

## Teste de Elisa para a determinação da ocupação nodular

---

Giovana Bortoti<sup>1</sup>; Kellen Banhos do Carmo<sup>1</sup>; Alexandre José Cattelan<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Aluna da UNIFIL; <sup>2</sup>Embrapa Soja.

### Introdução

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é um teste sorológico que visa identificar e quantificar o antígeno reconhecido pelo antissoro (imunoglobulina) que lhe deu origem, formando o complexo anticorpo-antígeno, associado às propriedades colorimétricas.

A coloração do meio ocorre devido à ação de certa enzima sobre um substrato cromogênico. A enzima é previamente conjugada à imunoglobulina. Atualmente, existem várias formas de se aplicar o ELISA (Clark e Bar-Joseph, 1984). Várias enzimas são citadas para a obtenção de conjugados. A sensibilidade do método de ELISA pode ser aumentada pelo uso de substratos fluorogênicos, como o fosfato 4-metil-umbeliferil. Substratos radioativos também podem ser utilizados, no entanto exigem equipamentos mais sofisticados e maior atenção.

No laboratório de microbiologia do solo da Embrapa Soja o teste de Elisa é utilizado para identificar espécies *Bradyrhizobium* spp.

### Objetivo

Verificar através do teste de Elisa quais estirpes de *Bradyrhizobium* spp, bactérias fixadoras de nitrogênio, estão presentes em nódulos de plantas de soja submetidas a diferentes tratamentos.

### Material e métodos

- Produção de antissoro

O antígeno foi produzido a partir das estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 587, 5019, 5079 e 5080. Crescidos em meio sólido; suspensos em 1ml de solução salina e centrifugados (1000 rpm, 10 min). Descartou-se sobrenadante, adicionou 1 ml de sol. salina, repetiu-se novamente e na 3ª vez adicionou-se 0,5 ml de sol. salina e agitou. Aqueceu-se em banho-maria a 100°C por 15 min. Completou para 1 ml com solução tampão de cobertura. Manteve em geladeira (4°C, usar em questão de dias). Com o antígeno pronto, fez-se a imunização do animal a fim de produzir o antissoro. O animal escolhido foi o coelho, pois, eles permitem retirar quantidades suficientes de sangue, além de serem de fácil manuseio. O esquema de imunização usado é de injeções intramusculares. Após a injeção do antígeno, ocorrem diferentes reações no sistema imunológico do animal, incluindo a produção de anticorpos. A imunização segue o cronograma descrito abaixo.

O animal chega no biotério e fica três dias em observação para se verificar sua saúde. O início da imunização deve ocorrer numa sexta-feira, onde se aplica o antígeno + adjuvante completo. Nos dias em que não há aplicação deve-se sempre verificar a situação do coelho. A próxima aplicação será na quarta-feira seguinte onde se aplica antígeno + adjuvante incompleto. Após quatro dias, uma nova aplicação de antígeno + adjuvante incompleto. Três dias após, aplica-se antígeno + adjuvante incompleto, espera-se mais quatro dias e aplica-se pela última vez antígeno + adjuvante incompleto. Cinco dias depois, no período da tarde, retira-se a ração para que no dia seguinte pela manhã se faça a sangria. Existem dois métodos de sangria: a punção Cardíaca e pela orelha. Na punção Cardíaca é feita somente uma coleta de sangue, retirada diretamente do coração por uma seringa esterilizada. Em seguida, aplica-se 10 a 15 ml de éter no mesmo local, causando a morte instantânea. A sangria pela orelha ocorre na veia marginal da orelha. Usa-se xilol para dilatar a veia, fazendo-se o corte com lâmina de barbear. O método mais indicado é o de punção cardíaca, pois além de causar menos sofrimento para o animal, a quantidade de soro obtido é maior.

Quando o período de imunização e coleta chegam ao fim é necessária a limpeza do biotério. A amostra de sangue coletada terá como fim, a realização dos testes de título e reação cruzada.

O teste do título dos antissoros têm como o objetivo determinar se a concentração de anticorpos do soro está alta ou baixa. Tem-se como início a diluição deste antissoro começando em 1/100 até 1/51200. O diluente usado é PBS-Tween. Primeiro pipetar 10 ul de antissoro em um tubo com 990 ul de PBS-Tween (1/100), retiram-se 500 ul deste tubo e distribuem-se nos outros tubos até obter a última diluição (para isso repete-se 10 vezes). O título é determinado através da preparação de uma placa de Elisa, tendo as bactérias presentes juntamente com as diluições dos antissoros, seguindo-se a metodologia descrita por Fuhrmann & Wollum (1985). Repousar por uma noite e no dia seguinte fazer a leitura do título no espectrofotômetro. Após a determinação do título, escolher as diluições para utilizar no teste de reação cruzada. Este teste tem o objetivo de verificar se há possibilidade de uma bactéria reagir com o antissoro de outra. A placa é montada com as diluições escolhidas. Depois da montagem da placa, incubar em geladeira à 4°C por uma noite. No dia seguinte, lavar uma vez, adicionar 100 ul de tampão substrato com o reagente Phosphatase Substrate, deixar repousar à temperatura ambiente de 30 a 50 min. e observar a reação colorimétrica do antissoro com o seu específico antígeno. Fazer leitura em leitor para placas de Elisa.

Se os teste de título e de reação cruzada tiverem resultado positivo, terá então o início dos testes nodulares. O antígeno nodular é preparado da seguinte forma: - esmagar os nódulos em tubos plásticos com 0,5 ml de salina (flambar as pinças entre os nódulos); - Aquecer em banho-maria a 100°C por 15 min.; - completar para 1 ml com tampão de cobertura. Após a preparação dos antígenos começa uma seqüência de procedimentos para realização do Elisa: 1ª Etapa – Incubação de cobertura (período da tarde), pipetar 100 ul de antígeno por compartimento da placa (pipetar para um número de compartimento igual ao número de antissoros sendo testados), incubar à temperatura ambiente por 1 hora, esvaziar a placa e secar, lavar com PBS-Tween por 4 vezes, secando bem entre as lavadas. 2ª Etapa – pipetar 100 ul de antissoro com o título corrigido por compartimento, a diluição do antissoro se dará com PBS-Tween, cobrir as placas e incubá-las a 28°C por 1 hora e, em seguida, lavar como anteriormente. 3ª Etapa - adicionar 100 ul do conjugado diluído 5000x em PBS-Tween, incubar em geladeira 4°C durante a noite, lavar como em 1. 4ª Etapa –

adicionar 100 ul de solução fresca de substrato contendo 1 mg de substrato por ml de tampão para substrato, incubar a temperatura ambiente por 30 a 50 min. ou até a cor amarela das reações positivas aparecer, fazer a leitura em leitor para placas de Elisa, absorvância de 405 nm, caso a leitura não possa ser feita imediatamente, adicionar 3 gotas de NaOH 3M por compartimento.

## Resultados

Têm-se através do teste de Elisa a determinação da ocupação nodular das estirpes de *Bradyrhizobium* spp. presentes em plantas de soja, o qual sua função é proporcionar uma maior fixação biológica de nitrogênio no solo. Após identificação nodular, outros trabalhos serão elaborados afim de garantir a total eficiência das estirpes para a plantação de soja.

## Referências Bibliográficas

- CLARK, M.F.; BAR-JOSEPH, M. **Methods in virology**. New York: Academic Press, 1984. P51-85
- FUHRMANN, J.J.; WOLLUM II, A.G. Simplified enzyme-linked immunosorbent for routine identification of *Rhizobium japonicum* antigens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.49, p.1010-1013, 1985.