

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM ANTISSORO
POLICLONAL PARA DETECÇÃO DE ds-RNA**

Relatório Final de Estágio
Licenciatura em Engenharia Agrícola

PAULA CRISTINA AZEVEDO RODRIGUES

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO
VILA REAL, 1998

O Orientador

Ana Maria Nazaré Pereira

(Professora Catedrática)

Os textos apresentados no presente trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor.

Aos meus pais e irmãos

Ao Henrique

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Maria Nazaré Pereira, pelas suas preciosas sugestões e conselhos e pela total disponibilidade e apoio ao longo do trabalho, o meu sincero agradecimento.

Aos técnicos da Secção de Protecção de Plantas, Carlos Martins e Conceição Rodrigues, e também à Ana Macedo, pela sua colaboração.

À Secção de Parasitologia e Higiene Animal e à Secção de Clínicas Veterinárias da UTAD, pelas condições e apoio na manutenção dos coelhos para produção dos antissoros.

Ao Alfredo Aires e ao Miguel Carvalho, por terem sido colegas e amigos. Espero ter sabido retribuir.

A todos quanto, directa ou indirectamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

E, claro, ao Henrique. Sem a sua ajuda, estas páginas ainda não existiriam.

RESUMO

Os fitopatologistas têm feito um uso cada vez maior dos métodos serológicos na detecção e caracterização de fitopatogénios, por se tratar de técnicas rápidas, práticas e de elevada sensibilidade, que se podem adaptar às necessidades. De entre estes testes, as várias adaptações do ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) são, actualmente, os métodos mais divulgados, uma vez que permitem testar um elevado número de amostras num curto espaço de tempo e a preço moderado.

A maioria dos vírus fitopatogénicos tem genoma de ss-RNA (ácido ribonucleico monocatenário) que, durante o processo replicativo, no interior das células do hospedeiro, dá origem a uma forma replicativa de ds-RNA (ácido ribonucleico bicatenário). Considerando que as plantas não infectadas não contêm quantidades detectáveis de ds-RNA, a sua presença em extractos vegetais é uma forte indicação de infecção viral.

O presente trabalho desenvolveu-se no sentido de produzir um antissoro policlonal para um polinucleótido sintético bicatenário [poli(I):poli(C)] para detecção de ds-RNA. O antissoro foi caracterizado através de várias técnicas serológicas (ELISA-indirecto em placa de poliestireno, ELISA-indirecto em membrana de nitrocelulose e teste de difusão dupla em agar).

O teste ELISA-indirecto em placa revelou ser mais sensível e prático do que o respectivo teste em membrana de nitrocelulose, tanto na detecção de poli(I):poli(C) como de ds-RNA purificado. Ambos se mostraram, no entanto, incapazes de detectar ds-RNA a partir de extractos aquosos de videira, o que dificulta o processo de detecção, uma vez que a extracção de ds-RNA de material vegetal é morosa e de baixo rendimento.

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 - RELAÇÃO ANTIGÉNIO-ANTICORPO	2
2.1.1 - Antigénio	2
2.1.2 - Anticorpos	3
2.1.2.1 - Definição de anticorpo	3
2.1.2.2 - Estrutura dos anticorpos	4
2.1.2.3 - Anticorpos policlonais vs anticorpos monoclonais	6
2.1.3 - Interações antigénio / anticorpo	9
2.2 - PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS	9
2.2.1 - Purificação de antigénio	9
2.2.2 - Imunização	10
2.2.2.1 - Animais usados	10
2.2.2.2 - Factores a considerar quando da imunização	12
2.2.3 - Colheita de Sangue	15
2.2.4 - Obtenção e armazenamento de antissoro	17
2.2.5 - Purificação de IgG	18
2.3 - TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS DE IDENTIFICAÇÃO	19
2.3.1 - Testes serológicos	19
2.3.1.1 - Princípios gerais	20
2.3.1.2 - Técnicas de amplificação dos testes ELISA	22
2.3.1.3 - Testes ELISA	23
2.3.1.3.1 - DAS-ELISA	24
2.3.1.3.2 - ELISA-indirecto	24
2.3.1.3.3 - Dot-immunobinding assay (DIBA) ou dot-ELISA	25
2.3.1.4 - Outras técnicas serológicas	26
2.3.1.4.1 - "Tissue-print immunoassay"	26
2.3.1.4.2 - Western blotting	26
2.3.1.4.3 - Imunoprecipitação	27
2.3.1.4.4 - Imunomicroscopia electrónica (IME)	28
2.3.1.4.5 - Testes radioimunológicos (RIA)	29
2.3.2 - Técnicas de análise e detecção de ds-RNA	29
3 - PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1 - MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1.1 - Preparação e manutenção dos coelhos	32
3.1.2 - Imunização com proteína sintética	32
3.1.3 - Colheita de sangue	33
3.1.4 - Separação e armazenamento do antissoro	34
3.1.5 - Caracterização serológica dos antissoros	35
3.1.5.1 - Avaliação da evolução da reactividade do antissoro "inteiro"	35
3.1.5.1.1 - ELISA- indirecto em placa (ID-ELISA)	35
3.1.5.1.2 - ELISA indirecto em membrana (DIBA)	36
3.1.5.1.3 - Teste de difusão dupla em agar para titulação do antissoro	38
3.1.5.2 - Avaliação da reactividade da IgG purificada	39

3.1.5.2.1 - Purificação e armazenamento de IgG	39
3.1.5.2.2 - ELISA indirecto em placa (ID-ELISA)	39
3.1.5.2.3 - ELISA indirecto em membrana (DIBA)	39
3.1.5.2.4 - Teste de difusão dupla em agar	40
3.1.6 - Detecção serológica de ds-RNA com o antissoro produzido.....	40
3.1.6.1 - Detecção serológica de ds-RNA em extracto de videira.....	40
3.1.6.1.1 - ELISA-indirecto em placa	40
3.1.6.1.2 - ELISA-indirecto em membrana (DIBA).....	41
3.1.6.1.3 - Teste de difusão dupla em agar	41
3.1.6.2 - Detecção serológica de ds-RNA.....	42
3.1.6.2.1 - Purificação de ds-RNA	42
3.1.6.2.2 - ELISA-indirecto em placa	43
3.1.6.2.3 - ELISA-indirecto em membrana	43
3.1.6.2.4 - Teste de difusão dupla em agar	43
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 - AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO DA REACTIVIDADE DO ANTISSORO “INTEIRO	45
4.2- TITULAÇÃO DO ANTISSORO POR TESTE DE DIFUSÃO DUPLA EM AGAR	48
4.3 - AVALIAÇÃO DA REACTIVIDADE DA IGG PURIFICADA	49
4.4 - DETECÇÃO DE DS-RNA EM EXTRACTOS AQUOSOS E EM DS-RNA PURIFICAD	50
5 - CONCLUSÕES	53
6 - BIBLIOGRAFIA.....	55

1 - INTRODUÇÃO

O diagnóstico de uma doença é o primeiro passo para a definição de medidas de controlo. Para algumas doenças, a causa pode ser determinada pelos sintomas, mas nem sempre isso é possível, pelo que se torna necessário recorrer a técnicas laboratoriais para se atingir o diagnóstico correcto.

Os testes serológicos são o método mais usado pelos fitopatologistas na detecção de agentes patogénicos, principalmente vírus, mas também, por vezes, para fungos, bactérias e fitoplasmas, por se tratar de técnicas simples e práticas que se baseiam na reacção mais ou menos específica entre antígenos e anticorpos. De entre estes testes, as várias adaptações do ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) são os mais usados (Clark e Adams, 1977; Converse e Martin, 1990).

No caso particular dos vírus, patogénios sobre os quais este trabalho se debruça, a especificidade antígeno-anticorpo, se bem que seja normalmente factor de mais valia, pode tornar-se insuficiente, uma vez que, em plantas infectadas com mais do que um vírus, um vírus não testado pode passar despercebido ao investigador.

Morris e Dodds (1979) desenvolveram um método de isolamento e análise de RNA bicatenário (ds-RNA) a partir de material vegetal, que permite detectar a presença de vírus ou fungos nesse material, uma vez que apenas as plantas infectadas com estes patogénios apresentam este tipo de ácido nucleico. Este método pode tornar-se altamente específico, por permitir identificar o fitopatogénio em causa.

O objectivo deste trabalho é produzir, através da imunização de coelhos com um polinucleótido sintético, um antissoro específico para RNA bicatenário que seja capaz de detectar qualquer infecção viral em videira. Pretende-se também pôr em prova a capacidade e sensibilidade de detecção dos testes ELISA-indirecto em placa e em membrana em relação a este ácido nucleico.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Relação Antígeno-Anticorpo

2.1.1 - Antígeno

Um **antígeno** é qualquer substância capaz de induzir uma resposta imunológica quando introduzida num animal vertebrado (Van Regenmortel, 1982; Mernaugh *et al.*, 1990). Estas substâncias são normalmente moléculas bastante grandes (massa molecular superior a 5 KDa) ou partículas que consistem em, ou contêm, proteínas ou polissacáridos estranhos às espécies em que são introduzidas (Matthews, 1991). Regra geral, um organismo não induz uma resposta imunológica contra as suas próprias proteínas (Van Regenmortel, 1982).

Um antígeno tem duas formas de actividade. Por um lado, pode estimular um animal a produzir anticorpos que irão reagir especificamente com o antígeno. Este aspecto é conhecido por **imunogenicidade**. Por outro lado, deve ser capaz de se combinar com o anticorpo específico produzido, ao que se chama **antigenicidade** da partícula (Matthews, 1991).

Segundo Van Regenmortel (1982), a capacidade de um dado animal revelar a imunogenicidade de uma substância depende do facto de aquele possuir ou não células linfóides (linfócitos B) dotadas de receptores capazes de se combinar especificamente com o respectivo antígeno. Por sua vez, a reactividade antigénica (ou antigenicidade) de determinada substância descreve a sua capacidade de se ligar àqueles receptores. Esta reactividade reside em zonas restritas da molécula, conhecidas como determinantes ou epítopes, que possuem uma estrutura tridimensional complementar ao local de ligação da molécula do anticorpo (Mernaugh *et al.*, 1990). Uma substância pode exhibir um ou mais epítopes, dependendo da sua massa molecular (Wistreich e Lechtman, 1988).

Estirpes de vírus de um mesmo grupo podem possuir estruturas superficiais muito semelhantes e, por essa razão, anticorpos produzidos em resposta a uma determinada estirpe podem reagir com outras estirpes do mesmo vírus. À reacção do

antígeno com o antissoro para ele produzido chama-se **reacção homóloga**; a reacção com um antissoro produzido para um antígeno diferente denomina-se de **heteróloga** (Bercks *et al.*, 1972).

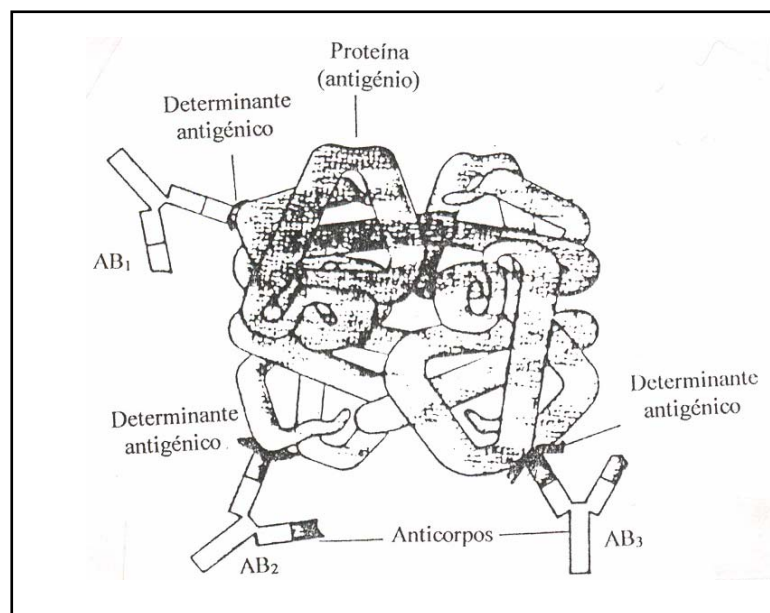


Fig 1 - Antígenos e seus determinantes. Os antígenos podem apresentar na sua constituição vários determinantes, tendo cada um deles capacidade de reagir com um anticorpo específico (adaptado de Brock e Madigan, 1991).

2.1.2 - Anticorpos

2.1.2.1 - Definição de anticorpo

A resposta imunológica de um animal vertebrado à presença de antígenos estranhos é a produção de anticorpos (Matthews, 1991).

Os **anticorpos** são proteínas pertencentes ao grupo das imunoglobulinas capazes de se ligar aos antígenos por reconhecimento do determinante do antígeno que lhe deu origem (Van Regenmortel, 1982; Mernaugh *et al.*, 1990).

As globulinas estão presentes no soro de todos os animais mas, depois de estes sofrerem imunização, aparecem novos tipos, que diferem dos inicialmente existentes pelo facto de reagirem especificamente com o agente imunogénico (Gibbs e Harrison, 1976). Assim, os anticorpos encontrados num **antissoro** (soro após imunização)

formam uma população heterogénea de imunoglobulinas, que se distinguem pelas suas propriedades físicas, químicas e serológicas (Matthews, 1991).

2.1.2.2 - Estrutura dos anticorpos

Existem 5 classes de imunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, mas todas têm uma estrutura básica semelhante, que consiste em duas cadeias leves (L, do inglês *light*) idênticas e duas cadeias pesadas (H, do inglês *heavy*) também idênticas, ligadas entre si por forças não covalentes e ligações bissulfeto (Van Regenmortel, 1982; Wistreich e Lechtman, 1988; Mernaugh, 1990). As diferentes classes distinguem-se pelas diferentes cadeias pesadas, sendo as cadeias leves iguais em todas as classes (Van Regenmortel, 1982).

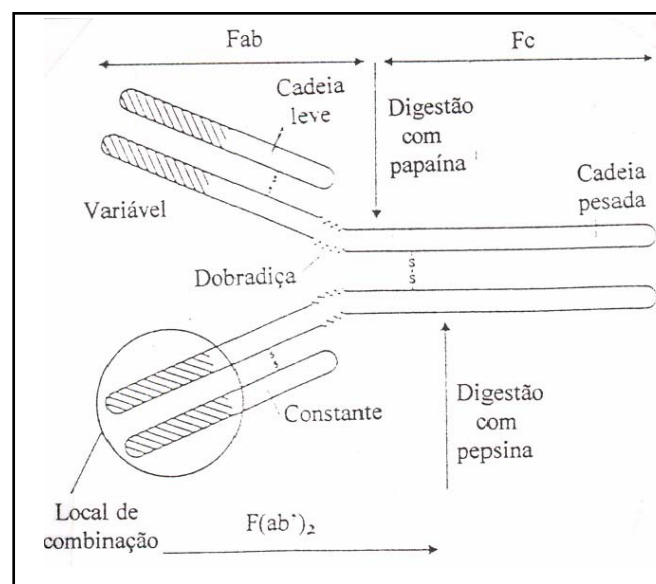


Fig. 2 - Estrutura básica das principais imunoglobulinas presentes no soro (adaptado de Fox, 1993).

As imunoglobulinas IgG e IgM são as que aparecem nos soros em maior quantidade e são as únicas que, até agora, foram implicadas em reacções serológicas com vírus de plantas (Matthews, 1991). Segundo Van Regenmortel (1982), a classe de IgG, por si só, constitui aproximadamente 75% do total de imunoglobulina.

Como se pode observar na Fig. 2, a estrutura básica das moléculas de IgG consiste em duas cadeias L (de massa molecular 25 KDa) e duas cadeias H (de massa

molecular 50 KDa), ligadas por uma ponte bissulfito simples. O anticorpo IgG é bivalente, ou seja, tem dois locais específicos (determinantes) que se combinam com dois antígenos. Estes dois locais de ligação encontram-se na extremidade (região hipervariável) de ambos os braços da molécula em forma de Y (Van Regenmortel, 1982) e consistem numa "armação" constituída por uma sequência relativamente estável de aminoácidos interrompida por várias regiões com sequências altamente variáveis. Estas regiões hipervariáveis interagem para formar os dois locais de ligação, altamente específicos, aos antígenos (Matthews, 1991).

O uso de enzimas e outros tratamentos químicos na digestão e separação das moléculas de imunoglobulinas em partes mais pequenas revelou a existência de várias subregiões funcionais (Wistreich e Lechtman, 1988). A hidrólise de IgG com papaína dá origem a três fragmentos, dois dos quais (Fab) (ambos com uma cadeia leve e outra pesada) possuem igual dimensão e capacidade de ligação com os antígenos. O terceiro fragmento (Fc), constituído apenas por cadeias pesadas, não tem capacidade de se ligar aos antígenos (Mernaugh *et al.*, 1990), mas apresenta elevada afinidade para uma molécula isolada a partir da parede celular de *Staphylococcus aureus* (Proteína A), que é muito usada na amplificação de vários testes serológicos (Matthews, 1991).

A região entre os fragmentos Fab e Fc confere ao anticorpo a flexibilidade necessária para que os fragmentos Fab operem independentemente (Mernaugh *et al.*, 1990). Por outro lado, a hidrólise daquela molécula com pepsina produz dois fragmentos Fab [F(ab')₂] unidos por ligações bissulfito e um fragmento Fc'.

A IgM é a maior das imunoglobulinas e constitui cerca de 10% das imunoglobulinas totais do soro. Encontra-se na forma de pentâmero com 5 unidades ligadas entre si por pontes bissulfito, cada uma composta igualmente por duas cadeias L e duas cadeias H. Esta imunoglobulina tem 10 potenciais locais de ligação, mas estes podem não se encontrar todos reactivos simultaneamente. É a sequência de aminoácidos da parte N-terminal das cadeias L e H que determina a estrutura terciária e, portanto, a especificidade do local de ligação do anticorpo (Van Regenmortel, 1982)

A concentração de IgA, IgD e IgE no soro é extremamente baixa, representando um papel muito pequeno na resposta imunológica dos animais aos vírus (Van Regenmortel, 1982), pelo que se considera desnecessária a sua descrição detalhada.

Quando um coelho é injectado com um imunogénio, os anticorpos aparecem no sangue normalmente uma semana após estimulação e são principalmente do tipo IgM. A concentração do soro aumenta durante alguns dias, diminuindo em seguida, até atingir o ponto em que poucos anticorpos conseguem ser detectados. Se o animal for injectado novamente com o mesmo imunogénio, o período latente é mais curto, a concentração aumenta mais rapidamente e atinge níveis mais elevados, e os anticorpos, que são principalmente do tipo IgG, permanecem no sangue durante mais tempo do que os do tipo IgM. Estes dois tipos de resposta à imunização são normalmente chamados de **resposta primária** e **resposta secundária** (ou hiperimune) (Gibbs e Harrison, 1976; Wistreich e Lechtman, 1988; Mernaugh *et al*, 1990).

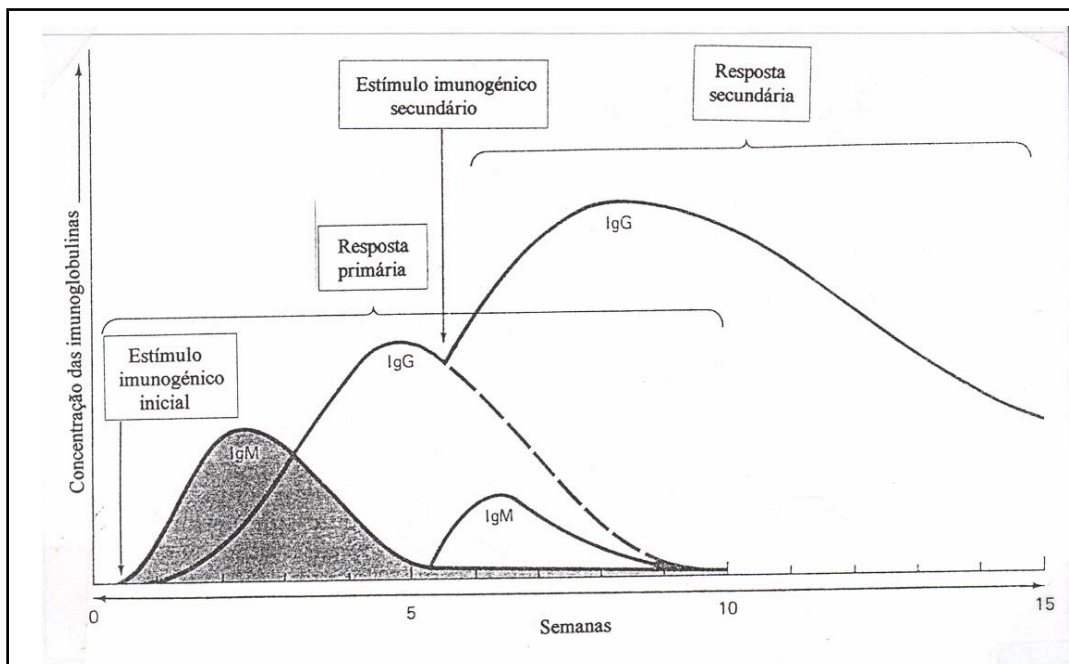


Fig. 3 - Respostas primária e secundária dos anticorpos à presença de determinado antigénio (adaptado de Wistreich e Lechtman, 1988).

2.1.2.3 - Anticorpos policlonais vs anticorpos monoclonais

Uma molécula de proteína antigénica pode ter vários determinantes ou epítopes diferentes na sua superfície que podem ser reconhecidos pelo receptor da molécula de IgG de algumas linhas de linfócitos B. Deste modo, para qualquer antigénio com estas

características, pode haver muitos linfócitos B com diferentes locais de ligação que serão estimulados pelo antigénio. Daqui resulta a formação de **anticorpos policlonais**.

No entanto, e como seria desejável, os linfócitos B não podem ser multiplicados *in vitro*. Para tentar ultrapassar este problema, Kohler e Milstein (1975) promoveram a fusão entre estas células (retiradas de um rato imunizado) e uma linha de células de mieloma cancerígeno (e portanto de crescimento contínuo) de rato (Wistreich e Lechtman, 1988; Matthews, 1991; Fox, 1993). Com este procedimento, conseguiram seleccionar células individuais (hibridomas) com capacidade biossintética de produzir um único tipo de anticorpos - **anticorpos monoclonais**- a partir de um único tipo de linfócitos B (Clausen, 1988; Matthews, 1991). Esta técnica encontra-se ilustrada na Fig. 4.

Durante os anos 80 registou-se um crescimento explosivo no interesse pelo uso de anticorpos monoclonais (Mabs) em muitos aspectos da investigação de vírus fitopatogénicos, em particular na detecção e diagnóstico (Matthews, 1991).

De facto, Matthews (1991) e Fox (1993) referem-se às inúmeras vantagens deste tipo de anticorpos sobre os anticorpos policlonais. A produção de anticorpos monoclonais exige pequenas quantidades de imunogénio quando da imunização dos animais (normalmente ratos), sem se colocar o problema da purificação de imunogénio de cada vez que se pretende produzir anticorpos (inerente à obtenção de anticorpos policlonais). Uma vez seleccionada uma linha de células de hibridoma, uma quantidade infindável desse mesmo anticorpo pode ser obtida, pois o hibridoma pode ser imortalizado por armazenamento em azoto líquido e infinitamente reproduzido. Este facto permite que se proceda a uma uniformização do tipo de anticorpos usados pelos diferentes laboratórios, eliminando-se o problema da variabilidade de resultados que normalmente ocorre devido ao uso de diferentes tipos de anticorpos. Por outro lado, e por reconhecerem um só epítotope, os Mabs tornam possível diferenciar patogénios sistematicamente próximos.

No entanto, estes anticorpos apresentam também algumas limitações. Embora a sua elevada especificidade seja normalmente encarada como um factor positivo, pode tornar-se menos vantajosa quando se pretende detectar mais do que uma estirpe de um patogénio e também porque aumenta a sensibilidade dos anticorpos a possíveis

alterações conformacionais dos antígenios. Outro problema destes anticorpos é o facto de a produção de hibridomas ser ainda relativamente dispendiosa em material, equipamento, tempo e mão de obra.

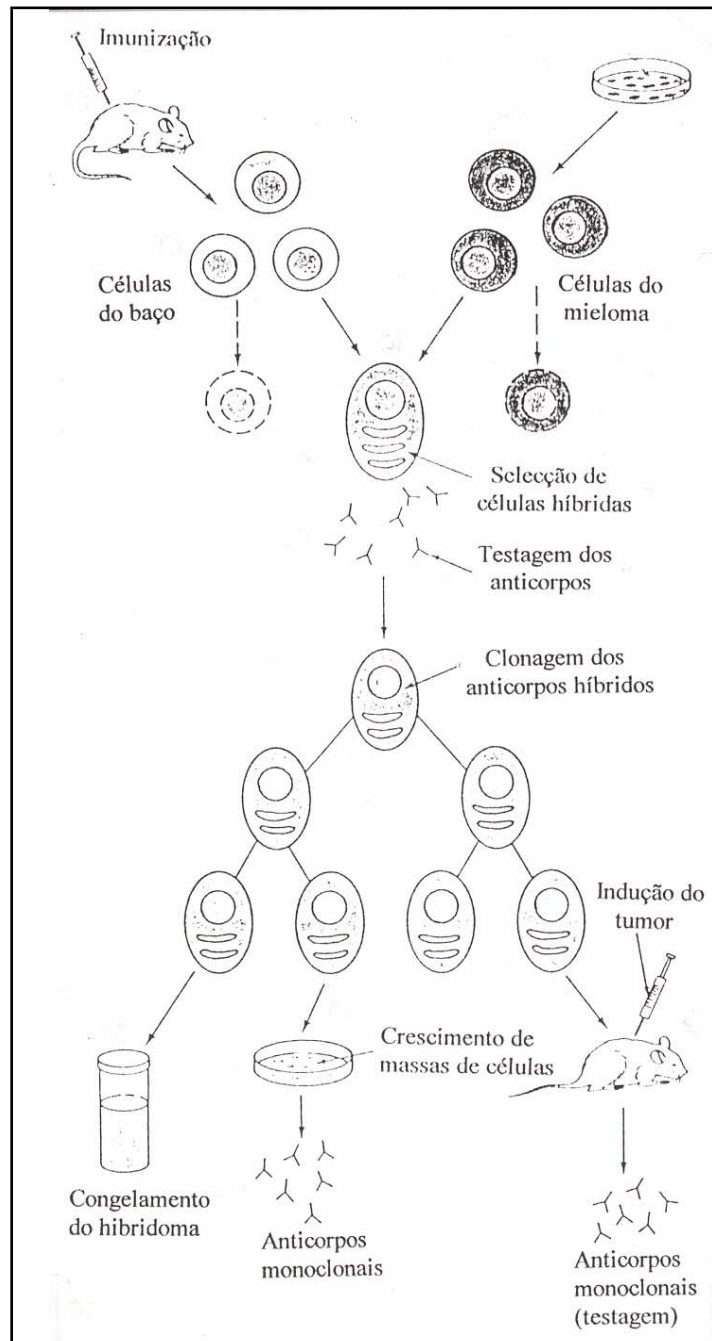


Fig. 4 - Formação de hibridomas e produção de anticorpos monoclonais (adaptado de Wistreich e Lechtman, 1988).

Por estas razões, e embora os Mabs se ofereçam como excelentes instrumentos na investigação de fitopatogénios, é pouco provável que estes venham a substituir totalmente o uso de anticorpos policlonais.

2.1.3 - Interações antigénio / anticorpo

A interacção entre um antigénio e um anticorpo envolve pontes de hidrogénio e de sais, cargas electrostáticas e forças de Coulomb, van der Waal's e hidrofóbicas.

A força desta interacção (**afinidade**) é, contudo, reversível por acção da temperatura, pH e estado de conservação dos solventes. Se estes factores sofrerem alterações significativas, os resultados de testes como o ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), que fazem uso de antigénios e anticorpos, podem ser alterados (Mernaugh *et al.*, 1990).

A capacidade de formação de complexos imunológicos estáveis designa-se por **avidez** e está directamente relacionada com a quantidade de locais de combinação presentes na imunoglobulina (Mernaugh *et al.*, 1990) e com a sua especificidade. Anticorpos com baixa avidez são muito específicos e apenas reagem com determinantes de antigénios homólogos, enquanto anticorpos com elevada avidez são menos específicos e reagem também, ainda que debilmente, com determinantes ligeiramente diferentes (antigénios heterólogos) (Gibbs e Harrison, 1976).

2.2 - Produção de anticorpos policlonais

2.2.1 - Purificação de antigénio

Para vários agentes fitopatogénicos, antissoros, mono e policlonais, podem ser adquiridos comercialmente. No entanto, são caros e por vezes apresentam baixa concentração de anticorpos. Desta forma, é aconselhável aos laboratórios que trabalham no campo da imunoquímica preparar os seus próprios antissoros e, para que esse empreendimento se torne viável, devem ocupar-se também da preparação dos antigénios adequados à sua produção (Clausen, 1988).

Os antissoros são produzidos através da imunização de animais com antígenos (por exemplo vírus) total ou parcialmente purificados (Bercks *et al.*, 1972) ou com moléculas (proteínas, glicoproteínas, lipoproteínas, lipopolissacáridos e carboidratos) que sejam estranhas ao animal (Clausen, 1988; Fox, 1993). Com raras exceções, a parte antigenicamente activa de uma partícula viral é a sua proteína, particularmente a parte externa da capa proteica que envolve o ácido nucleico (Gibbs e Harrison, 1976).

É sempre aconselhável usar preparações de vírus ou moléculas purificadas e concentradas, uma vez que, para além de o animal produzir anticorpos para todos os imunogénios injectados, incluindo as impurezas, poucos são os vírus que se encontram nas plantas em concentrações suficientemente elevadas para provocar imunogenicidade, para além de que a seiva de algumas plantas é tóxica para os animais.

Hoje em dia, procede-se normalmente à purificação e concentração das partículas de vírus, quando se pretende imunizar animais para obtenção de antissoro (Gibbs e Harrison, 1976).

Recentemente, com o desenvolvimento da biologia molecular, tem-se desenvolvido as técnicas baseadas na expressão *in vitro* de proteínas. Inserindo uma determinada sequência codificante (por exemplo a parte do genoma do vírus responsável pela codificação do nucleocapsídeo) num vector (por exemplo *E. coli*), é possível produzir uma proteína semelhante à que se obtém pelos métodos clássicos de purificação de proteínas. Por exemplo, para o vírus do enrolamento foliar da videira GLRaV-3, Ling *et al.* (1997a,b) procederam à sequenciação e clonagem do gene que codifica a proteína do capsídeo, obtendo por expressão *in vitro* anticorpos policlonais para este vírus.

2.2.2 - Imunização

2.2.2.1 - Animais usados

Todos os animais vertebrados são capazes de produzir anticorpos (Gibbs e Harrison, 1976). No entanto, coelhos, galinhas, porquinhos-da-índia, ratos e ratazanas são as espécies mais mencionadas na bibliografia (Ball *et al.*, 1990).

a) *Coelhos* - Estes são os animais mais usados na produção de anticorpos policlonais para vírus de plantas (Van Regenmortel, 1982; Ball *et al.*, 1990), uma vez que respondem bem aos fitopatogénios e produzem volumes de soro convenientes às necessidades (Ball *et al.*, 1990; Matthews, 1991). Por outro lado, são também fáceis de manter e reproduzir (Gibbs e Harrison, 1976; Ball *et al.*, 1990), o que torna possível o uso de um grande número de animais. Este é um factor de elevada importância, uma vez que estes, individualmente, podem variar bastante na sua resposta imunológica a um determinado antigénio (Clausen, 1988). Para evitar problemas de variação nas respostas entre animais, Ball *et al.* (1990) recomendam a imunização de pelo menos dois animais, para qualquer antigénio.

b) *Galinhas* - Embora as galinhas sejam animais fáceis de manter e bons produtores de anticorpos, raramente têm sido usadas na produção de antissoros contra vírus de plantas. Hu *et al.* (1985) e Pereira (1986) apontam como principais limitações ao uso desta espécie a paragem de posturas após injeção e a morte do animal injectado.

O uso de anticorpos de aves é particularmente importante em testes indirectos de DAS-ELISA (*double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay*) que requerem o uso de anticorpos virais produzidos em 2 espécies diferentes de animais. Van Regenmortel (1982) adianta que, uma vez que os anticorpos das galinhas não reagem serologicamente com imunoglobulinas de mamíferos, anticorpos antivirais de galinhas podem ser usados no revestimento das placas em testes imunológicos indirectos em que são usados também anticorpos antivirais de coelho e por fim anticorpos de cabra-anti-coelho marcadas com enzima.

No entanto, Carvalho (1998) obteve, em testes deste tipo (IgG específica do vírus produzida em galinha - antigénio - bloqueio - IgG específica produzida em coelho - conjugado enzimático específico para IgG de coelho produzido em cabra - substrato), resultados com elevadas reacções de "background" usando anticorpos de galinha, o que pode significar reacção directa entre ambos. Esta reacção pode, contudo, ser indicativa de deficiência na purificação dos anticorpos policlonais existentes.

Quando se usa galinhas poedeiras na imunização, os anticorpos podem ser facilmente obtidos a partir dos seus ovos, por precipitação com polietileno glicol (Polson *et al.*, 1980 cit. por Van Regenmortel, 1982; Pereira, 1986), uma vez que

aqueles são transferidos do sistema imunológico e se concentram na gema dos ovos (Clausen, 1988).

c) *Ratos* - Embora seja normalmente aceite que os ratos são menos eficientes na produção de antissoros do que os coelhos, quando são feitas comparações baseadas na quantidade de imunogénio injectada por quilograma de peso corporal obtém-se resultados satisfatórios relativamente à concentração dos antissoros dos ratos. Desta forma, quando o material imunogénico se encontra disponível em pequenas quantidades, torna-se certamente vantajoso imunizar ratos (Van Regenmortel, 1982).

No entanto, e segundo o mesmo autor, as maiores vantagens do uso de ratos assentam na possibilidade de utilização de linhas puras, o que minimiza as variações de cariz genético na resposta imunológica de animais individuais, e de produção de anticorpos monoclonais através de hibridomas.

d) *Outros animais* - Grandes volumes de soro podem ser obtidos a partir de animais maiores como ovelhas, cabras e cavalos mas, nestes casos, é necessária uma maior quantidade de antigénio para a imunização, para além de que são mais difíceis e caros de manter (Ball *et al.*, 1990).

Van Regenmortel (1982) afirma também a vantagem do uso de rãs na produção de antissoros, uma vez que podem ser benéficos com antigénios instáveis à temperatura corporal dos animais de sangue quente.

2.2.2.2 - Factores a considerar quando da imunização

Vários estudos analisados por Ball (1974) demonstraram que a variação da resposta em animais injectados com antigénios depende do sistema imunológico do próprio animal, via e calendário de imunização, altura das colheitas de sangue e quantidade de antigénio imunizante injectado, sendo portanto essencial considerar estes factores quando se pretende comparar a reacção imunológica de fitopatogénios.

a) *Via de injeção* - Diferentes vias de injeção usadas na imunização de animais oferecem diferentes resultados e nenhum dos vários métodos apresentados pode ser mais recomendado que outro (Ball, 1974).

O imunogénio pode ser injectado no animal de várias formas: intravenosa (na circulação sanguínea do coelho através da veia marginal da orelha); intramuscular (normalmente no músculo da coxa); intradérmica ou subcutânea (no tecido conectivo da pele do dorso) ou directamente num nódulo linfático (Gibbs e Harrison, 1976).

Segundo Ball (1974), injeções intravenosas na veia marginal da orelha de um coelho dão normalmente origem a um soro mais diluído do que a mesma quantidade de antigénio (diluída em adjuvante de Freund) injectada no músculo da coxa.

Os anticorpos atingem normalmente a sua máxima concentração 2 semanas após uma injeção intravenosa, e cerca de 4 a 8 semanas após uma injeção intramuscular ou subcutânea (Gibbs e Harrison, 1976). Efectuam-se geralmente combinações de injeções intravenosas e intramusculares em coelhos ao longo de um período de várias semanas ou meses (Torrance, 1992)

b) *Número de injeções e quantidade de imunogénio injectado* - São produzidos mais anticorpos para determinada quantidade de imunogénio quando este é dividido e injectado em pequenas quantidades durante determinado período de tempo do que quando é todo administrado numa só injeção (Gibbs e Harrison, 1976). Por outro lado, a quantidade injectada deve ser tão pequena quanto possível, de forma a minimizar tanto reacções indesejadas com contaminantes ou componentes menores como a indução à tolerância (Ball, 1974; Torrance, 1992).

A concentração de um antissoro não é directamente proporcional à quantidade de imunogénio introduzida; a resposta é do tipo acréscimo decrescente. Embora quantidades de pelo menos 1 mg de antigénio sejam normalmente injectadas de cada vez, existem provas de que quantidades de 50-100 µg podem ser suficientes para induzir uma resposta imunológica satisfatória. De facto, a maioria dos investigadores usa, desnecessariamente, doses de antigénio demasiado elevadas na imunização e, no caso de antigénios de difícil obtenção, um estudo cuidadoso da dose mínima necessária revela-se de grande importância (Van Regenmortel, 1982).

c) *Outras substâncias injectadas com o imunogénio* - Nem todas as macromoléculas são igualmente antigénicas e é por vezes difícil uma produção significativa de anticorpos apenas com a injeção de antigénio puro (Clausen, 1988). No caso de injeções intramusculares ou subcutâneas, a preparação de antigénio é normalmente misturada,

antes de injectada, com adjuvantes que aumentam a sua imunogenicidade. O mais usado é o **adjuvante de Freund**. A sua forma **incompleta** consiste numa parafina mineral (85%) e num agente emulsificante (15% oleato de manitol); a forma **completa** contém, ainda, 0,05% (p/v) de *Mycobacterium butyricum* morta e liofilizada.

O objectivo do adjuvante é actuar como "reservatório" de antigénio no tecido muscular, permitindo uma libertação lenta e estimulando, portanto, a produção de mais anticorpos do que se a mesma quantidade de antigénio fosse introduzida no animal como solução aquosa. (Ball *et al.*, 1990). Uma injeção intramuscular de imunogénio emulsificado com adjuvante de Freund dá origem a um antissoro mais concentrado, uma vez que o adjuvante provoca uma reacção inflamatória que influencia positivamente a formação de anticorpos (Bercks *et al.*, 1972) e, principalmente quando é usada a sua forma completa, a concentração de anticorpos no animal decresce mais lentamente (a forma completa do adjuvante é normalmente mais eficaz na indução da resposta imunológica) (Gibbs e Harrison, 1976). Quando se segue um processo de imunização baseado em injeções intramusculares, na primeira injeção usa-se normalmente adjuvante completo e as seguintes são administradas com a sua forma incompleta. Diminui-se, desta forma, a possibilidade de desenvolvimento de abscessos no local de injeção. (Ball *et al.*, 1990).

É importante a obtenção de uma emulsão antigénio-adjuvante completa e estável e existem dois meios de a obter: esguichando-a repetidamente com uma seringa hipodérmica ou usando um vibrador ultrasónico. De ambas as formas, o produto deve ser uma emulsão espessa e cremosa (Ball *et al.*, 1990).

d) *Intervalo entre injeções; calendários de imunização* - Conclui-se, do que foi dito anteriormente, que a forma mais eficiente de produzir antissoro policlonal de alta concentração usando coelhos é injectando quantidades moderadas de imunogénio (até 1 mg) a intervalos de tempo relativamente longos, usando um adjuvante (Gibbs e Harrison, 1976).

Segundo Bercks *et al.* (1972), duas injeções intramusculares (IM) dadas com uma semana de intervalo podem iniciar um processo de imunização a longo prazo comparável ao induzido por um maior número de injeções intravenosas (IV). O soro

obtido após injeções IM com quantidades suficientes de antigénio estável permanece inalterado no animal por longos períodos.

Ball *et al.* (1990) consideram que calendários de imunização longos, requerendo mais antigénio, resultam normalmente em maior variabilidade e quantidade de anticorpos do que calendários mais curtos, mas podem produzir anticorpos de menor especificidade. O calendário de imunização proposto por estes autores envolve duas injeções IM e uma IV de 1-2 mg de antigénio cada, administradas a intervalos semanais.

Um calendário de imunização citado por Gibbs e Harrison (1976) consiste em administrar, de início, uma injeção intravenosa, seguida, depois de 4 semanas, de uma injeção intramuscular em cada uma das coxas traseiras do coelho e, depois de 2 semanas, mais uma injeção intramuscular.

Um calendário tão simples como 3 injeções IM a intervalos semanais foi levado a cabo por Carvalho e Pereira (1996, 1997) com sucesso.

2.2.3 - Colheita de Sangue

A determinação do nível de anticorpos é feita periodicamente, através da colheita de amostras de sangue do animal imunizado. Uma vez atingida a concentração de anticorpos desejada, sangra-se o animal (Wistreich e Lechtman, 1988). Quando se segue uma via de imunização intravenosa, o máximo é normalmente atingido uma semana após a última injeção, enquanto que com imunizações intramusculares são necessárias 3 a 4 semanas (Bercks *et al.*, 1972).

Segundo Van Regenmortel (1982), podem ser tirados a um coelho até 50 ml de sangue a intervalos de duas semanas ao longo de um período de um ano sem que isso interfira com a saúde de um animal com cerca de um ano de idade e um peso de 4 Kg.

Gibbs e Harrison (1976) adiantam que cerca de 20 ml de sangue podem ser colhidos de um coelho adulto durante três dias consecutivos. Quinze dias depois, o animal pode ser novamente injectado com antigénio (para aumentar a produção de anticorpos) e, alguns dias depois, sangrado. Contudo, há que ter em consideração que

cada injeção de antigénio administrada ao animal conduz a uma perda de especificidade do antissoro pelo que, quando se necessita um soro muito específico, é aconselhável matar o coelho e recolher todo o seu sangue.

Em coelhos, o sangue pode ser obtido por várias vias: cardíaca, arterial e venal (Ball *et al.*, 1990). Por punctura cardíaca, é possível recolher 10 a 20 ml de sangue em apenas 15 a 30 segundos, a intervalos semanais. Com o animal preso de costas, uma agulha é inserida no lado esquerdo do esterno, direccionando-a para o centro do peito e, uma vez ultrapassado o diafragma, aplica-se uma pequena sucção à medida que a agulha se move lentamente. Após colhida a quantidade de sangue necessária, a agulha é rapidamente retirada. Este procedimento não provoca, normalmente, nenhum dano à saúde do animal (Ball *et al.*, 1990), mas envolve a necessidade de recorrer a anestesia (Gibbs e Harrison, 1976; Ball *et al.*, 1990).

Menores riscos para a saúde do animal estão envolvidos quando se procede a uma sangria venal ou arterial. No primeiro caso, é usada a veia marginal da orelha, enquanto no segundo se procede à sangria a partir da artéria central (Ball *et al.*, 1990). O princípio seguido é semelhante em ambos os casos.

Pequenas amostras de 20 ml de sangue podem ser colhidas a partir da orelha do coelho, usando uma seringa hipodérmica ou fazendo um pequeno corte, com uma lâmina de barbear, no vaso a usar (Gibbs e Harrison, 1976). Para tal, promove-se a sua irritação com algodão embebido em xilol (de forma a provocar a dilatação do vaso) e procede-se de seguida à sua punctura ou corte (Ball, 1974; Ball *et al.*, 1990).

Para aumentar a sangria, a orelha pode ser massajada com o polegar e o indicador, de forma a promover a circulação do sangue na ponta da orelha. Este procedimento torna-se importante em coelhos que sangram pouco (Ball *et al.*, 1990).

Também no caso das galinhas se pode seguir um protocolo de colheita de sangue via punctura cardíaca ou venal. No entanto, consegue isolar-se mais facilmente imunoglobulinas a partir da gema dos ovos de galinhas imunizadas, ovos esses que são recolhidos diariamente (Pereira, 1986; Ball *et al.*, 1990).

2.2.4 - Obtenção e armazenamento de antissoro

As amostras de sangue oriundas de animais imunizados ficam a coagular durante cerca de 1-2 horas à temperatura ambiente e são depois colocadas no frigorífico (4 °C), onde permanecem durante a noite (Bercks *et al.*, 1972; Ball, 1974; Gibbs e Harrison, 1976; Van Regenmortel, 1982; Clausen, 1988; Ball *et al.*, 1990). O coágulo deve ser separado das paredes do copo ou tubo com uma vareta, de modo a evitar a perda de soro ainda nele existente (Clausen, 1988; Ball *et al.*, 1990). Embora não seja um procedimento "standard", aquecer o sangue, após coagulação, a 37 °C durante 30 minutos ajuda a encolher o coágulo, aumentando o seu rendimento em soro (Ball *et al.*, 1990).

Após refrigeração durante a noite, o soro é decantado e centrifugado a baixa velocidade durante 10 min., para remoção das células sanguíneas, fibras, etc (Bercks *et al.*, 1972; Gibbs e Harrison, 1976; Ball *et al.*, 1990). O soro obtido deve ser translúcido e de cor amarelo-palha. Soros provenientes de coelhos que tenham sido alimentados recentemente apresentam-se normalmente turvos, pelo que os animais devem entrar em jejum 12 horas antes da colheita de sangue. Como alternativa a este procedimento, podem ser misturados no soro tetraclorometano ou clorofórmio para melhorar a clarificação (Gibbs e Harrison, 1976).

Quando armazenados correctamente, os antissoros permanecem activos durante vários anos (Gibbs e Harrison, 1976). Podem ser armazenados a 4 °C com aditivos antissépticos. Para este efeito, o glicerol, azida de sódio e metiolato são os antissépticos mais mencionados na bibliografia, mas existem outras alternativas como o tetraclorofenol de carbono ou o clorofórmio (Bercks *et al.*, 1972; Gibbs e Harrison, 1976; Van Regenmortel, 1982; Clausen, 1988; Ball *et al.*, 1990). Contudo, Clausen (1988) chama a atenção para a possibilidade de efeitos adversos como toxicidade ou inibição de actividade enzimática quando se usa antissépticos em reagentes imunoquímicos.

Por sua vez, Gibbs e Harrison (1976) consideram arriscado o uso de metiolato, uma vez que pode causar resultados anómalos em testes de difusão em agar. Van Regenmortel (1982) partilha também desta opinião, sugerindo o uso de azida de sódio, em detrimento do uso de metiolato, na prevenção de contaminação microbiana.

Van Regenmortel (1982) considera que a forma mais simples e eficaz de armazenamento dos antissoros é a sua congelação a -20 °C em pequenas ampôlas ou liofilização (i.e, secagem em vácuo enquanto congelados e armazenamento também em vácuo).

Estudos efectuados por Waterworth *et al.* (1973, cit. por Van Regenmortel, 1982) acerca dos efeitos das diferentes condições de armazenamento na actividade dos antissoros demonstraram que a sua qualidade diminui após armazenamento a 37°C, mas mantém-se inalterável após armazenamento a -70 °C, -20 °C, 4 °C e 26 °C. A liofilização provou ser mais eficiente do que a adição de glicerol ou azida de sódio como meio de preservação do antissoro a 37 °C.

Estes autores consideram também que congelamentos e descongelamentos repetidos não têm, aparentemente, qualquer efeito negativo. Ball *et al.* (1990) têm, em relação a este aspecto, opinião oposta, considerando que a repetição destas operações deve ser evitada, caso ao antissoro não tenha sido adicionado glicerol.

2.2.5 - Purificação de IgG

O uso de antissoros "inteiros" (i.e. sem a purificação da IgG) é adequado para alguns testes de rotina. No entanto, para a maioria dos testes serológicos o uso de IgG purificada melhora os seus procedimentos. Também o uso de reagentes marcados (enzimas, isótopos ou fluorescentes) em alguns métodos requer soro fraccionado (Ball, 1974).

Os protocolos de purificação de IgG envolvem a precipitação da IgG por sulfato de amónia e encontram-se extensamente descritos por vários autores (Van Regenmortel, 1982; Pereira, 1986; Clausen, 1988; Ball *et al.*, 1990; Carvalho, 1998).

2.3 - Técnicas imunológicas de identificação

2.3.1 - Testes serológicos

Os fitopatologistas têm feito um uso cada vez maior dos métodos serológicos na detecção e caracterização de vírus. Estes métodos baseiam-se em reacções antigénio-anticorpo e é na elevada especificidade destas reacções que reside a sua maior valia (Ball, 1974).

Diferindo apenas na sua conveniência e sensibilidade (Gibbs e Harrison, 1976), a escolha do teste serológico mais adequado depende da experiência e do objectivo do operador, uma vez que cada técnica contribui, à sua maneira, para um melhor conhecimento do patógeno em estudo (Ball, 1974).

De entre os testes serológicos existentes, os ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) são, actualmente, os mais divulgados.

Estes testes foram originalmente aplicados à detecção de vírus por Avrameas, em 1969 (cit por Converse e Martin, 1990), que demonstrou que, ligando covalentemente uma molécula de imunoglobulina a uma enzima, se podia reter a imunoespecificidade da primeira e as propriedades catalíticas da segunda. A aplicação destes reagentes ligados a uma fase sólida permitia a amplificação da sensibilidade de detecção das reacções antigénio-anticorpo, conduzindo a detecção serológica a limites que antes apenas eram atingidos por testes radioimunológicos (Converse e Martin, 1990).

Este princípio teve, inicialmente, aplicações médicas (Voller *et al.*, 1976). No entanto, desde a sua introdução na fitopatologia por Clark e Adams (1977), os testes ELISA têm sido cada vez mais usados na detecção e estimativa quantitativa de um grande número de antígenos, tornando-se o ponto crucial dos esquemas de certificação de plantas (Fox, 1993).

Quando devidamente usados, e com uma amostragem adequada ao antígeno em causa, estes testes denotam uma elevada sensibilidade, fiabilidade e rapidez de detecção e são especialmente eficazes quando um grande número de amostras tem que ser testado

(Matthews, 1981). São testes simples que podem ser desenvolvidos correctamente pela maioria das pessoas após um breve treino e alguma prática.

2.3.1.1 - Princípios gerais

Embora não seja necessário um treino intensivo, a realização destes testes exige o conhecimento de alguns conceitos básicos no campo da serologia.

Um pré-requisito para se poder proceder a um ELISA é ter uma fonte de anticorpos específicos para o patogénio a detectar. Isto significa que o antigénio específico (o patogénio ou parte dele) deve ser devidamente identificado e purificado, de forma a produzir os anticorpos necessários (Garnsey e Cambra, 1993). Actualmente existem vários anticorpos específicos de um grande leque de fitopatogénios comercializados por várias firmas (ex: AGRITEST, Bari, Itália; SANOFI Diagnostics Pasteur, INRA, France; LOEWE Phytodiagnosics, Germany; BIOREBA AG, Switzerland; ADGEN, United Kingdom).

Também fundamental é o conceito de que várias **enzimas** podem ser acopladas aos anticorpos para formar um conjugado com actividade não só serológica como também enzimática, com o objectivo de amplificar o sinal da reacção serológica a níveis detectáveis.

Por outro lado, e uma vez que as enzimas são altamente activas e podem ser detectadas a baixas concentrações, são eficazmente usadas como **marcadores** (Converse e Martin, 1990; Garnsey e Cambra, 1993). Com marcadores enzimáticos obtém-se uma sensibilidade semelhante à dos marcadores radioactivos, apresentando até algumas vantagens em relação a estes: são estáveis, baratos e seguros, podendo ser usados com sucesso sem necessidade de recorrer a equipamento caro e sofisticado (Garnsey e Cambra, 1993).

Duas enzimas são normalmente usadas na conjugação com anticorpos: a fosfatase alcalina (AP) e a peroxidase de rábano (horseradish peroxidase - HRP) (Converse e Martin, 1990; Fox, 1993). A primeira é relativamente estável e, normalmente, não reage com o extracto da planta. Embora seja relativamente cara, apresenta uma reactividade bastante elevada perante o p-nitrofenil-fosfato (substrato),

com o qual origina uma coloração amarela. Para ser totalmente eficaz na desfosforilação do substrato, esta enzima requer um meio com pH alcalino, no valor óptimo de 9,8 (Converse e Martin, 1990).

A HRP é uma alternativa mais barata à enzima anterior, sendo contudo considerada menos fiável, uma vez que, embora não reaja com o extracto de planta, este pode conter polifenol-oxidases ou peroxidases que podem hidrolisar o substrato e conduzir, assim, a resultados falsos positivos. Esta enzima apresenta também uma elevada reactividade com o substrato (originando cor azul) e funciona a valores de pH próximos do neutro (Converse e Martin, 1990).

Segundo Garnsey e Cambra (1993), os conjugados mantêm-se inalteráveis durante longos períodos desde que armazenados a 4 °C e, no caso de ser necessária a sua congelação (-20 °C), estes autores recomendam a adição de 50% de glicerol.

Os **substratos** mais usados com a HRP são tetrametil-benzidina-dihidrocloreto (TMB) e o-fenilenodiamina (OPD). Ambos requerem, no entanto, a adição de peróxido de hidrogénio.

Com a AP, p-nitrofenil-fosfato é o substrato preferencialmente usado. Esta substância deve ser armazenada a -20 °C e preparada com o tampão apropriado antes de cada utilização. O contacto do substrato com superfícies ricas em AP (bancadas, material, pele humana) deve ser evitado, para que não haja perigo de aparecimento de resultados falsos positivos.

O desenvolvimento da reacção deve ocorrer à temperatura ambiente, começando a cor a surgir alguns minutos após o contacto do substrato com a enzima (Converse e Martin, 1990).

Anticorpos marcados com enzimas podem, portanto, ser detectados quando expostos a um substrato enzimaticamente alterável (Converse e Martin, 1990; Garnsey e Cambra, 1993). Enquanto muitos testes serológicos dependem da avaliação de um precipitado antigénio-anticorpo, nos testes ELISA ocorre uma alteração de cor, que pode ser lida electronicamente com um espectrofotómetro ou, mais grosseiramente, avaliada a olho nú (Fox, 1993), dependendo do tipo de teste. A taxa de alteração de cor registada é usada para medir a quantidade de anticorpos presente e conseqüentemente a quantidade de antigénios na amostra.

Um outro conceito fundamental para ELISA é o de proteínas como os anticorpos e os capsídeos dos vírus terem uma forte capacidade de adsorção a certos plásticos, como o poliestireno, ou certas formas de nitrato de celulose. Estes materiais são chamados de **fase sólida** e funcionam como materiais de suporte dos testes ELISA (Garnsey e Cambra, 1993).

As fases sólidas mais usadas em ELISA são as placas rectangulares de poliestireno com 96 alvéolos e as membranas de nitrocelulose. Placas de polivinil são também usadas, mas tendem a apresentar reacções não específicas de "background" superiores às apresentadas por placas de poliestireno.

Vários devem ser os cuidados a ter com as placas para que não haja problemas de variações nos resultados obtidos. A sua uniformidade, assim como da temperatura de incubação, reveste-se de grande importância, não devendo o coeficiente de variação entre alvéolos ser superior a 5%. A lavagem das placas entre cada fase deve ser totalmente eficaz, de forma a remover completamente todas as macromoléculas que não estão ligadas especificamente à placa (Converse e Martin, 1990).

A adsorção indesejada de anticorpos ou antigénios à fase sólida pode ser evitada usando detergentes não iónicos (dos quais o Tween 20 é o mais usado) nas soluções a incubar ou adicionando um excesso de uma proteína não específica (por exemplo, leite magro, BSA, ovalbumina) para bloquear todos os locais não ocupados pelo componente desejado (Garnsey e Cambra, 1993).

2.3.1.2 - Técnicas de amplificação dos testes ELISA

Reacções serológicas não específicas ocorrem frequentemente quando se usa concentrações elevadas de anticorpos na detecção de antigénios. Estas reacções podem ser diminuídas aumentando a diluição da solução de anticorpos, mas neste caso é necessário amplificar o sinal das reacções até níveis detectáveis (Durand, 1990).

Muitas interacções moleculares são frequentemente usadas em conjugação com ELISA, com o sentido de amplificar reacções e aumentar a sensibilidade (Garnsey e Cambra, 1993).

Para além do uso de **enzimas**, que têm uma função não só de marcação da reacção serológica como amplificativa das reacções (como já foi referido), uma das técnicas mais divulgadas na amplificação de reacções baseia-se no uso de **anticorpos secundários**, com o objectivo de aumentar a sensibilidade por amplificação do efeito de camadas sucessivas de diferentes anticorpos.

Outro método de amplificação de reacções é o uso de **proteína A**. Esta proteína é um componente da parede celular da bactéria *Staphylococcus aureus* e possui a característica de se ligar à imunoglobulina de várias espécies de mamíferos, para além de poder também ser conjugada com enzimas e usada nos testes para detectar imunoglobulinas (Garnsey e Cambra, 1993). Uma vez que se liga forte e especificamente à porção Fc da imunoglobulina (Converse e Martin, 1990), é frequentemente usada na purificação de anticorpos por afinidade cromatográfica. (Garnsey e Cambra, 1993) ou nos testes ELISA no revestimento da fase sólida antes da colocação dos anticorpos específicos.

O sistema **biotina/avidina** é também usado. A biotina, uma pequena vitamina, tem grande afinidade para com a avidina, uma glicoproteína de elevada massa molecular (Converse e Martin, 1990; Garnsey e Cambra, 1993). Cada molécula de avidina contém 4 locais de ligação para a biotina e, por outro lado, anticorpos e enzimas podem ser conjugados com várias moléculas de biotina. Esta interacção multiplicativa tem sido explorada de forma a amplificar o número de moléculas de enzima associada a cada anticorpo, por sua vez ligado a um antigénio, aumentando a sensibilidade do teste (Pereira, 1986).

2.3.1.3 - Testes ELISA

Embora numerosas variantes de testes ELISA tenham sido experimentadas e publicadas por diversos autores (Clark e Adams, 1977; Field *et al.*, 1980; Zanzinger e Tavantzis, 1982a,b; Converse e Martin, 1990; Aramburu *et al.*, 1991; Fox, 1993; Garnsey e Cambra, 1993), existem duas técnicas base em que se apoiam todas as outras (Converse e Martin, 1990):

- Técnicas directas - O marcador enzimático encontra-se directamente ligado ao anticorpo usado para detectar o antigénio em questão, dos quais os mais comuns são o DAS-ELISA (double antibody sandwich) e o dot-ELISA ou DIBA.

- Técnicas indirectas - Neste caso, a enzima é acoplada não ao anticorpo usado na detecção do antigénio, mas a um segundo anticorpo, específico para o primeiro. Destas técnicas, sobressaem o ID-ELISA (ELISA indirecto) e o ID-DIBA.

Este trabalho vai debruçar-se apenas sobre as linhas gerais das técnicas mais importantes e mais usadas na detecção serológica de vírus.

2.3.1.3.1 - DAS-ELISA

Esta é a forma mais simples dos testes ELISA usados na detecção de fitopatogénios, desde a sua descrição por Clark e Adams (1977). Trata-se de um teste directo, que tem como fase sólida placas de poliestireno com 96 alvéolos.

A placa é inicialmente revestida com anticorpos específicos para o antigénio a detectar, sendo posteriormente adicionada a amostra a testar. Os antigénios específicos para os anticorpos ligam-se a eles e todas as moléculas não específicas são removidas por lavagem. Ao antigénio assim ligado, é adicionada uma solução de anticorpos conjugados com enzima, sendo esta associação detectada pela adição de um substrato (Converse e Martin, 1990; Garnsey e Cambra, 1993).

A descrição pormenorizada desta técnica, assim como dos reagentes usados, é apresentada por Clark e Adams (1977) e Converse e Martin (1990).

2.3.1.3.2 - ELISA-indirecto

Este teste coincide em quase todas as fases com o DAS-ELISA. No entanto, nesta técnica, após a colocação do antigénio segue-se a adição do anticorpo específico para o antigénio e só posteriormente é adicionada a enzima conjugada a um anticorpo específico para aquele anticorpo intermédio (anticorpos de uma espécie são antigénicos quando injectados num animal de outra espécie). Por exemplo, as imunoglobulinas do coelho podem ser injectadas num outro animal, como a cabra, para criar anticorpos cabra anti-coelho (GAR - goat anti-rabbit). Estes anticorpos são úteis na detecção de

anticorpos de coelhos, que por sua vez são preparados para detectar o antigénio (Converse e Martin, 1990; Garnsey e Cambras, 1993).

Esta técnica, embora envolva uma fase adicional, é mais sensível, e permite também o uso de conjugados anticorpo-enzima comercialmente preparados, evitando-se desta forma a necessidade de preparação de um conjugado específico para cada antigénio (Garnsey e Cambra, 1993).

2.3.1.3.3 - Dot-immunobinding assay (DIBA) ou dot-ELISA

Durante muitos anos, os testes ELISA em placas alveoladas foram o método de escolha na detecção de vírus, pelas suas inúmeras características. No entanto, as reacções usadas em placas alveoladas podem ser transpostas para membranas com algumas vantagens (Fox, 1993).

Trabalhos realizados por Powell (1987a) demonstraram a elevada fiabilidade das técnicas DIBA, assim como a sua maior rapidez e acessibilidade em relação ao preço relativo dos materiais. Hsu (1996), por sua vez, demonstrou, em testes realizados com TSWV (tomato spotted wilt virus), uma sensibilidade destes testes oito vezes superior à dos ELISA em placa.

Uma grande desvantagem em relação aos testes em placas alveoladas deve-se ao facto de os resultados serem mais dificilmente quantificados, razão pela qual os DIBA são usados particularmente no diagnóstico de rotina para detecção de positivos *vs* negativos (Powell, 1987a).

Relativamente ao suporte físico destes testes, e embora a bibliografia se refira com maior frequência ao uso de membranas de nitrocelulose, Hammond e Jordan (1990) defendem que membranas de nylon, também usadas com a mesma finalidade, apresentam maior capacidade de ligação às proteínas, assim como maior resistência ao manuseamento.

Estas técnicas, também designadas por “dot-blot immunoassay” ou dot-ELISA, seguem o mesmo princípio dos testes em placas de poliestireno. No entanto, a enzima (normalmente a AP), ao reagir com o substrato solúvel, forma um produto colorido

insolúvel que precipita no local da reacção, indicando assim quais das amostras contêm o antigénio em causa (Hammond e Jordan,1990).

Os protocolos para estas técnicas encontram-se descritos por Powell (1987a), Serwood *et al.* (1987) e Hu *et al.*(1991).

2.3.1.4 - Outras técnicas serológicas

2.3.1.4.1 - "Tissue-print immunoassay"

A detecção imunológica de vírus requer, normalmente, a extracção dos antigénios virais dos tecidos das plantas a testar, o que pode, por vezes, tornar-se moroso e incómodo.

De forma a contornar este contra-tempo, Lin *et al.* (1990) descrevem um método de indexagem rápido e prático, denominado "tissue-print immunoassay" em membrana de celulose e que consiste na obtenção de amostras (tissue-blot) por pressão directa da superfície dos tecidos a testar (cortados de fresco) contra uma membrana de celulose, procedendo-se de seguida a testes imunológicos do tipo ELISA.

O "tissue-print immunoassay" conserva as características de especificidade, sensibilidade, fiabilidade e rapidez dos testes ELISA e DIBA, sem que seja necessário recorrer à preparação prévia do material a testar. Por outro lado, torna possível a visualização , ainda que de uma forma indirecta, da distribuição dos antigénios virais nos tecidos vegetais (Hsu, 1996).

Em Portugal, esta técnica tem sido usada com sucesso na detecção de TSWV e INSV em plantas hortícolas e ornamentais ((Louro, 1996).

2.3.1.4.2 - Western blotting

Esta técnica envolve a transferência, por electroforese ou capilaridade passiva, de proteínas ou glicoproteínas de geis de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose, sendo depois feita uma prova imunológica por reacção com anticorpos e um sistema de detecção.

A principal vantagem do Western-blotting em relação ao DIBA é que a reactividade dos anticorpos pode ser correlacionada com proteínas de determinada massa molecular, mesmo quando presentes em misturas complexas, uma vez que aquelas migram para locais diferentes do gel, dependendo do seu tamanho e forma.

O gel contendo as proteínas electroforéticamente separadas é posto em contacto com uma membrana e, por corrente eléctrica ou simples capilaridade, as proteínas são transferidas de um meio para o outro. Estas são postas a incubar com antissoro específico e a sua reacção com os anticorpos é depois visualizada e comparada com um gel-padrão (Hammond, 1990; Fox, 1993; Hsu, 1996; Carvalho, 1998).

2.3.1.4.3 - Imunoprecipitação

Quando quantidades adequadas de antígeno e anticorpos capazes de se reconhecer mutuamente entram em contacto, desenvolve-se um complexo que resulta do estabelecimento de ligações entre os respectivos locais de ligação, complexo esse que se torna insolúvel e precipita (Martelli, 1993a).

Existem vários tipos de testes em que a formação deste complexo se observa através da sua precipitação:

- **Precipitação em tubo** - neste teste, antígeno e antissoro diluídos em meio neutro são misturados num tubo de vidro, observando-se a formação gradual de um precipitado. As quantidades mais adequadas de ambos são testadas através de diferentes diluições.

- **Microprecipitação** - esta técnica é semelhante à precipitação em tubo, mas mais económica. Envolve menores quantidades de antissoro (algumas gotas) e apresenta maior sensibilidade, uma vez que pequenos flóculos não visíveis a olho nú podem ser observados ao microscópio (Gibbs e Harrison, 1976; Ball, 1990c; Martelli, 1993a).

- **Imunodifusão em gel** - estes testes apenas podem ser usados com antígenos que se difundem através de geis de agar. Pode usar-se duas técnicas: difusão simples, em que o antígeno se difunde no meio contendo anticorpos uniformemente distribuídos pelo agar (Ball, 1990a; Slack e Ball, 1990); ou difusão dupla, na qual antígenos e anticorpos são colocados em "alvéolos" separados (cortados no agar) e, à medida que se

difundem, forma-se uma banda de precipitação na zona onde se encontram em proporções óptimas (Gibbs e Harrison, 1976; Ball, 1990a,b). Esta técnica apresenta a vantagem de revelar a presença de diferentes antigénios em determinada amostra, uma vez que diferentes antigénios apresentam diferentes "zonas de encontro" com os anticorpos (Martelli, 1993a).

Esta técnica encontra-se desenvolvida por Purcifull e Batchelor (1977) e Ball (1990a).

2.3.1.4.4 - Imunomicroscopia electrónica (IME)

O princípio geral da IME é a captura do vírus numa grelha pré-revestida com um antissoro específico e visualização directa das interacções antigénio-anticorpo por microscopia electrónica. Hu *et al.* (1991) adiantam ainda que a "decoração", que consiste num segundo tratamento das partículas fixadas com antissoro antes da coloração, pode fornecer resultados conclusivos nas amostras duvidosas do teste ELISA.

Esta técnica encontra-se descrita em numerosos trabalhos (Van Regenmortel, 1982; Hu *et al.*, 1991; Martelli, 1993b; Louro, 1996).

Existe o consenso de que a IME é uma técnica altamente fiável (não existem falsos positivos), tão sensível como o ELISA, rápido (os resultados podem ser obtidos em apenas uma a duas horas) e operacionalmente simples.

No entanto, a IME requer a utilização de um microscópio electrónico (que apenas existe numa pequena percentagem de laboratórios) e pessoal especializado, podendo ultrapassar-se estes problemas preparando as amostras a testar e enviando-as para observação em laboratórios devidamente equipados (Martelli, 1993b). Por outro lado, esta técnica não se adapta a testes de rotina de larga escala, pelo facto de se processar um reduzido número de amostras em comparação com o ELISA (Hu *et al.*, 1991).

2.3.1.4.5 - Testes radioimunológicos (RIA)

Os RIA têm recebido relativamente pouca atenção na detecção e identificação de vírus fitopatogénicos. Apresentam algumas vantagens sobre os testes ELISA, como uma menor variabilidade nos resultados e um maior potencial em ensaios quantitativos em que se pretende detectar diferentes estirpes de vírus. No entanto, e embora tenham sido considerados ligeiramente mais sensíveis do que os testes DAS-ELISA, o recente desenvolvimento de numerosos sistemas de amplificação das técnicas ELISA (que tornou questionável aquela vantagem), assim como o perigo inerente ao uso de marcadores radioactivos, tem conduzido ao gradual abandono deste tipo de testes (Hill, 1990).

2.3.2 - Técnicas de análise e detecção de ds-RNA

A maioria dos vírus fitopatogénicos contém, no seu genoma, ácidos ribonucleicos monocatenários (ss-RNA) e apenas uma pequena percentagem tem RNA bicatenário (ds-RNA) na sua constituição (Jones, 1992).

O ss-RNA tem, no entanto, capacidade de replicação no interior de células vegetais infectadas por vírus, dando origem a uma forma replicativa de ds-RNA (Valverde *et al.*, 1990; Matthews, 1991).

Considerando que plantas saudáveis não contêm quantidades detectáveis de ds-RNA, a sua presença em extractos de plantas é uma forte indicação de infecção viral (Dodds *et al.*, 1984; Boscia, 1993). Assim, o ds-RNA detectado pode ter origem num genoma viral com ds-RNA ou, mais frequentemente, numa forma replicativa de ss-RNA, pelo que, segundo Morris e Dodds (1979), a sua análise se torna um método fiável e seguro de indexagem de material vegetal, uma vez que qualquer tipo de RNA viral pode ser detectado. Teoricamente, só um vírus cujo genoma seja constituído por DNA (que representa menos de 10% dos vírus fitopatogénicos conhecidos) estaria fora das possibilidades desta técnica (Nolasco e Sequeira, 1992).

A análise de ds-RNA em plantas infectadas é normalmente efectuada através de extracção dos ácidos nucleicos com perclorato de sódio ou fenol-clorofórmio, purificação do ds-RNA por coluna cromatográfica de celulose e sua análise por

electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (Dodds *et al.*, 1984; Valverde *et al.*, 1990; Nolasco e Sequeira, 1992; Carvalho, 1998).

Uma vez que este método de detecção requer procedimentos bastante laboriosos, as técnicas serológicas para detecção de ds-RNA apresentam-se como uma boa alternativa na indexagem de material, quando não é prioritário conhecer a identidade do patogénio (Aramburu e Moreno, 1994). Segundo Field *et al.* (1980), a necessidade de métodos simples, altamente sensíveis e específicos, tanto na quantificação de anticorpos para ds-RNA como na detecção de pequenas quantidades deste ácido ribonucleico, pode ser satisfeita por testes ELISA.

À semelhança do que foi anteriormente descrito, as técnicas serológicas para detecção de ds-RNA baseiam-se na produção de antissoros mono ou policlonais para polinucleótidos sintéticos bicatenários [por exemplo, poli(A):poli(U) (ácido poliadenínico:poliuracílico) ou poli(I):poli(C) (ácido poliinosínico:policitidílico)] e seu uso na detecção de ds-RNA de origem viral em plantas e têm sido aplicados por vários autores (Moffit e Lister, 1973; Miller, 1979; Field *et al.*, 1980; Gould e Francki, 1981; Zanzinger e Tavantzis, 1982a,b; Garcia-Luque *et al.*, 1986; Powell, 1987b; Aramburu *et al.*, 1991; Aramburu e Moreno, 1994; Carvalho e Pereira, 1997; Carvalho, 1998).

Miller (1979) constatou, em trabalhos efectuados com partículas de RNA de poliovírus que, tanto ss-RNA como ds-RNA reagem com anticorpos contra ds-RNA, embora a avidéz dos anticorpos fosse maior para o segundo do que para o primeiro.

No entanto, estudos efectuados mais tarde por Gould e Francki (1981) comprovaram a sensibilidade limitada destes testes na detecção de formas replicativas de ds-RNA (com origem em ss-RNA), mesmo quando eram usados ácidos nucleicos purificados ou semi-purificados. Estes autores não encontraram, em várias plantas de diferentes famílias infectadas com TRSV (tobacco ringspot virus) e TMV (tobacco mosaic virus), quantidades de ds-RNA suficientes para as distinguir de plantas sãs, pelo que concluíram que não é fiável o uso de anticorpos para poli(I):poli(C) como reagente de largo espectro de acção na detecção de baixas concentrações de ds-RNA associadas a infecções provocadas por vírus cujo genoma contém ss-RNA. Mas estes trabalhos foram desenvolvidos com testes de imunodifusão, dupla ou simples, técnica à qual se reconhecem várias limitações.

Estas conclusões não excluem, no entanto, o seu uso na detecção ou estimacão de ds-RNA em organismos infectados por vírus com genoma do tipo ds-RNA (Moffit e Lister, 1973).

O sistema de detecção de ds-RNA por ELISA é caracterizado por Zanzinger e Tavantzis (1982a) como apresentando elevada especificidade para com o ds-RNA, assim como pela ausência de reacções não específicas (“background”), uma vez que a poli(I):poli(C) é detectável a concentrações tão baixas como 1-10 ng/ml. Estes autores apresentam resultados positivos na detecção do viróide do tubérculo em fuso da batateira (PSTVd - potato spindle tuber viroid), formas replicativas de TMV e preparações de ds-RNA de vírus de fungos. Field *et al.* (1980) obtiveram reactividade de MU9 ds-RNA (forma replicativa derivada de MU9, um mutante de "amber-coat protein" do bacteriófago MS2) com anticorpos para poli(I):poli(C).

Protocolos de produção de antissoro para o polinucleótido poli(I):poli(C) e das condições óptimas de detecção de ds-RNA a partir de plantas infectadas com vírus por ELISA indirecto e DIBA usando extractos semipurificados foram publicados por Aramburu *et al.* (1991) e Carvalho (1998).

3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Material e métodos

3.1.1 - Preparação e manutenção dos coelhos

Iniciou-se o biotério com vista à produção de anticorpos policlonais para apoio ao diagnóstico fitiátrico na Secção de Protecção de Plantas da UTAD.

Procedeu-se à desinfecção da sala dos coelhos da Secção de Parasitologia e Higiene Animal (Edifício das Clínicas Veterinárias) através da sua atomização, incluindo comedouros e bebedouros, com uma solução de 200 mL de antigermina em 10 L de água.

Posteriormente, foram adquiridos 6 coelhos do tipo “coelho doméstico” com cerca de 4 a 6 semanas de idade, que foram de imediato vacinados contra a doença vírica hemorrágica, "Cylop-HVD", através de uma injeção subcutânea de 1 mL de vacina inactivada com uma seringa com agulha do tipo 21G×5/8". Em relação à Mixomatose, os animais foram adquiridos já vacinados com Mixomate, sendo apenas necessário reforçar-se a vacina 6 meses após a primeira administração.

Foi ainda efectuada uma desparasitação aos animais (tratamento da coccidiose) com Whitsyn-S (Agrovete), por inclusão desta substância na água de beber (15 mL para 10L de água), sendo também adicionado a esta um concentrado vitamínico (RENATEX, da Agrovete) a uma diluição de 10 g para 10 L de água.

A manutenção dos animais em gaiolas individuais consistiu em alimentação *ad libitum* (ração da CUF e água) e limpeza da sala 3 vezes por semana.

3.1.2 - Imunização com proteína sintética

Para a produção de anticorpos policlonais para a detecção serológica de ds-RNA, foram usados 2 coelhos. Na imunização dos animais foi usada uma proteína sintética bicatenária [poli(I):poli(C), estéril, Pharmacia, ref. 27-4729-01], reconstituída

a partir de 50 mg de produto liofilizado em 25 mL de PBS (obtendo-se, portanto, uma solução a 2 mg/mL). A proteína foi, desta forma, armazenada em tubos eppendorf (1 mL/tubo) a -20 °C.

Seguindo o protocolo de Aramburu *et al.* (1991), com ligeiras alterações, a produção de antissoro para poli(I):poli(C) foi induzida a partir de 5 injeções semanais¹ em cada coelho (Quadro 1).

Quadro 1 - Data das imunizações.

	16/12/97	23/12/97	30/12/97	06/01/98	13/01/98	19/01/98
Coelho 4	1 ^a	2 ^a	-	3 ^a	4 ^a	5 ^a
Coelho 6	1 ^a	2 ^a	-	3 ^a	4 ^a	5 ^a

Todas as injeções foram administradas por via intramuscular, embora as duas primeiras tenham sido dadas na coxa e as três últimas ao longo do dorso. A solução de antigénio administrada a ambos os animais foi emulsificada em igual volume de adjuvante de Freund incompleto, perfazendo um volume total de 1 mL, embora no coelho 4 tenha sido usada uma solução de polinucleótido a 2 mg/mL, enquanto no coelho 6 essa solução se encontrava a uma concentração de 1 mg/mL.

3.1.3 - Colheita de sangue

As colheitas de sangue a ambos os animais iniciaram-se uma semana após a última injeção de antigénio e decorreram a intervalos semanais, num total de 6 colheitas para o coelho 4 e 2 colheitas para o coelho 6 (Quadro 2). Através dos testes ELISA entretanto efectuados, verificou-se a reduzida qualidade do antissoro do coelho 6, pelo que este animal deixou de ser usado no ensaio logo após a 2^a colheita.

¹ Por impossibilidade de administração da 3^a injeção na devida altura, o período decorrido entre a 2^a e 3^a injeções foi de duas semanas.

Quadro 2 - Data das colheitas de sangue.

	27/01/98	03/02/98	11/02/98	18/02/98	05/03/98	12/03/98
Coelho 4	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a
Coelho 6	1 ^a	2 ^a	-	-	-	-

As colheitas de sangue seguiram a seguinte metodologia:

- colocou-se o coelho num suporte de madeira apropriado, com as patas para trás, de forma a mantê-lo imobilizado e, com uma lâmina de barbear, cortou-se os pêlos na periferia da orelha esquerda;

- a zona escanhoada foi desinfectada com algodão embebido em álcool e promoveu-se a sua irritação com xilol, de forma a aumentar o volume da veia periférica (é conveniente o operador calçar luvas, para não contactar directamente com o xilol);

- colocou-se um copo de vidro por debaixo da zona a cortar e com a lâmina de barbear, fez-se um corte longitudinal na veia, recolhendo-se o sangue (15 a 20 mL) para o copo;

- para estacar o sangue, comprimiu-se a zona do corte com algodão seco ou embebido em água oxigenada;

- os cortes seguintes foram efectuados sempre no sentido da base para a ponta da orelha.

3.1.4 - Separação e armazenamento do antissoro

Após cada colheita de sangue, procedeu-se à separação do respectivo soro (antissoro) e sua preparação para armazenagem. Esta tarefa foi efectuada da seguinte forma:

- Deixou-se coagular o sangue à temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas;

- Colocou-se o sangue num funil de vidro e deixou-se a coar no frigorífico durante a noite, para dentro de um tubo de centrífuga (para segurar o coágulo, colocou-se uma vareta de vidro entre este e o funil);

- Na manhã seguinte, centrifugou-se o soro obtido a 10000 rpm durante 7 minutos (centrífuga Sorvall SS-3 Automatic Centrifuge, DuPont Instruments) e guardou-se o sobrenadante (antissoro “inteiro”) em tubos eppendorf, em doses de 1 mL por tubo;

- As doses foram armazenadas no congelador (-20 °C), sendo uma dose destinada a testar o soro e as restantes para posterior purificação de IgG.

3.1.5 - Caracterização serológica dos antissoros

3.1.5.1 - Avaliação da evolução da reactividade do antissoro “inteiro”

3.1.5.1.1 - ELISA- indirecto em placa (ID-ELISA)

Para testar a reactividade dos antissoros obtidos foram efectuados testes ID-ELISA em microplacas de poliestireno de 96 alvéolos do tipo Nunc ImmunoPlot Maxi Sorp, segundo o protocolo apresentado por Aramburu *et al.* (1991). Após cada colheita de sangue foi efectuado um teste individual ao respectivo soro (num total de 6 testes para o coelho 4 e 2 testes para o coelho 6) de forma a estudar a sua reactividade (qualidade em termos de produção de anticorpos específicos para o antigénio injectado) e, após a última colheita, foi feito um teste conjunto, com todos os antissoros obtidos, para assim se poder concluir acerca da evolução da reactividade do antissoro produzido pelos animais ao longo do tempo.

A metodologia seguida baseou-se no método inicialmente proposto por Clark e Adams (1977), alterado por Aramburu *et al.* (1991):

- **Revestimento da placa com Poli-L-Lisina** - A partir de uma solução stock de 2 mg/mL de Poli-L-Lisina em água, preparou-se uma solução de 4µg/mL em tampão de revestimento (Na₂CO₃ 0,015M e NaHCO₃ 0,035M, pH 9,6). A placa sofreu então uma incubação a 4 °C durante a noite dentro de uma caixa com papel húmido, para evitar evaporação excessiva.

- **Adição de antigénio [poli(I):poli(C)]** (foi usada uma solução stock, previamente preparada, de 2 mg/mL em PBS-T, pH 7,4). Nesta fase foram usadas 9 diluições sucessivas (20×) de antigénio (no primeiro teste foram apenas usadas 7 diluições),

sendo a primeira de 10 µg/mL (diluições efectuadas em PBS-T: NaCl 0,14M, KH₂PO₄ 2mM, Na₂HPO₄ 8mM, KCl 2mM pH 7,4). Seguiu-se incubação a 37 °C durante 3 horas.

- **Bloqueio da placa** - Para efectuar o bloqueio dos locais não revestidos foi usado PBS-T com 4% de leite em pó magro, efectuando-se de seguida uma incubação de cerca de 1 hora e 30 minutos a 37 °C.

- **Adição de antissoro** - Os antissoros foram diluídos em PBS-T, tendo sido testadas duas diluições diferentes para cada um: 1/500 e 1/1000. Nesta fase, as placas foram a incubar a 37 °C durante 4 horas.

- **Adição de conjugado** - Nesta fase foi usado soro anti-coelho produzido em cabra (goat-anti-rabbit - GAR) conjugado com fosfatase alcalina (AP) (Sigma), numa diluição de 1/30000 em PBS-T. A incubação ocorreu durante 16 horas a 4 °C.

- **Adição do substrato enzimático (p-nitrofenil-fosfato)** - A solução de substrato foi efectuada diluindo 1 mg de p-nitrofenil fosfato em cada mL de tampão de substrato (dietanolamina 9,6%, pH 9,8). A reacção de hidrólise decorreu à temperatura ambiente, tendo sido efectuadas 2 leituras de absorvância para cada teste (30 minutos e 1 hora e 20 minutos após a colocação do substrato) num espectrofotómetro Labsystems Multiscan MCC/340 com o filtro de 405 nm (A405 nm), calibrado para zero com solução de substrato na 1ª coluna.

Para cada fase descrita, as quantidades necessárias foram calculadas de modo a que em cada alvéolo fossem colocados 100 µL de solução, excepto na fase de bloqueio, em que cada alvéolo recebeu 200 µL de solução. Após cada uma das fases, foram efectuadas 3 lavagens à placa com PBS-T em máquina própria e sua secagem contra papel absorvente.

3.1.5.1.2 - ELISA-indirecto em membrana (DIBA)

O teste ELISA-indirecto em membrana foi desenvolvido com base nos trabalhos realizados por Powell (1987a), Sherwood *et al.* (1987) e Hu *et al.* (1990a).

Neste caso o suporte físico consistiu numa membrana de nitrocelulose do tipo Zeta-Probe Blotting Membranes (Bio-Rad Laboratoires), dividida em quadrículas com 8

mm de lado, havendo em todo o manuseamento da membrana o cuidado de operar com luvas ou pinça, de modo a evitar o contacto directo daquela com a pele humana.

Todas as fases que a seguir se descrevem (incubações e lavagens) foram efectuadas com agitação a 50 rpm:

- **Adição de antigénio** - após imersão da membrana em TBS-T (Tris-HCl 0,05M, NaCl 0,15M, pH 7,5 com 0,05% de Tween 20) durante cerca de 10 minutos e sua secagem durante 1 hora à temperatura ambiente, procedeu-se à colocação de 2 μ L de antigénio (à semelhança do que foi feito no teste ELISA em placa, foram usadas 9 diluições de poli(I):poli(C) e TBS-T como controlo negativo) na membrana e deixou-se secar durante 2 horas a 80 °C e meia hora à temperatura ambiente (a nitidez dos resultados depende de uma secagem total da amostra).

- **Bloqueio** - nesta fase procedeu-se à saturação da membrana com uma solução a 4% de leite em pó magro em TBS, durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos e efectuou-se de seguida 3 lavagens com TBS-T durante 2 minutos cada.

- **Adição de antissoro** - usou-se duas soluções de antissoro diluído (1/500 e 1/1000) em TBS-T com 2% de leite em pó magro. Fez-se uma incubação de aproximadamente 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente, a que seguiram 3 lavagens com TBS-T de 2 minutos cada.

- **Adição de conjugado** - nesta fase, adicionou-se GAR conjugado com AP à concentração de 1/3000 em TBS-T com 2% de leite em pó magro. Seguiu-se uma incubação durante 1 hora à temperatura ambiente e 3 lavagens de 2 minutos com TBS-T. Após estas lavagens, procedeu-se a nova lavagem, desta vez com tampão AP (Tris 0,1M, NaCl 0,1M e $MgCl_2$ 0,01M, pH 9,5), durante 10 minutos.

- **Adição do substrato** - o substrato enzimático usado foi uma mistura de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP), Nitroblue Tetrazolium (NBT) e tampão AP, nas proporções de 33 μ L BCIP:44 μ L NTB:10 mL tampão AP. Seguiu-se uma incubação de cerca de 10 minutos (15 min. no máximo) e parou-se imediatamente a reacção por imersão da membrana em água destilada (solução de pH mais baixo).

3.1.5.1.3 - Teste de difusão dupla em agar para titulação do antissoro

Como foi anteriormente referido, esta técnica consiste na difusão de antigénio e antissoro em agar. Com este objectivo, foram efectuados testes cuja metodologia assentou nos trabalhos efectuados por Purcifull e Batchelor (1977) e Ball (1990b):

- **Preparação do gel de agar** - Em balão Erlenmayer, preparou-se agar purificado (OXOID, Unipath Ltd) a 1% e levou-se a esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121 °C. O gel foi então distribuído por placas de Petri de 70×10 mm (cerca de 13 mL de gel por placa), sendo estas mantidas a 4 °C. Antes de serem usadas, foram cortados, em cada placa contendo gel solidificado, 7 alvéolos (1 central e 6 periféricos, estes à distância de cerca de 4-5 mm do central) com 7 mm de diâmetro, com um furador de rolhas, sendo a parte interior do alvéolo retirada com a ajuda de uma bomba de vácuo e uma pipeta de Pasteur. Todas estas operações foram efectuadas à chama, de modo a evitar contaminações.

- **Adição dos reagentes** - No que respeita à adição dos reagentes, seguiu-se 2 metodologias diferentes (cada uma em sua placa), sendo colocados 80 µL de reagente por alvéolo:

a) alvéolo central - antissoro (sem diluição);

alvéolos periféricos - 5 diluições de poli(I):poli(C) em água destilada (2 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL), para determinar a concentração ideal de antigénio para o antissoro a testar, e 1 controlo negativo (água destilada);

b) alvéolo central- amostra de poli(I):poli(C) à concentração ideal apresentada pelos resultados obtidos no teste a), que correspondeu à diluição de 0,5 mg/mL;

alvéolos periféricos - 5 concentrações de antissoro (s/ diluição; 1:2; 1:5; 1:10; 1:50), diluído em água destilada, e um controlo negativo (água destilada).

3.1.5.2 - Avaliação da reactividade da IgG purificada

3.1.5.2.1 - Purificação e armazenamento de IgG

Com o objectivo de caracterizar a imunoglobulina G do antissoro produzido, procedeu-se à sua purificação a partir do antissoro obtido na 5ª recolha de sangue do coelho 4, por se considerar o antissoro de melhor qualidade (ver Gráfico 2). Esta purificação foi feita segundo o protocolo de precipitação de IgG por sulfato de amónio, e que a seguir se descreve.

Juntou-se 9 mL de água destilada a 1 mL de antissoro, seguindo-se a adição, lentamente e com agitação, de 10 mL de uma solução de sulfato de amónio saturada (80 g/100 mL). Manteve-se durante 1 a 2 horas à temperatura ambiente, agitando lentamente, e centrifugou-se durante 15 minutos a 10000 rpm. Recolheu-se então o precipitado, que se dissolveu em 2 mL de $\frac{1}{2} \times$ PBS e se dialisou 3 vezes em 500 mL de $\frac{1}{2} \times$ PBS a 4 °C (ferveu-se, antecipadamente, o tubo de diálise em água com 0,01M EDTA e lavou-se convenientemente com água destilada). Diluiu-se a IgG purificada em $\frac{1}{2} \times$ PBS (1:20) e recorreu-se à análise quantitativa por espectrofotometria a 280 nm, de forma a calcular a concentração da gama-globulina ($OD_{280} = 1,4$ correspondendo a 1 mg/mL).

A IgG purificada foi, por fim, armazenada a -20 °C, em tubos eppendorf.

3.1.5.2.2 - ELISA- indirecto em placa (ID-ELISA)

A metodologia seguida encontra-se já descrita em 3.1.5.1.1. Neste teste, para além da IgG purificada (1/500), foi usado o respectivo antissoro (1/500) como termo de comparação, tendo sido usado um esquema de antigénios semelhante ao apresentado no teste 3.1.5.1.1.

3.1.5.2.3 - ELISA-indirecto em membrana (DIBA)

Este teste decorreu conforme a descrição apresentada em 3.1.5.1.2, tanto no que respeita aos métodos como ao esquema de antigénios usados). Também neste caso se recorreu ao uso de antissoro (1/500) como termo de comparação com a IgG (1/500) a testar.

3.1.5.2.4 - Teste de difusão dupla em agar

- **Adição dos reagentes** - Este teste seguiu a metodologia apresentada em 3.1.5.1.3, tendo sido colocados nos vários alvéolos os seguintes reagentes:

a) alvéolo central - IgG purificada (sem diluição);

alvéolos periféricos - 5 diluições de poli(I):poli(C) em água destilada (2 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL) e um controlo negativo (água destilada).

b) alvéolo central - amostra de poli(I):poli(C) à concentração ideal apresentada pelos resultados obtidos no teste a), que correspondeu à diluição de 1 mg/mL;

alvéolos periféricos - 5 diluições de IgG purificada (sem diluição, 1:2, 1:5, 1:10, 1:50) diluído em água destilada e um controlo negativo (água destilada).

3.1.6 - Detecção serológica de ds-RNA com o antissoro produzido

3.1.6.1 - Detecção serológica de ds-RNA em extracto de videira

3.1.6.1.1 - ELISA-indirecto em placa

Neste teste foram usadas amostras de videira infectadas com GLRaV-3 (vírus associado ao enrolamento foliar da videira, serótipo 3) e GFLV (vírus do urticado da videira), em substituição do polinucleótido sintético [poli(I):poli(C)].

A metodologia seguida foi idêntica à apresentada em 3.1.5.1.1 em todas as fases, excepto na colocação do antigénio e do antissoro.

- **Adição do antigénio** - Nesta fase foram usadas oito amostras de videira: cinco amostras infectadas e três amostras sãs (controlo negativo). Como controlo positivo foram usados 2 extractos anteriormente preparados (um infectado com GLRaV-3 e um com GFLV) e uma solução de poli(I):poli(C) à concentração de 10 µg/mL. Foi ainda

incluída uma coluna na qual se colocou apenas PBS-T em substituição do patogénio, de forma a controlar a extensão das reacções não específicas.

Os extractos foram preparados da seguinte forma: as varas de videira a testar foram raspadas com uma navalha, até se obter a quantidade (em peso) de amostra necessária. Esta foi de seguida esmagada num almofariz com o auxílio de azoto líquido até obtenção de um pó e misturada em PBS-T à proporção de 1:5 (p/v). Esta mistura foi então homogeneizada com um dispositivo homogeneizador Ultra-Turrax T25, seguindo-se a sua deposição na placa.

- **Adição de antissoro** - Este teste foi efectuado apenas com o antissoro relativo à 5ª colheita de sangue do coelho 4 e respectiva IgG purificada.

3.1.6.1.2 - ELISA-indirecto em membrana (DIBA)

O esquema de anticorpos e antigénios seguido neste teste foi idêntico ao usado no teste 3.1.6.1.1, tendo sido usadas 2 diluições diferentes de cada antigénio (1/8 e 1/50).

3.1.6.1.3 - Teste de difusão dupla em agar

- **Adição dos reagentes** - Neste teste foram colocados igualmente 80 µl de reagente por alvéolo, da seguinte forma:

- a) alvéolo central - antissoro (sem diluição);
alvéolos periféricos - cinco extratos de amostras de videira (um infectado com GLRaV-3, três a testar e um de amostra sã) preparados de forma idêntica à apresentada no teste 3.1.5.1.2 e um controlo negativo (água destilada).
- b) alvéolo central - IgG purificada (sem diluição)
alvéolos periféricos - cinco extratos de amostras de videira (um infectado com GLRaV-3, três a testar e um de amostra sã) preparados de forma idêntica à apresentada no teste 3.1.5.1.2 e um controlo negativo (água destilada).

3.1.6.2 - Detecção serológica de ds-RNA

3.1.6.2.1 - Purificação de ds-RNA

Utilizou-se vários materiais com diferentes vírus para extração de ds-RNA: videira com GLRaV-3 (amostra lenhosa), *Nicotiana rustica* com um Nepovírus da alface e petúnia com TSWV (amostras herbáceas).

O método usado na extração dos ácidos nucleicos totais a partir de amostras infectadas foi o método do fenol-clorofórmio, descrito por Hu *et al.* (1990b).

No caso das amostras lenhosas, macerou-se cerca de 10 g de material vegetal com azoto líquido, misturando-se o pó resultante com 45 mL de 2× STE, 15 mL de SDS 10%, 0,8 mL de bentonite (40 mg/mL), 1 mL de 2-mercaptoetanol, 25 mL de solução de fenol saturada (com 2× STE e 0,025% de 8-hidroxiquinoleína) e 0,1 mL de NH₄OH. A esta solução adicionou-se ainda 25 mL de clorofórmio-álcool isoamílico na proporção de 24:1 e agitou-se durante 45 minutos à temperatura ambiente. De seguida, centrifugou-se a 8000 rpm durante 15 minutos, de forma a separar os ácidos orgânicos totais da fase orgânica e recolheu-se o sobrenadante, que foi seguidamente filtrado em lã de vidro e diluído com STE até se obter um volume final de 100 mL. No processamento das amostras herbáceas, manteve-se a proporção entre o peso das amostras e o volume das soluções, mas não foi necessário utilizar azoto líquido na maceração.

Ao extracto obtido, adicionou-se etanol a 95% gota a gota com agitação, à temperatura ambiente (de forma a evitar a precipitação dos ácidos nucleicos), até se obter uma concentração de 16,5%. Homogeneizou-se, de seguida, com celulose CF 11 (Sigma, C6288) (2 g para amostras lenhosas e 0,5 g para amostras herbáceas) durante 45 minutos à temperatura ambiente e verteu-se numa seringa invertida (que funciona como coluna de cromatografia), cujo orifício se obturou com lã de vidro para reter a celulose. Procedeu-se de seguida a uma lavagem com 150 mL de STE (50 mL no segundo caso) contendo 16,5% de etanol, de forma a arrastar todos os ácidos nucleicos excepto o ds-RNA. Adicionou-se 1 mL de STE (ou 0,25 no caso das amostras herbáceas) para baixar a concentração de etanol, drenou-se a celulose com uma corrente de ar e recolheu-se o ds-RNA efectuando 3 lavagens com 3 mL de STE seguidas de drenagem. Centrifugou-se o líquido eluído a 8000 rpm durante 3 minutos para eliminar

a celulose, precipitando-se o ds-RNA com três volumes de etanol a 95% guardado a -20 °C e 0,1 volumes de acetato de sódio 3,0M a pH 5,0. Após agitação intensa, incubou-se durante a noite a -20 °C (ou a -70 °C durante 3 horas) e centrifugou-se a 8000 rpm durante 30 minutos.

Procedeu-se de seguida à ressuspensão do precipitado em 0,5 mL de STE, seguindo-se nova precipitação com acetato de sódio e etanol. Centrifugou-se a 13000 rpm durante 15 minutos em tubos eppendorf a 4 °C, ressuspendendo-se o precipitado num volume de tampão TE (Tris 0,04M, EDTA 1mM, pH 7,8) proporcional ao peso inicial da amostra (1 µL/g para os hospedeiros lenhosos e 0,5 µL/g para os hospedeiros herbáceos).

3.1.6.2.2 - ELISA-indirecto em placa

Todo o teste ELISA seguiu a metodologia apresentada em 3.1.5.1.1, tendo sido usados como antigénios um extracto de videira infectado com GLRaV-3, três amostras de ds-RNA purificado (5 g de material vegetal por alvéolo, diluído em TAE), poli(I):poli(C) (10 µg/mL), um controlo negativo (Sanofi) e PBS-T. Neste teste foi usada uma diluição (1/500) do antissoro relativo à 5ª colheita (considerado o de melhor qualidade) e a respectiva IgG purificada (1/500).

3.1.6.2.3 - ELISA-indirecto em membrana

Este teste decorreu de forma semelhante à apresentada em 3.1.5.1.2 e foram usados os mesmos antigénios e antissoro do teste 3.1.6.2.2.

3.1.6.2.4 - Teste de difusão dupla em agar

- Adição dos reagentes - Este teste seguiu a metodologia descrita em 3.1.5.1.3, sendo colocados nos vários alvéolos os seguintes reagentes:

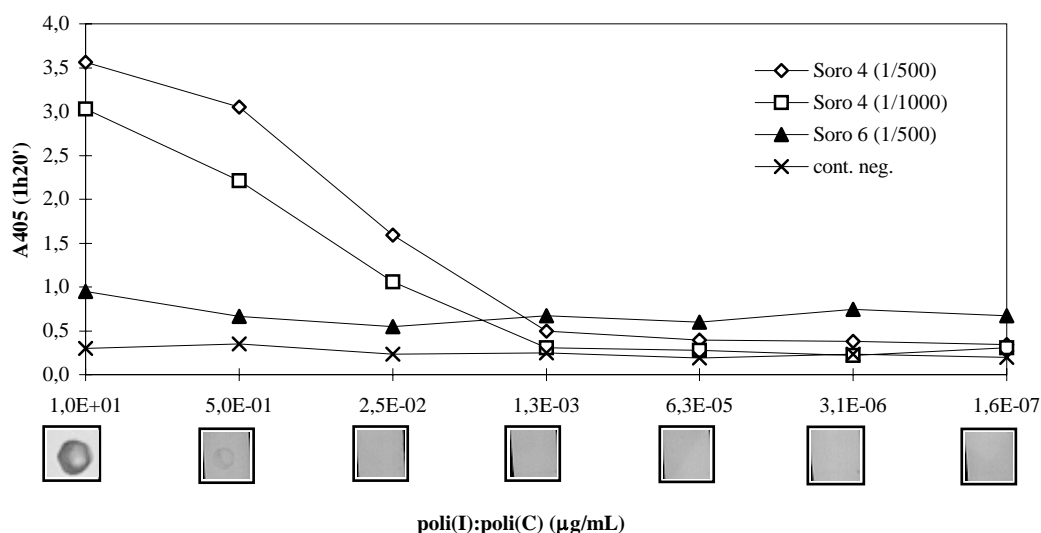
- a) alvéolo central - antissoro (sem diluição);
- alvéolos periféricos - extracto aquoso de videira infectado com GLRaV-3;
- amostra de ds-RNA purificado (0,5 µL dsRNA / 100 µL água destilada);
- poli(I):poli(C) (0,5 mg/mL); extracto aquoso de videira sã; água destilada.

b) alvéolo central - IgG purificada (sem diluição);
alvéolos periféricos - extracto aquoso de videira infectado com GLRaV-3;
amostra de dsRNA purificado (0,5 μ L dsRNA / 100 μ L água destilada);
poli(I):poli(C) (0,5 mg/mL); extracto aquoso de videira sã; água destilada.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Avaliação da evolução da reactividade do antissoro “inteiro”

Com base nos testes serológicos realizados com o objectivo de avaliar a reactividade dos antissoros produzidos e o limiar de detecção dos respectivos anticorpos (relativamente a várias diluições do antigénio para o qual foram produzidos), obtiveram-se resultados dos quais o Gráfico 1 é representativo (os resultados dos testes ID-ELISA em placa relativos a cada colheita de sangue encontram-se no Anexo 1). Consideram-se positivos os valores de absorvância três vezes superiores aos valores do controlo negativo.

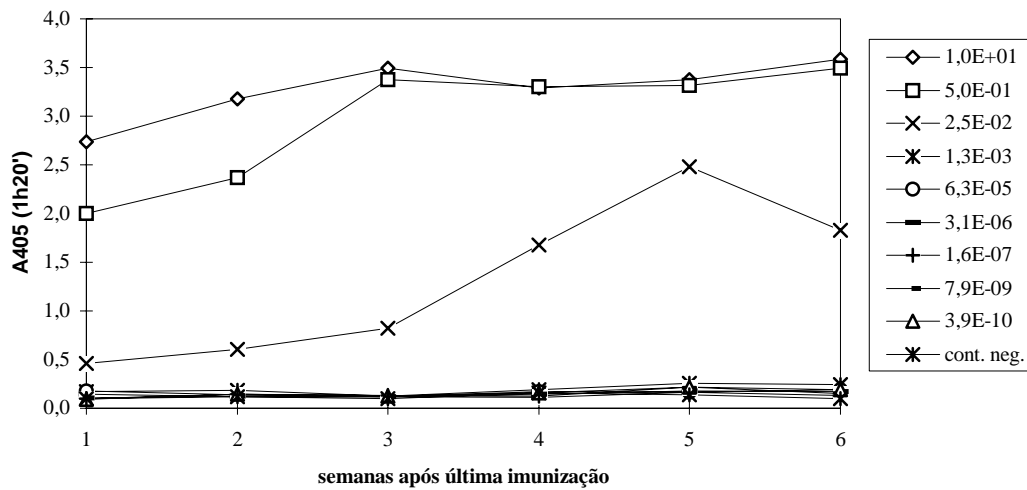


Gráf. 1 - Comparação entre a reactividade dos antissoros produzidos nos coelhos 4 e 6 e avaliação do limiar de detecção dos respectivos anticorpos. O gráfico representa os resultados do teste ELISA-indirecto em placa (média de duas repetições) e as quadrículas (na base do gráfico) o teste ELISA-indirecto em membrana. A cada quadrícula corresponde a mesma concentração de poli(I):poli(C) usada para o teste em placa (os resultados do teste em membrana são relativos ao antissoro produzido no coelho 4).

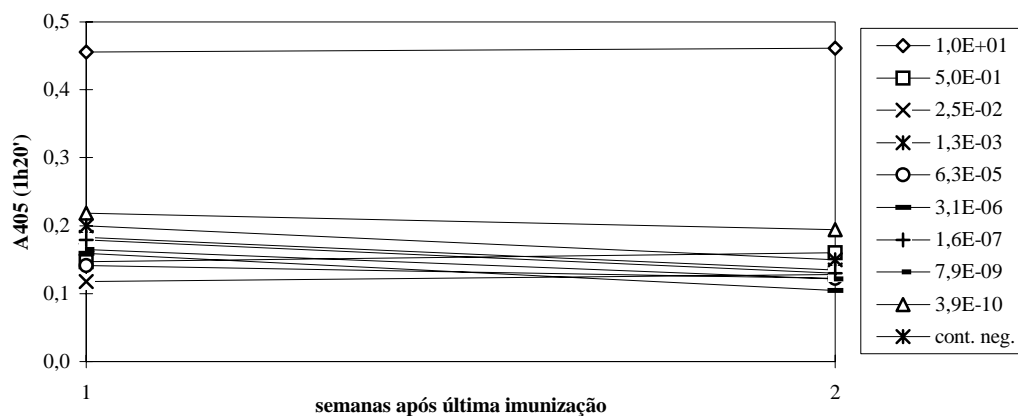
Relativamente ao limiar de detecção dos testes ELISA-indirecto em placa alveolada e em membrana, verifica-se uma capacidade de detecção do 1º de cerca de 1,3 ng/mL, valor que se considera satisfatório quando comparado com resultados obtidos por Zanzinger e Tavantzis (1982a) (1-10 ng/mL). Com o teste ELISA em membrana de

nitrocelulose, obtiveram-se limites de detecção próximos dos 500 ng/mL, cerca de 400 vezes inferior aos valores obtidos para o teste anterior. Embora vários autores tenham obtido resultados mais sensíveis (Hsu, 1996; Carvalho, 1998), Aramburu *et al.* (1991) referem-se a resultados menos sensíveis do que o obtido neste trabalho (1µg/mL), quando do uso deste tipo de membranas.

A evolução da reactividade dos antissoros produzidos ao longo do tempo foi testada por ELISA-indirecto em placa, encontrando-se os resultados representados nos Gráficos 2 e 3 (as curvas representam diferentes diluições de antigénio).



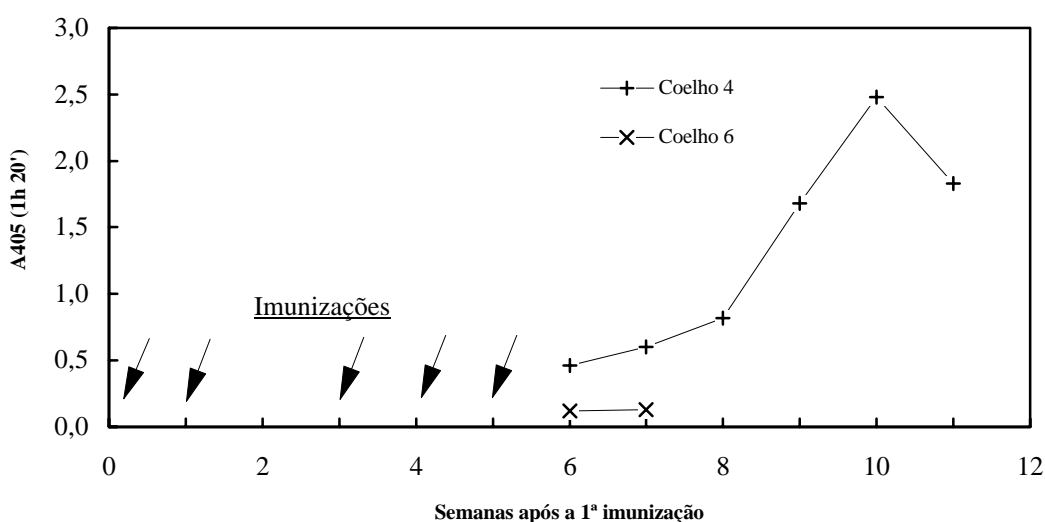
Gráf. 2 - Evolução da concentração de anticorpos [para 9 diluições de poli(I):poli(C) em µg/mL] ao longo do tempo no antissoro produzido no coelho 4 (diluição 1/1000).



Gráf. 3 - Evolução da concentração de anticorpos [para 9 diluições de poli(I):poli(C), em µg/mL] ao longo do tempo no antissoro produzido no coelho 6 (diluição 1/1000).

Como se pode verificar pelos gráficos anteriores, a reactividade do antissoro produzido no coelho 4 é bastante superior à do antissoro produzido no coelho 6. É de considerar, neste caso, que a quantidade de antigénio injectada no segundo animal (total de 5 mg/mL) foi duas vezes inferior à introduzida no primeiro (total de 10 mg/mL), o que pode valer como justificação destes resultados. Ball (1974) considera, no entanto, que o tipo de resposta às imunizações depende tanto da via de imunização e quantidade de imunogénio injectado como da capacidade do próprio animal para produzir anticorpos.

Uma vez que a reactividade do antissoro produzido no coelho 6 foi bastante baixa, o animal foi eliminado do ensaio, pelo que todos os testes posteriores foram realizados apenas com o antissoro produzido pelo coelho 4.



Gráf. 4 - Variação da concentração de anticorpos no antissoro ao longo do tempo (média de 2 repetições; diluição do antissoro de 1:1000; diluição do antigénio de 25 ng/mL).

No Gráfico 4 pode confrontar-se a evolução da reactividade dos antissoros com as datas de imunização dos animais e datas de colheita do sangue.

Verifica-se um aumento progressivo da reactividade do antissoro produzido no coelho 4, desde a 1ª colheita (que ocorreu uma semana após a última imunização) até à 5ª colheita (5 semanas após a última imunização), altura em que atingiu o valor máximo de A405 (próximo de 2,5). A partir desta altura, a reactividade do antissoro começou a

decrecer. Estes valores de reactividade são ligeiramente superiores aos obtidos por Carvalho (1998), que utilizou para imunização dos coelhos o mesmo polinucleótido sintético mas de diferente origem comercial.

Segundo Bercks *et al.* (1972), é normal que, quando se segue uma via de imunizações intramuscular, o valor máximo de reactividade seja atingido 3 a 4 semanas após a última injeção, verificando-se deste modo uma resposta normal por parte do coelho 4.

4.2- Titulação do antissoro por teste de difusão dupla em agar

A titulação do antissoro produzido foi determinada pelo teste da difusão dupla em agar. No entanto, antes de fazer a titulação do antissoro produzido foi necessário determinar, também através deste tipo de teste, qual a concentração de antigénio com a qual o antissoro apresenta uma interacção equilibrada. Este equilíbrio é evidenciado no agar por uma linha branca, densa mas nítida, que se deve apresentar numa posição central em relação aos alvéolos aos quais a interacção diz respeito. A Figura 1a) mostra uma interacção óptima entre o antissoro (sem diluição) (alvéolo central) e poli(I):poli(C) à concentração de 0,5 mg/mL (alvéolo periférico 3).

No teste de titulação do antissoro, foi esta a concentração de antigénio usada no alvéolo central, tendo os alvéolos periféricos sido preenchidos com cinco diluições de antissoro. Pode verificar-se pela Figura 1b) que foi possível uma detecção de antissoro até à diluição de 1:10 (alvéolo periférico 4).

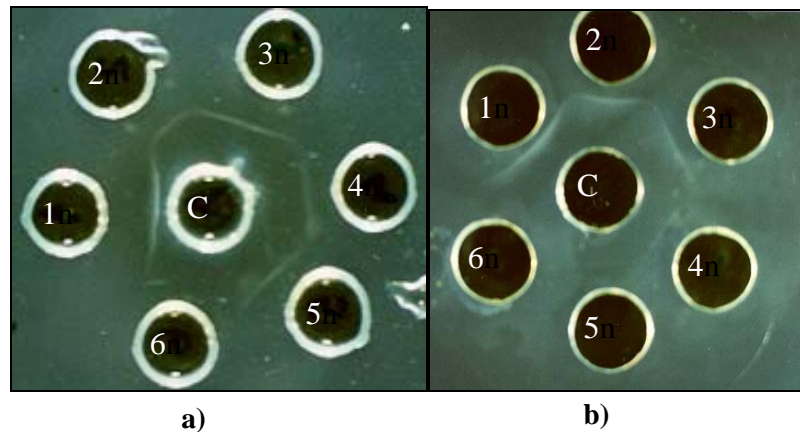
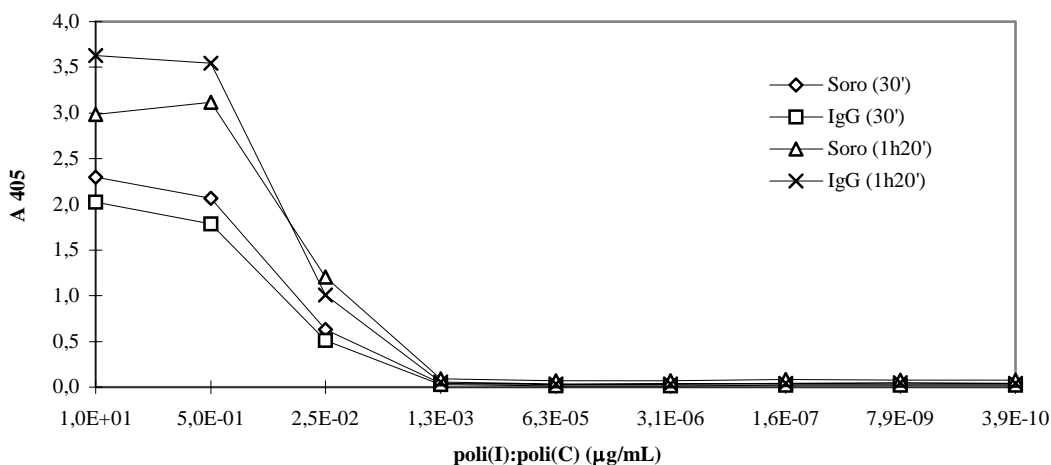


Fig. 1 - Teste de difusão dupla em agar: **a)** alvéolo central: antissoro (sem diluição); alvéolos periféricos - diluições de poli(I):poli(C): **1.** 2 mg/mL; **2.** 1 mg/mL; **3.** 0,5 mg/mL; **4.** 0,25 mg/mL; **5.** 0,125 mg/mL; **6.** água destilada); **b)** alvéolo central - poli(I):poli(C) (0.5 mg/mL); alvéolos periféricos - diluições de antissoro: **1.** sem diluição; **2.** 1:2; **3.** 1:5; **4.** 1:10; **5.** 1:30; **6.** água destilada).

4.3 - Avaliação da reactividade da IgG purificada

Uma vez determinado o antissoro com maior reactividade (5ª colheita), procedeu-se à purificação da respectiva IgG, que se testou por comparação com o antissoro “inteiro”.

Os resultados obtidos por ELISA-indirecto em placa encontram-se expostos no Gráfico 5. Comparando a reactividade do antissoro “inteiro” e da IgG purificada, não se verifica uma melhoria no desempenho da IgG, o que pode ser devido a ter havido uma baixa precipitação de imunoglobulinas na solução final no processo de purificação.

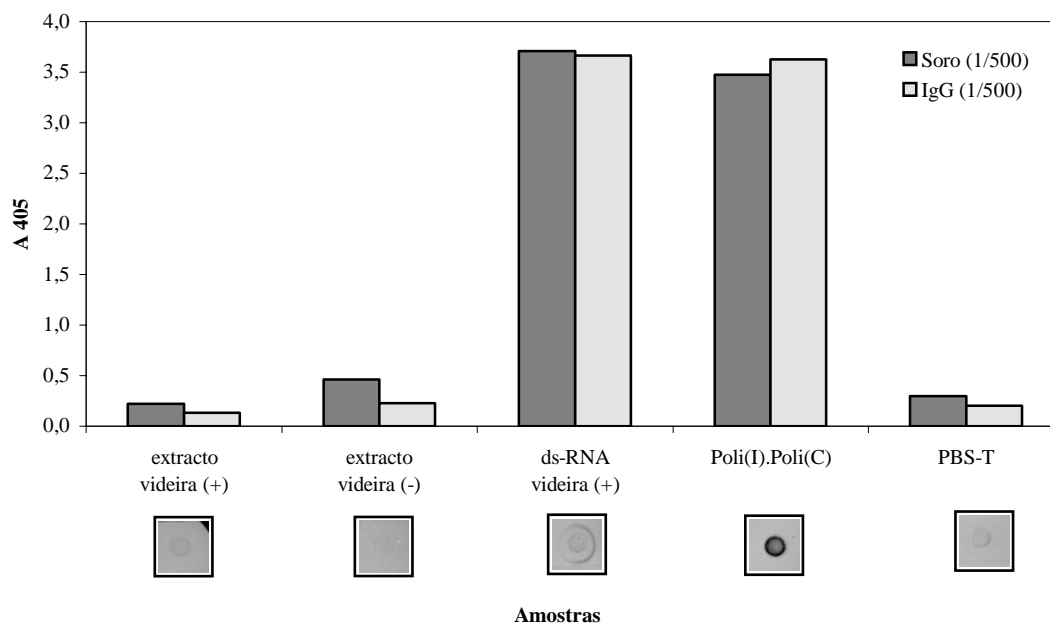


Gráf. 5 - Limiar de detecção dos anticorpos (antissoro “inteiro” e IgG purificada) produzidos para Poli(I):Poli(C).

4.4 - Detecção de ds-RNA em extractos aquosos e em ds-RNA purificado

Após confirmação da qualidade do antissoro produzido (para o antígeno homólogo), procedeu-se à análise do seu desempenho para ds-RNA, objectivo principal deste trabalho. Para tal, procedeu-se à purificação de ds-RNA a partir de plantas com sintomas de infecção viral. Foram feitas tentativas no sentido de obter ds-RNA purificado a partir de material herbáceo infectado com um Nepovírus de alface (*N. rustica*) e um Tospovírus (TSWV em petúnia), mas admite-se que o processo de purificação, que neste tipo de material é muito difícil, tenha sido de alguma forma deficiente, ou que o material usado contivesse quantidades de vírus demasiado baixas para serem detectadas, pois não se obtiveram quaisquer resultados positivos. Desta forma, apenas se apresentam resultados relativos a ds-RNA extraído de videiras infectadas com GLRaV-3.

O Gráf. 6 ilustra a detecção de ds-RNA viral em amostras vegetais (videira) infectadas com GLRaV-3, tanto a partir de extractos aquosos como de ds-RNA purificado.



G

ráf. 6 - Avaliação do desempenho dos anticorpos produzidos para poli(I):poli(C) em extractos aquosos de videira 1:5 (p/v) e em ds-RNA purificado a partir de 5 g de material vegetal por alvéolo. Teste ELISA-indirecto em placa (gráfico) e ELISA-indirecto em membrana (na base do gráfico; a cada quadrícula corresponde o mesmo antigénio que foi usado para o teste em placa).

Como se pode observar, não foi possível a detecção de ds-RNA a partir de extractos aquosos (os valores registados para as amostras positivas são semelhantes aos das amostras negativa e de controlo), resultados também já obtidos por outros autores (Carvalho e Pereira, 1997; Carvalho, 1998).

Com a amostra de ds-RNA purificado obteve-se, no entanto, valores de absorvância fortemente positivos e muito próximos dos obtidos na reacção homóloga (para poli(I):poli(C), que funcionou como controlo positivo), o que evidencia a elevada capacidade de reacção do antissoro produzido para com a substância que se pretendia detectar.

Com o teste ELISA-indirecto em membrana foi possível identificar, ainda que de uma forma ligeira, a presença de ds-RNA na membrana, tendo sido também impossível a detecção de ds-RNA a partir de extractos aquosos.

Segundo Carvalho e Pereira (1997), duas grandes limitações estão associadas aos extractos aquosos de videira para detecção de ds-RNA: a baixa concentração na planta dos ácidos nucleicos a detectar e a forte influência dos compostos polifenólicos e polissacáridos nos resultados.

No teste ELISA-indirecto em placa, a utilização de ds-RNA purificado a partir de 5 g de material vegetal por alvéolo permitiu obter elevados valores de absorvância, o que leva a considerar que seria possível a sua detecção com quantidades mais pequenas de material.

A Figura 2 ilustra os resultados obtidos no teste de difusão dupla em agar. Fica patente que a detecção de ds-RNA a partir de extractos aquosos infectados (alvéolo 1) é, também aqui, impossível. No entanto, este teste mostrou-se bastante sensível na detecção de ds-RNA purificado (alvéolo 2), quando comparado com os resultados obtidos para poli(I):poli(C) (alvéolo 3), uma vez que as linhas brancas indicadoras de ambas as interações se apresentam muito semelhantes.

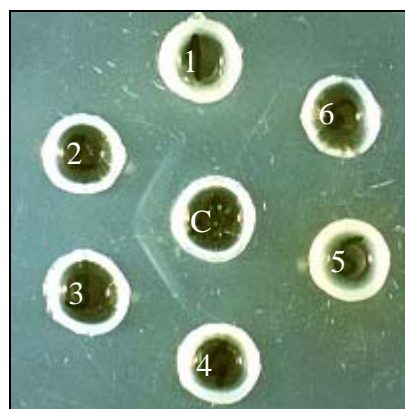


Fig. 2 - Teste de difusão dupla em agar para detecção de ds-RNA. Alvéolo central: antissoro sem diluição; alvéolos periféricos: **1.** extracto aquoso de amostra infectada com GLRaV-3; **2.** ds-RNA purificado (cerca de 2 g de material vegetal por alvéolo); **3.** poli(I):poli(C) (0,5 mg/mL); **4.** extracto aquoso de amostra sã; **5.** e **6.** água destilada.

5 - CONCLUSÕES

Cada vez mais se sente uma forte necessidade de obtenção de métodos rápidos e fiáveis de detecção de fitopatogénios, com a finalidade tanto de pôr termo à disseminação de determinadas doenças virais como de selecção de material vegetal para propagação. Com este objectivo, pretendeu-se produzir um antissoro policlonal a partir de uma substância sintética de fácil obtenção que tivesse a capacidade de detectar a presença, não de um vírus específico, mas de infecção viral, através da detecção de ds-RNA.

O antissoro policlonal, produzido em coelhos através da sua imunização com o polinucleótido bicatenário poli(I):poli(C), foi primeiramente testado por ELISA-indirecto em placa e ELISA-indirecto em membrana com sucesso, apresentando uma reactividade bastante elevada para com o antigénio homólogo. Ambos os testes se mostraram, portanto, bastante eficazes na detecção de ds-RNA, mas obteve-se uma maior sensibilidade com o teste em placa, facto que não era esperado, uma vez que a bibliografia apresenta, na sua maioria, resultados opostos.

A detecção de ds-RNA a partir de extractos aquosos de videira não deu, em qualquer dos testes, resultados satisfatórios, por não ser possível estabelecer a diferença entre amostras infectadas e amostras sãs. Apenas quando se testou ds-RNA purificado a partir de amostras de videira infectadas com GLRaV-3 se conseguiu obter resultados fortemente positivos. Foram também feitos testes para detecção de ds-RNA extraído de material herbáceo (*N. rustica* e petúnia) infectado com dois vírus. No entanto, concluiu-se que o processo de extracção deve ter sido deficiente, uma vez que os resultados foram sempre negativos.

Deste modo, pode dizer-se que o antissoro produzido detecta a presença de ds-RNA viral. No entanto, e uma vez que se pretende que este tipo de testes seja rápido e eficaz para um grande número de amostras, as técnicas de detecção serológica têm que ser apuradas no sentido de se conseguir a detecção, não só a partir de ds-RNA purificado, mas também a partir de extractos aquosos. Este objectivo torna-se importante na medida em que o processo de extracção de ds-RNA a partir de material

vegetal, principalmente material herbáceo, é muito moroso, difícil e envolve o uso de produtos tóxicos como, por exemplo, o fenol.

6 - BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, N., 1990. Plant Pathology. 3rd Edition, Academic Press, 803 pp.
- ARAMBURU, J. e MORENO, P., 1994. Detection of Double-Stranded RNA (dsRNA) in Crude Extracts of Virus-Infected Plants by Indirect ELISA. *J. Phytopathology*, 141: 375-385.
- ARAMBURU, J., NAVAS-CASTILLO, J., MORENO, P. e CAMBRA, M., 1991. Detection of double-stranded RNA by ELISA and dot immunobinding assay using an antiserum to synthetic polynucleotides. *Journal of Virological Methods*, 33: 1-11.
- BALL, E., 1974. Serological Tests for the Identification of Plant Viruses. *The American Phytopathological Society*, Plant Virology Committee, pp.
- BALL, E., 1990a. Agar diffusion techniques. Introduction, pp.97-100 In: *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual*. Ed. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- BALL, E., 1990b. Agar double diffusion, plates (Ouchterlony): viruses, pp. 111-120. In *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual*. Ed. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- BALL, E., 1990c. Microprecipitation (viruses) and micro-agglutination (bacteria), pp.153-160. In *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual*. Ed. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- BALL, E., HAMPTON, R., DE BOER, S. e SHAAD, N., 1990. Polyclonal antibodies, pp. 33-54. In *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual*. Ed. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- BERCKS, R., KOENIG, R. e QUERFURTH, G., 1972. Plant Virus Serology, pp.467-490. In *Principles and Techniques in Plant Virology*. Edited by Kado/Agrawal. Van Nostrand Reinhold,
- BOSCIA, D., 1993. Isolation and analysis of double-stranded RNAs, pp. 217-218. In *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. Ed. Martelli, G. P., Rome.
- CARVALHO, M., 1998. O vírus do enrolamento foliar da videira, serotipo 3 (GLRaV-3)-Produção de antissoros e caracterização. Dissertação de Mestrado em Agricultura, Ambiente e Mercados. UTAD, Vila Real. 93 pp.

CARVALHO, M e PEREIRA, A.-M. N., 1996. Produção de anticorpos policlonais para um closterovírus associado à doença do enrolamento foliar da videira (GLRaV-3). 1ª Reunião SPF, Vila Real, Out., pp. 114-116.

CARVALHO, M e PEREIRA, A.-M. N., 1997. Serological detection of double-stranded RNA from grapevine viruses. 12th ICGV Meeting, Lisbon, 28 Sept. to 4 Oct., pp. 99-100.

CLARK, M. e ADAMS, A., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34: 457-483.

CLAUSEN, J., 1988. Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules. Elsevier Science Publishers (Biochemical Division), Netherlands, 464 pp.

CONVERSE, R. e MARTIN, R., 1990. ELISA methods for plant viruses, pp. 179-196. In *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual*. Ed. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

DODDS, J. A., MORRIS, T. J. e JORDAN, R. L., 1984. Plant viral double-stranded RNA. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 22: 151-168.

DURAND, D., 1990. Amplification of serological reactions, pp. 93-96. In *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual*. Ed. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

FIELD, A., DAVIES, M. e TYTELL, A., 1980. Determination of Antibodies to Double-Stranded RNA by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 164: 524-529.

FOX, R., 1993. Principles of Diagnostic Techniques in Plant Pathology. CAB INTERNATIONAL, UK, 213 pp

GARNSEY, S. e CAMBRA, M., 1993. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), pp.169-185. In *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. Ed. Martelli, G. P., Rome.

GARCIA-LUQUE, I., BRIEVA, A., DIAZ-RUIZ, J. R. e RUBIO, N., 1986. Isolation and Partial Characterization of a Monoclonal Antibody Specific for a Naturally Occuring Double-Stranded RNA. *Virology*, 152: 252-255.

GIBBS, A. e HARRISON, B., 1976. Plant Virology. Edward Arnold (Publishers) Ltd, London, 292 pp.

GOULD, A. R. e FRANCKI, R. I. B., 1981. Immunochemical detection of ds-RNA in healthy and virus-infected plants and specific detection of viral ds-RNA by hybridization to labelled complementary DNA. *Journal of Virological Methods*, 2: 277-286.

HAMMOND, J., 1990. Western blotting and the use of membranes to adsorb antisera and to affinity purify antibodies, pp.269-279. In *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual*. Ed. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

HAMMOND, J. e JORDAN, R., 1990. Dot blots (viruses) and colony screening, pp.237-248. In *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual*. Ed. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

HILL, J., 1990. Solid phase radioimmunoassay, pp.205-209. In *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual*. Ed. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

HSU, H., 1997. Immunological Detection and Identification of Tospoviruses. *Acta Horticulture* 431: 109-121.

HU, J., GONSALVES, D. e TELIZ, D., 1990b. Characterization of closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease. *J. Phytopathology*, 128: 1-14.

HU, J., GONSALVES, D., BOSCIA, D. e NAMBA, S., 1990a. Use of monoclonal antibodies to characterize leafroll associated closteroviruses. *Phytopathology*, 80 (10): 920-925.

HU, J., GONSALVES, D., BOSCIA, D., MAIXNER, M. e GOLINO, D., 1991. Comparison of rapid detection assays for grapevine leafroll disease associated closterovirus. *Vitis*, 30: 87-95.

HU, J., ROCHOW, W. e DIETERT, R., 1985. Production and use of antibodies from hen eggs for the SVG isolate of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology*, 75: 914-919.

JONES, A., 1992. Application of double stranded RNA analysis of plant to detect viruses, virus-like agents, virus satellites and subgenomical viral RNAs, pp.115-128. In *Techniques for the rapid detection of plant pathogens*. Ed. J. M. Duncan & Torrance. Blackwell Scientific Publications.

KÖHLER, G. e MILSTEIN, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495-497.

LIN, N. S., HSU, Y. H. e HSU, H. T., 1990. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology*, 80 (9): 824-828.

LING, K., ZHU, H., ALVIZO, H., HU, J., DRONG, R., SLIGHTOM, J., e GONSALVES, D., 1997a. The coat protein gene of grapevine leafroll associated closterovirus-3: cloning, nucleotide sequencing and expression in transgenic plants. *Arch. Of Virology*, 142:1101-1116.

- LING, K., ZHU, H., JIANG, Z., MCFERSON, J. e GONSALVES, D., 1997b. Application of ELISA for virus detection using a polyclonal antibody produced from a recombinant coat protein of grapevine leafrollvirus 3 expressed in *Escherichia coli*. *Ext. abstr. 12th ICVG Meeting*, Lisbon, 28 Sept. to 4 Oct., 89, p. 99.
- MARTELLI, G., 1993a. Immunoprecipitation, pp.165-166. In *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. Ed. Martelli, G. P., Rome.
- MARTELLI, G., 1993b. Immunosorbent electron microscopy (ISEM) and antibody coating, pp. 193-195. In *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. Ed. Martelli, G. P., Rome.
- MATTHEWS, R., 1991. *Plant Virology*, 3rd Ed. Academic Press, NY, 835 pp.
- MERNAUGH, R., MERNAUGH, G. e KOVACS, G., 1990. The immune response: antigens, antibodies, antigen-antibodies interactions, pp. 3-14. In *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual*. Ed. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.
- MILLER, J., 1979. Evidence for Secondary Structure in Poliovirus Virion RNA Demonstrated by Antibodies Against Double-stranded RNA. *J. gen. Virol.*, 45: 665-671.
- MOFFIT, E. e LISTER, R., 1973. Detection of Mycoviruses Using Antiserum Specific for dsRNA. *Virology*, 52: 301-304.
- MORRIS, J. e DODDS, J., 1979. Isolation and analysis of double stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissues. *Phytophology*, 69: 854-858.
- NOLASCO, G. e SEQUEIRA, O., 1991. A pesquisa de RNA bicatenário (ds-RNA) aplicada ao diagnóstico viral, *Ciência Biológica* (aceite para publicação).
- PEREIRA, A.-M., 1986. Influence of host virus content on the acquisition and transmission of barley yellow dwarf virus by vectors. PhD Thesis, Purdue University, West Lafayette (EUA), 205 pp.
- POWELL, C., 1987a. Detection of three plant viruses by dot-immunobinding assay. *Phytopathology*, 77 (2): 306-309.
- POWELL, C., 1987b. Preparation of monoclonal antibody specific for double-stranded RNAs. *Phytopathology*, 77: 1743.
- PURCIFULL, D. e BATCHLOR, D., 1977. Immunodiffusion Testes with Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) - Treated Plant Viruses and Plant Viral Inclusions. Bulletin 788 (technical). Institut of Food and Agricultural Sciences, Florida. 39 pp.
- SHERWOOD, J., SANBORN, M. e KEYSER, G., 1987. Production of monoclonal antibodies to peanut mottle virus and their use in enzyme-linked immunosorbent assay and dot-immunobinding assay. *Phytopathology*, 77 (8): 1158-1161.

SLACK, S. e BALL, E., 1990. Agar single diffusion, plates, pp. 105-108. In *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial pathogens - a laboratory manual*. Ed. R. Hampton, E. Ball, S. de Boer. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

TORRANCE, L., 1992. Serological methods to detect plant viruses: production and use of monoclonal antibodies, pp. 7-33. In *Techniques for the rapid detection of plant pathogens*, Ed. J. M. Duncan & L. Torrance. Blackwell Scientific Publications.

WISTREICH, G. e LECHTMAN, M., 1988. Microbiology. Macmillan Publishing Company, New York, 5th Edition, 916 pp.

VALVERDE, R., NAMETH, S. e JORDAN, R., 1990. Analysis of Double-Stranded RNA for Plant Virus Diagnosis. *Plant Disease*, 74: 255-258.

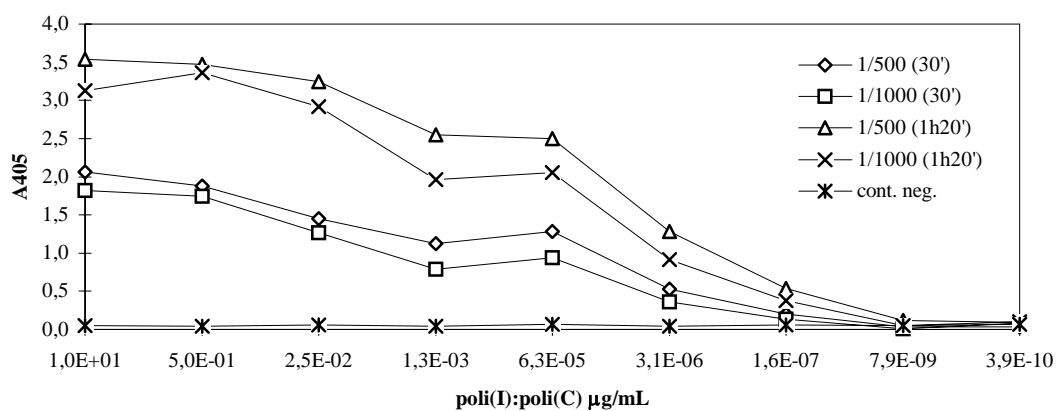
VAN REGENMORTEL, M., 1982. Serology and Immunichemistry of Plant Viruses. Academic Press, New York, 205 pp.

VOLLER, A., BARTLETT, A., BIDWELL, D., CLARK, M. e ADAMS, A., 1976. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 33: 165-167.

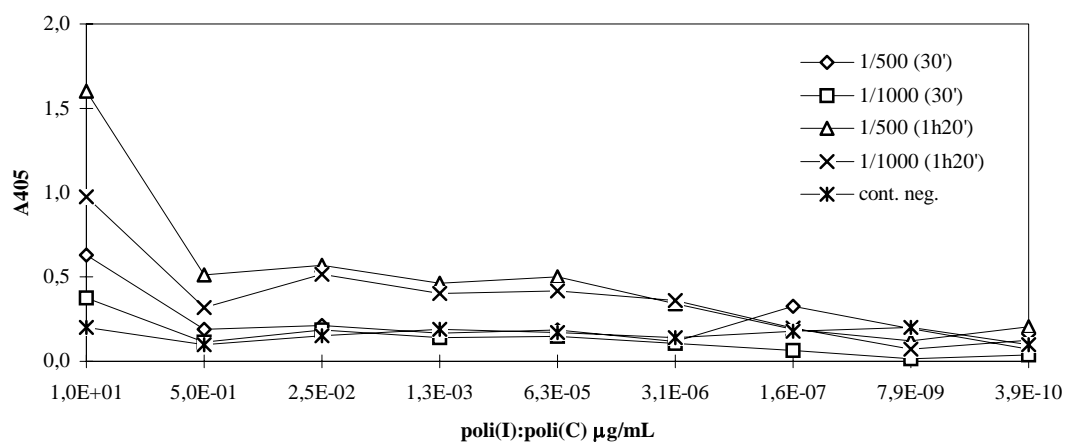
ZANZINGER, D. e TAVANTZIS, S., 1982a. Detection of double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Phytopathology*, 72: 268.

ZANZINGER, D. e TAVANTZIS, S., 1982b. Improved detection of double-stranded RNA by the indirect method of the solid-phase enzyme immunoassay. *Phytopathology*, 72: 954.

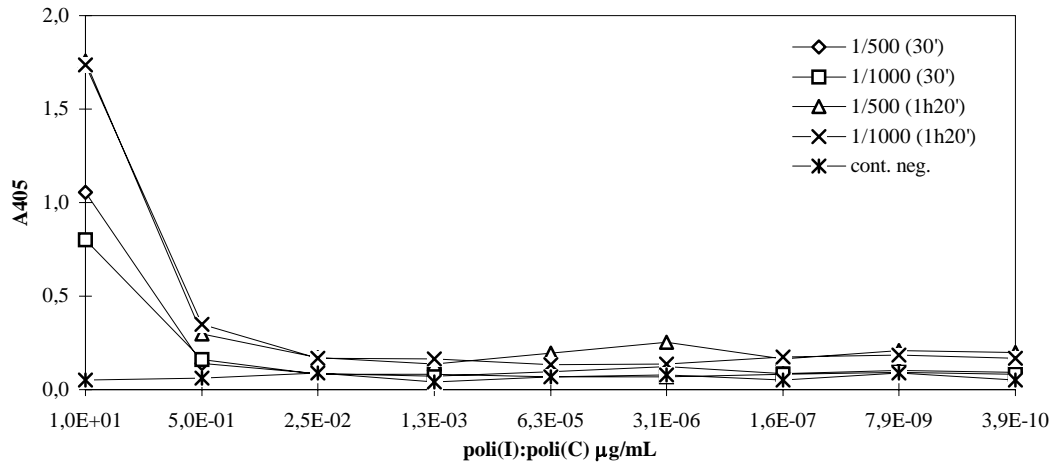
ANEXO 1



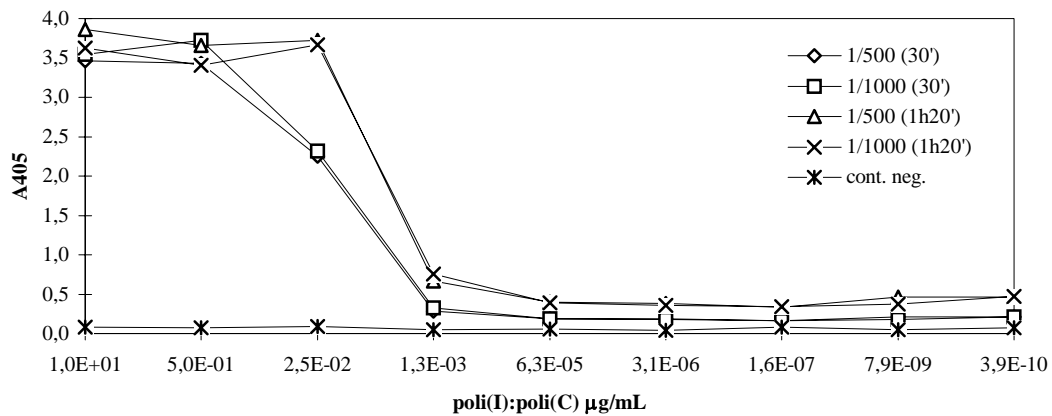
Gráf. 1 - Avaliação do limiar de detecção dos anticorpos produzidos no coelho 4, na 2ª colheita de sangue (média de duas repetições).



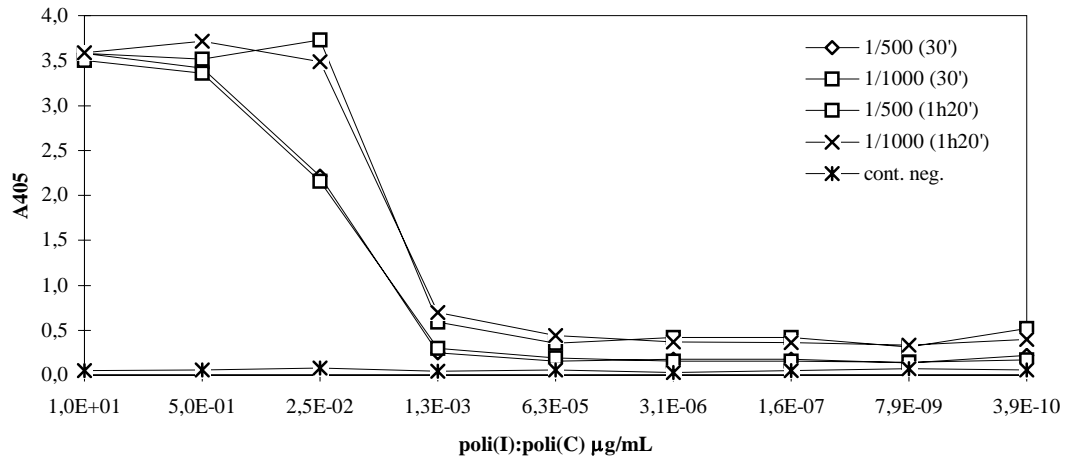
Gráf. 2 - Avaliação do limiar de detecção dos anticorpos produzidos no coelho 6, na 2ª colheita de sangue (média de duas repetições).



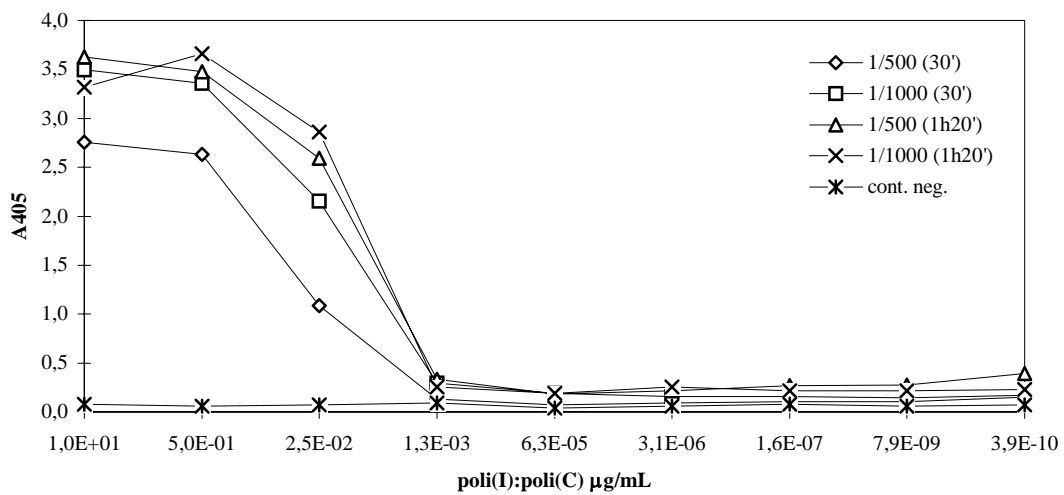
Gráf. 3 - Avaliação do limiar de detecção dos anticorpos produzidos no coelho 4, na 3ª colheita de sangue (média de duas repetições).



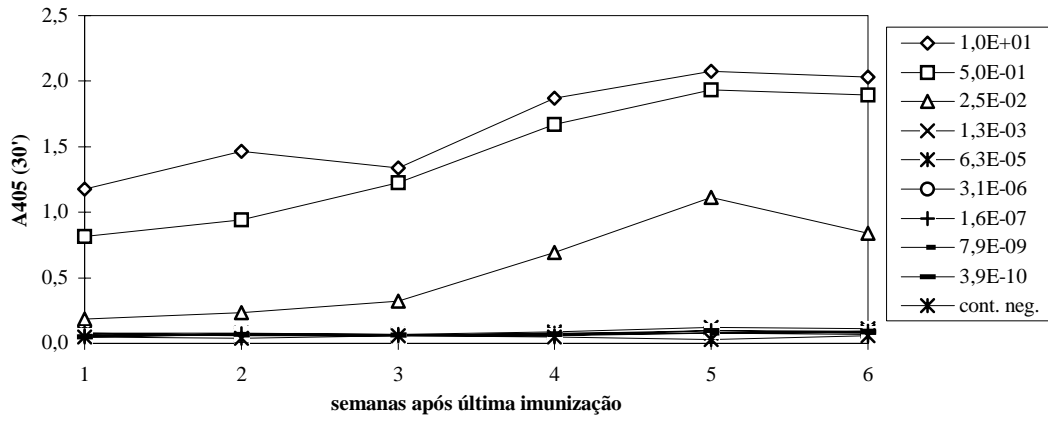
Gráf. 4 - Avaliação do limiar de detecção dos anticorpos produzidos no coelho 4, na 4ª colheita de sangue (média de duas repetições).



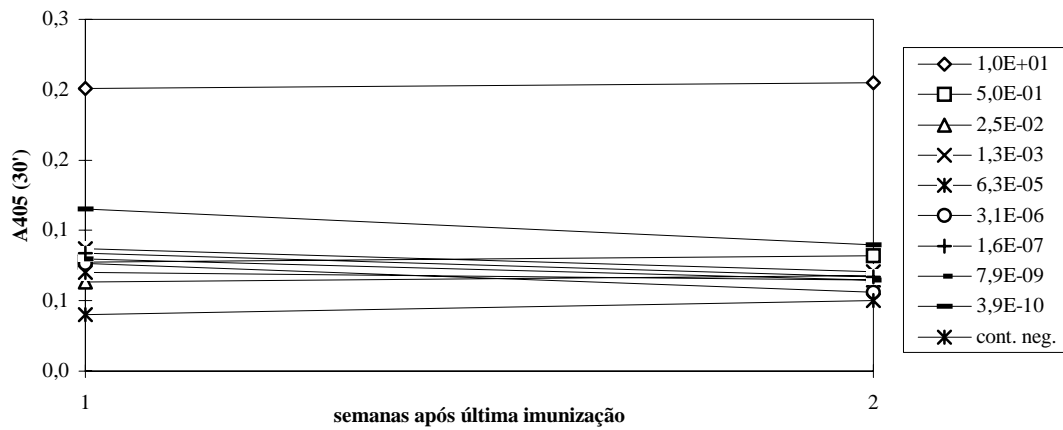
Gráf. 5 - Avaliação do limiar de detecção dos anticorpos produzidos no coelho 4, na 5ª colheita de sangue (média de duas repetições).



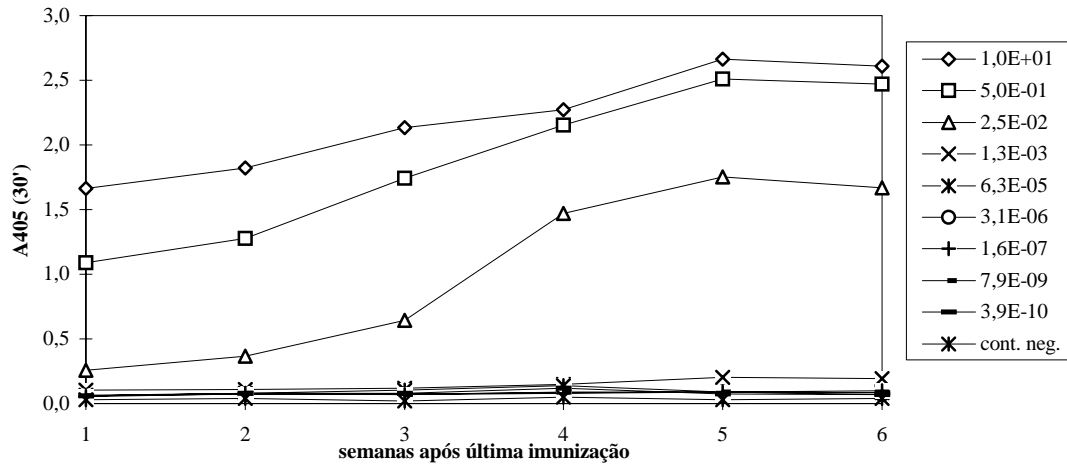
Gráf. 6 - Avaliação do limiar de detecção dos anticorpos produzidos no coelho 4, na 6ª colheita de sangue (média de duas repetições).



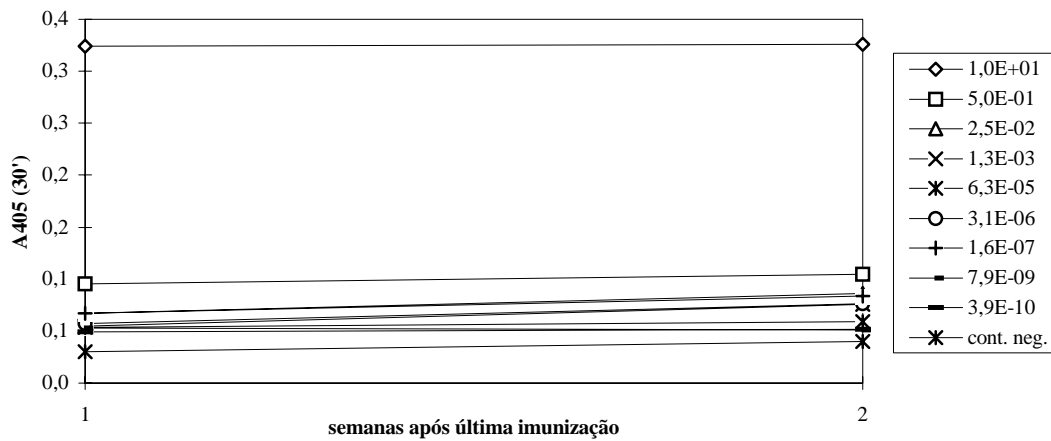
Gráf. 7 - Evolução da concentração de IgG ao longo do tempo no antissoro produzido no coelho 4 (diluição 1/1000).



Gráf. 8 - Evolução da concentração de IgG ao longo do tempo no antissoro produzido no coelho 6 (diluição 1/1000).



Gr
 áf. 9 - Evolução da concentração de IgG ao longo do tempo no antissoro produzido no coelho 4 (diluição 1/500).



Gráf. 10 - Evolução da concentração de IgG ao longo do tempo no antissoro produzido no coelho 4 (diluição 1/500).