

Notas Científicas

Produção e caracterização de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

João Sebastião de Paula Araujo⁽¹⁾, Fábio Bueno dos Reis Junior⁽²⁾, Geraldo Baeta Cruz⁽³⁾, Bruno Cardoso de Oliveira⁽¹⁾, Charles Frederick Robbs⁽¹⁾, Raul de Lucena Duarte Ribeiro⁽¹⁾ e José Carlos Polidoro⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Inst. de Agronomia, Dep. de Fitotecnia, BR 465, Km 7, CEP 23890-000 Seropédica, RJ. E-mail: araujoft@ufrj.br ⁽²⁾Embrapa Cerrados, BR 020, Km 18, CEP 73310-970 Planaltina, DF. ⁽³⁾Embrapa Agrobiologia, BR 465, Km 7, CEP 23851-970 Seropédica, RJ. E-mail: gerald@cnpab.embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi a produção de anticorpos policlonais contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e sua caracterização pelo método Elisa indireto. Os resultados apontaram a qualidade dos anticorpos policlonais produzidos, os quais mostraram-se altamente reativos e específicos para o patovar com potencial para ser empregado no diagnóstico da doença e em programas de certificação.

Termos para indexação: *Vitis vinifera*, cancro bacteriano, diagnose.

Production and characterization of polyclonal antibodies against *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*

Abstract – The objective of this work was to produce polyclonal antibodies against *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* and characterize these antibodies through Elisa serological indirect method. Results indicate that polyclonal antibodies produced were highly reactive against bacterial cells, showing specificity at the pathovar level and potential to be used for diagnosis and certification purposes.

Index terms: *Vitis vinifera*, bacterial canker, diagnosis.

O cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera*), causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye (*Xcvi*), é uma das mais importantes doenças do Submédio do Vale do Rio São Francisco, responsável por severos danos, representando sério potencial de risco ao desenvolvimento da viticultura nacional. Essa bactéria é capaz de sobreviver em ramos de videira, nos cancos já formados, ou associada a infecções latentes nas plantas assintomáticas, o que evidencia a importância dos órgãos vegetativos da videira como nichos para disseminação da bactéria (Araujo, 2001; Nascimento & Mariano, 2004).

O caminho mais promissor para o controle do cancro bacteriano da videira é, provavelmente, o uso de material propagativo livre de infecção, integrado a práticas de manejo que possam limitar sobrevivência e disseminação da bactéria (Araujo, 2001).

Os métodos imunológicos de detecção baseiam-se na capacidade dos anticorpos de reconhecer estruturas tridimensionais específicas de moléculas biológicas, tais

como partes de proteínas ou polissacarídeos. Tais técnicas exercem papel importante como ferramentas de diagnóstico na medicina e, também, na patologia de plantas (Levanony et al., 1987). O uso de células bacterianas intactas na imunização resulta em anti-soros policlonais, que consistem de uma mistura de diferentes anticorpos sintetizados, em resposta aos vários determinantes antigênicos.

O emprego desses anti-soros como teste, na detecção microbiológica em material vegetal exige a caracterização de possíveis reações cruzadas, bem como a incrementação da qualidade do anti-soro, por meio de técnicas específicas de purificação (Reis et al., 1997).

Este trabalho objetivou a produção de anticorpos policlonais contra *Xcvi* utilizando, para sua identificação, o método sorológico Elisa indireto, o qual poderia ser empregado para certificação de mudas de videira, particularmente na instalação de pomares, em áreas ainda isentas do patógeno.

Para a produção dos anti-soros seguiu-se o procedimento relatado por Reis et al. (1997, 2000), sendo utilizadas, como antígenos, as células intactas dos isolados *Xcvi* ENA4558 e ENA4560, crescidas em frascos de Erlenmeyer, com 50 mL de meio DYGS.

As células bacterianas foram centrifugadas a 5.000 rpm (Eppendorf, modelo 5415D) por 15 minutos; o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 3 mL de água destilada esterilizada. Procedeu-se a mais uma centrifugação a 5.000 rpm por 10 minutos, repetida por três vezes. Após a última centrifugação, a massa de bactérias foi ressuspenso em 3 mL de água destilada esterilizada e tratada termicamente a 90°C por 30 minutos, para desnaturação e eliminação das proteínas flagelares.

Tomou-se 1 mL da suspensão de bactérias, adicionando-se 0,5 mL de adjuvante completo de Freund mais 0,5 mL de adjuvante incompleto. O volume de 1 mL dessa mistura foi usado para injeção subcutânea, em cinco pontos diferentes da linha dorsal de coelhos fêmeas, de seis meses de idade, da raça Nova Zelândia.

As imunizações subseqüentes foram feitas utilizando-se 1 mL do antígeno aplicado, via intramuscular, na coxa, sem adjuvantes, a intervalos com variação de 7 a 10 dias. Após a quarta imunização, foram colhidas as primeiras amostras de sangue dos coelhos, correspondentes, em média, a 10 mL obtidos do terço superior da orelha, utilizando-se seringa hipodérmica descartável. O material coletado permaneceu no interior da seringa, sendo deixado à temperatura ambiente por 8 horas. O plasma foi separado, centrifugado por duas vezes a 2.000 rpm por 10 minutos e colocado em banho-maria a 55°C por 30 minutos, para inativação de proteínas que compõem o sistema complemento. Posteriormente, os soros foram identificados e estocados a 4°C.

Antes dos ensaios imunológicos, os anti-soros foram purificados, por passagem em coluna contendo proteína "A", extraída de *Staphylococcus aureus*, embebida em agarose. Foram eluídos 5 mL de tampão de ligação (20 mM Na₂PO₃, pH 7,0), através da coluna "HiTrap Protein A". Em seguida, foram aplicados 10 mL do soro, diluídos a 1:100 em tampão de ligação. As colunas foram lavadas novamente com 5 mL de tampão de ligação, o material eluído foi continuamente descartado, lavando-se, assim, as imunoglobulinas não-específicas e outras proteínas. Na etapa final, foi adicionado 1 mL de tampão de eluição (100 mM ácido cítrico, pH 3,0), as imunoglobulinas IgG foram eluídas da fase estacionária (proteína "A" em agarose) e recolhidas em frascos de

vidro esterilizados. A esses frascos foram adicionados 200 µL de tampão tris-HCl pH 9,0, que elevaram o pH da solução contendo o anti-soro purificado. Para evitar possíveis contaminações, foi utilizada azida sódica, numa concentração final de 0,02%. Os soros, identificados como AC 4558 e AC 4560, foram armazenados a 4°C até o momento dos testes.

O método indireto Elisa ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"), proposto por Levanony et al. (1987), com adaptações de Reis et al. (1997), foi utilizado para verificar a sensibilidade e o título dos soros purificados AC 4558 e AC 4560, nas diluições 1:1, 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 e 1:1000, bem como o nível de reação cruzada, testando-os contra diferentes isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (ENA4557, ENA4558, ENA4559, ENA4560, ENA4561 e ENA4562), *X. campestris* pv. *vesicatoria* (ENA1071), *X. campestris* pv. *campestris* (ENA4556), *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (ENA4577), *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (ENA4547), *Agrobacterium tumefaciens* (ENA4580), *Pectobacterium* sp. (ENA4551), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (M4), *H. seropedicae* (Z67), *Azospirillum brasilense* (Cd), *A. lipoferum* (Sp59) e *Burkholderia brasilense* (M130).

O método consistiu do crescimento dos isolados bacterianos em meio de DYGS, a 30°C, por 24 horas, sob agitação (150 rpm), seguido de centrifugação de alíquotas de 1 mL a 2.000 rpm por 3 minutos e ressuspenso em 1 mL de tampão carbonato-bicarbonato 50 µM pH 9,6.

Em seguida, foram feitos ajustes das concentrações dos antígenos para uma densidade ótica (DO) igual a 1,0±0,1, lida em comprimento de onda $\lambda = 436$ nm. Os poços das placas de Elisa foram, então, impregnados com 50 µL dos antígenos calibrados, seguindo-se incubação a 4°C por 16 a 18 horas. Decorrido esse período, os poços foram lavados com solução de lavagem [tampão PBS (g L⁻¹): NaCl, 8,0; KCl, 0,2; Na₂HPO₄.2H₂O, 1,4; KH₂PO₄, 0,2; 0,05% de Tween 20; e 0,5% de BSA] e as reações inespecíficas foram bloqueadas, utilizando-se solução de soro albumina bovina (3% em PBS) por 30 minutos, a 37°C.

Foram adicionados 50 µL do anticorpo por poço, na diluição adequada ao tipo de ensaio, incubando-se as placas por mais 30 minutos, a 37°C. Repetiram-se três lavagens com 200 µL da solução PBS por poço. Foram, então, aplicados 50 µL de anticorpo secundário (imunoglobulinas IgG de cabra, conjugadas com

peroxidases produzidas contra imunoglobulinas de coelho), diluído 1:1000 em PBS, incubado por 45 minutos a 37°C e, posteriormente, os poços foram tratados com solução de lavagem por cinco vezes. Adicionou-se, por fim, 100 µL de Signal ABTS (Tampão para ABTS – solução estoque: 1,67 g de tampão para ABTS em 10 mL de água destilada; solução para o substrato: diluição do tampão para ABTS 1:10 em água destilada, acrescentado de 1 mg mL⁻¹ de ABTS). Durante o tempo de reação do substrato com a enzima, as placas foram agitadas a 100 rpm e as leituras de absorbância, após desenvolvimento da reação, foram realizadas em espectrofotômetro Labsystem Multiskan Plus, com filtro de 405 nm. Os dados foram processados pelo programa “Labsystems Transmit Multiskan Plus for Windows”.

Os controles foram obtidos com poços preenchidos com soro pré-imune ou sem o anticorpo primário, sem o anticorpo secundário, sem antígeno e somente com o substrato (Signal ABTS), aplicado diretamente em determinados poços da placa. Diminuídos os valores de absorbância dos soros pré-ímmunes, foram consideradas positivas todas as reações cujos valores foram superiores ao obtido da subtração.

Para determinar a sensibilidade dos anticorpos produzidos (nível mínimo de detecção do antígeno), células do antígeno *Xcvi* foram diluídas em concentrações com variação de 10¹ a 10⁸ ufc mL⁻¹ e submetidas ao método Elisa.

Os dados foram analisados com a aplicação de análise de variância univariada paramétrica, mediante teste F, após os dados serem transformados com a expressão $(X + 0,5)^{0,5}$, para adequação da distribuição dos erros aleatórios à curva normal e homogeneidade da variância. A significância do teste F foi avaliada a partir da aplicação do teste de Scott-Knott, para a comparação das médias observadas em cada tratamento, a 5% de probabilidade.

Os soros apresentaram reatividade acima da diluição de 1:500, com valores de absorbância superiores aos controles (ensaio em branco), representados pelos poços das reações com soros pré-ímmunes (Figura 1). Os maiores valores encontrados nesses controles foram tomados como pontos de referência, abaixo dos quais as reações foram consideradas negligenciáveis.

O critério adotado para definição do título de anti-soros, geralmente, baseia-se na diluição máxima de maior reatividade. Entretanto, é importante observar que diluições crescentes de IgG tendem a promover um aumen-

to de especificidade, associado à queda de sensibilidade (Schloter et al., 1995). Tal efeito paradoxal deve ser sempre considerado na definição do título do anti-soro e é fortemente dependente do objetivo da pesquisa. Por exemplo, em ensaios de detecção *in situ*, onde a concentração do antígeno é variável, e onde uma série de sítios antigênicos podem aumentar consideravelmente as reações inespecíficas, seria recomendável o emprego de diluições de IgG, menores do que aquelas utilizadas em ensaios com culturas puras, da respectiva bactéria. Diluições até 1:500 podem ser empregadas para os anti-soros purificados (anticorpos AC 4558 e AC 4560). Porém, neste trabalho, procurou-se utilizar a diluição que fosse a mais reativa, sendo assim, a diluição escolhida e utilizada nos testes de Elisa foi de 1:10.

O nível mínimo de detecção da bactéria, para os dois anticorpos produzidos, apresentou-se dentro da normalidade, mostrando boa sensibilidade em diluições equivalentes a 10⁶ ufc mL⁻¹ (Figura 2). Observou-se que o soro produzido contra o isolado 4558, foi capaz de apresentar razoável reatividade com a concentração de bactérias até 10⁴ ufc mL⁻¹, apresentando um limite de detecção ainda mais promissor para trabalhos de diagnóstico, que utilizam material vegetal. Os valores obtidos foram satisfatórios, considerando-se o nível teórico (10⁵ ufc mL⁻¹), creditado para essa técnica. Resultados comparáveis foram encontrados por Reis et al. (1997), com soros também purificados em proteína A, em que o nível mínimo de detecção situou-se em torno de

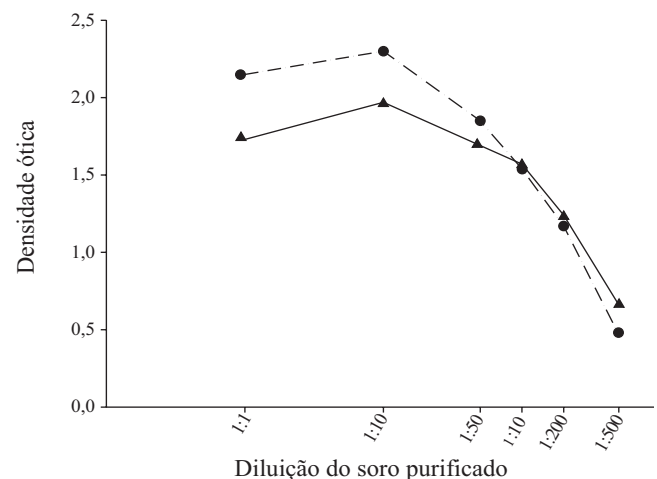


Figura 1. Determinação do título dos anticorpos policlonais AC 4558 (●) e AC 4560 (▲), produzidos contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, pelo método Elisa com filtro de interferência a 405 nm.

10^6 ufc mL⁻¹, para o isolado Z67 de *Herbaspirillum seropedicae*.

A determinação da especificidade, dos anti-soros purificados, foi obtida por meio de testes de reação cruzada com os anticorpos AC 4558 e AC 4560, na diluição de 1:10, contra um número de espécies de bactérias fitopatogênicas (Figura 3). Os valores obtidos foram expressos em percentuais de reação cruzada, adotando-se como 100% os padrões de densidade ótica, referentes aos isolados de *Xcvi* que deram origem ao anti-soro. Ambos os anticorpos foram sensíveis contra isolados da espécie original, alcançando valores médios superiores a 85%. Embora tenham sido verificadas reações cruzadas contra diferentes espécies de bactérias, estas ocorreram em baixos percentuais.

As reações cruzadas mais elevadas (aproximadamente entre 20% e 30%) relacionaram-se às fitobactérias *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *X. campestris* pv. *campestris* e *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae*, as quais diferem de *Xcvi* apenas em nível subespecífico, o que poderia justificar as afinidades sorológicas constatadas.

Reações cruzadas entre patovares de *Xanthomonas* com anti-soros policlonais têm sido registradas, mas são de pouca importância prática, uma vez que esses

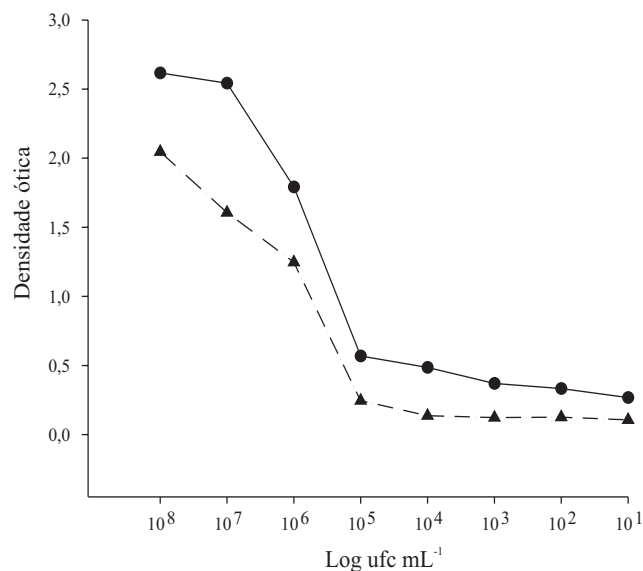


Figura 2. Determinação do nível mínimo de detecção dos anticorpos policlonais AC 4558 (●) e AC 4560 (▲) anti *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, utilizando anticorpo primário diluído a 1:10 e anticorpo secundário a 1:100, pelo método Elisa com filtro de interferência a 405 nm.

patovares possuem hospedeiros específicos (Alvarez & Lou, 1985). Mesmo anticorpos monoclonais podem desenvolver reações cruzadas, conforme se verificou em estudo com *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* (Sanders et al., 1994). Os anticorpos AC 4558 e

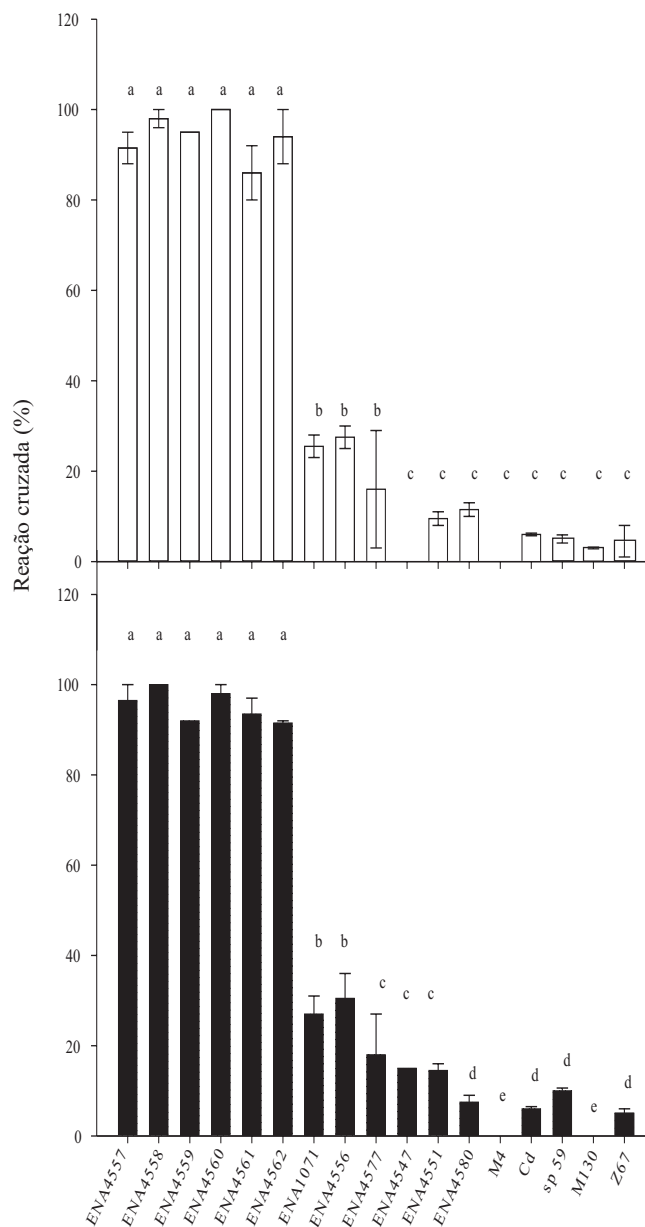


Figura 3. Reação cruzada dos anticorpos policlonais AC 4560 (□) e AC 4558 (■) com diferentes espécies bacterianas pelo método Elisa. Barras transversais indicam erro padrão da média; tratamentos com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

AC 4560 revelaram padrão homogêneo de reatividade ($p > 0,05$, teste F), exemplos disto são os valores de 100% obtidos contra os isolados ENA4558 e ENA4560 de Xcvi, para ambos os anticorpos.

Agradecimentos

Ao CNPq, pela bolsa concedida a Bruno Cardoso de Oliveira; à Capes, pela bolsa concedida a José Carlos Polidoro; à Embrapa Agrobiologia, pela cessão dos isolados.

Referências

- ALVAREZ, A.M.; LOU, K. Rapid identification of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* by Elisa. **Plant Disease**, v.69, p.1082-1086, 1985.
- ARAUJO, J.S.P. **Perfil epidemiológico e subsídios para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera* L.) no Brasil**. 2001. 121p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; KAHANA, Z. Enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and enumeration of *Azospirillum brasilense* Cd in cereal roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.358-364, 1987.
- NASCIMENTO, A.R.P.; MARIANO, R.L.R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, v.34, p.301-307, 2004.
- REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A.; FERNANDES, M.F.; FERREIRA, A.C.; REIS, F.B.; RIBEIRO, J.R.A.; SALLES, J.F.; WEBER, O.B. **Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas**. Seropédica: Embrapa CNPAB, 1997. 11p.
- REIS, V.M.; REIS JUNIOR, F.B.; SALLES, J.F.; SCHLOTTER, M. Characterisation of different polyclonal antisera to quantify *Herbaspirillum* spp. in Elephant Grass (*Pennisetum purpureum* Schun.). **Symbiosis**, v.29, p.139-150, 2000.
- SANDERS, G.M.; VERSCHOOR, J.A.; WYNGAARD, S.V.; KORSTEN, L.; KOTZÉ, J.M. Production of monoclonal antibodies against *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* and their use to investigate differences in virulence. **Journal of Applied Bacteriology**, v.77, p.509-518, 1994.
- SCHLOTTER, M.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A. The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. **Biotechnology Advances**, v.13, p.75-90, 1995.

Recebido em 27 de abril de 2004 e aprovado em 22 de outubro de 2004