86.001-970 - Londrina, PR

Centro Nacional de Pesquisa de Soja

Aqui a ciência se transforma em tecnologia capaz de produzir milhares de toneladas de alimentos no campo.

TEMOS O QUE VOCÊ PROCURA

- ✓ **TECNOLOGIAS** QUE PERMITEM A EXPLORAÇÃO ECONÔMICA E RACIONAL DAS PROPRIEDADES AGRÍCOLAS
- ✓ **SERVIÇOS** QUE LEVAM À QUALIDADE DA PRODUÇÃO
- ✓ **PRODUTOS** QUE ASSEGUARAM A EFICIÊNCIA DAS TÉCNICAS GERADAS POR NOSSOS CIENTISTAS.

Conheça a pesquisa brasileira de soja.

Venha falar conosco!

Área de Difusão de Tecnologia, Marketing e Comercialização

tecnologias: cultivares produtivas ♦ manejo integrado de pragas ♦ soja na alimentação ♦ manejo de plantas daninhas ♦ rotação de culturas ♦ manejo de solos ♦ **serviços:** orientação técnica ♦ análises laboratoriais ♦ consultorias ♦ cursos ♦ palestras ♦ **produtos:** publicações técnicas

CNPSo: Busca de soluções, compromisso com o homem



EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA
Vinculada ao Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária
CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA – CNPSo

Rod. Carlos João Strass ♦ londrina/warta ♦ fone (043) 320-4166 ♦
.fax (043) 320-4186 ♦ cx. postal 231 ♦ 86001-970 ♦ londrina, pr



BRASIL
GOVERNO FEDERAL