

Imunoglubulina IgG

Introdução

Bactérias diazotróficas estão presentes na natureza associadas a diversas plantas e podem formar estruturas simbióticas como os nódulos ou viver associadas as plantas desde a sua superfície até o interior do tecido vegetal. O sucesso mais conhecido de seu uso é o inoculante para algumas plantas da família das leguminosas como o caso da soja utilizando *Bradyrhizobium japonicum*. Entretanto, outras bactérias podem vir a ser usadas como inoculantes para plantas de outras famílias como por exemplo as gramíneas utilizando o *Azospirillum* spp. Muitos trabalhos já foram conduzidos em diferentes países do mundo por mais de 20 anos com experimentos de inoculação com *Azospirillum* em campo e mostraram aumento da produção de culturas de importância agronômica em diferentes solos e climas, com sucesso da ordem 60-70% e incrementos de produtividade com diferenças estatisticamente significantes entorno de 5-30% na produção (OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

O uso de ferramentas imunológicas pode auxiliar na triagem de microrganismos inoculados nas culturas, permitindo exames qualitativos e quantitativos com intuito de melhor direcionar os estudos com inoculação. O conhecimento adquirido sobre o sistema imunológico,

Técnica de Adsorção para Obtenção de Soro Policlonal Estirpe Específico de Bactérias Diazotróficas

Marinete Flores da Silva¹
Verônica Massena Reis²

principalmente sobre a produção de anticorpos, conduziu a uma revolução nas técnicas usadas nas ciências biológicas. Atualmente, uma grande parte dos métodos bioquímicos e histológicos lança mão desta fascinante e importante ferramenta chamada de anticorpo para alcançar seus objetivos. Ensaio imunoenzimáticos, como os testes de imunoabsorção com enzima ligada (ELISA – “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”), têm diversas aplicações e vem sendo utilizado a mais de 25 anos. Foi primeiramente introduzido por ENGVALL & PERLMANN (1971) para análise dos microrganismos nos diferentes ambientes e desde então têm sido aplicado para diferentes microrganismos com diferentes finalidades como para estudos de diversidade, detecção e quantificação microbiana em diferentes culturas de importância agronômica. Esta técnica tem como vantagens a sua robustez, simplicidade, rapidez na obtenção dos resultados e como principal desvantagem o limite de detecção (acima de 10^4 a 10^5 células ml^{-1} ou g^{-1} de amostra dependendo do soro). O teste de ELISA pode ser direto, onde o soro é aplicado diretamente sobre a placa e a bactéria se liga a este, ou indireto onde quem cobre a placa é a bactéria e o soro só se liga se houve afinidade. A diferença fica mais fácil de visualizar através do esquema apresentado a seguir.

¹ Aluna de Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo, UFRuralRJ. Apoio – CAPES. E-mail: marineteflores@yahoo.com.br

² Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, Agrônoma-PhD em Ciência do Solo, km 07 da Rodovia BR 465, CP 74.505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ. E-mail: veronica@cnpab.embrapa.br

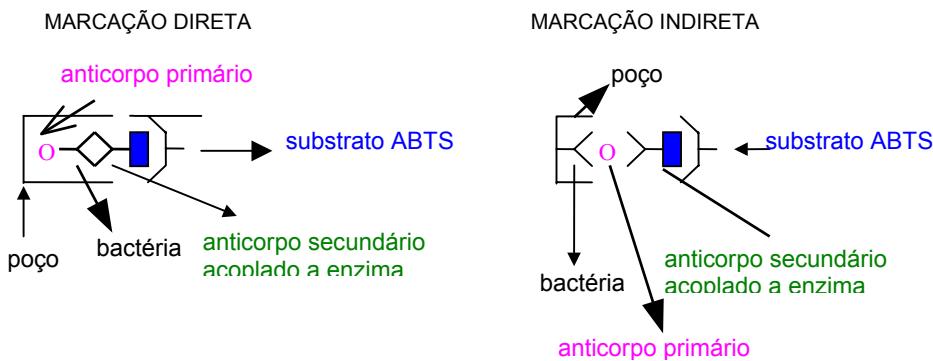


Figura 1: Diferença entre os modos de se fazer o teste de ELISA com a enzima peroxidase e o substrato ABTS

Este Comunicado Técnico tem o objetivo de explicar como se pode obter um soro policlonal estirpe-específico para a detecção e quantificação das bactérias diazotróficas associativas como por exemplo as do gênero *Azospirillum* spp. Neste caso, vamos usar como exemplo o soro produzido contra a estirpe Cd de *Azospirillum brasiliense*, mas nada impede que outra bactéria seja usada como tal, sendo esta diazotrófica ou não. Esta metodologia permite a detecção da estirpe alvo com o custo muito baixo, sem a necessidade de utilizar métodos mais caros, como o uso de soros monoclonais.

Metodologia

1. Preparo dos inóculos bacterianos

Para produção do soro foi seguido o procedimento descrito por REIS et al. (2000). O soro para a estirpe Cd de *Azospirillum brasiliense* foi produzido em dois coelhos da raça Nova Zelândia com idades entre 30-45 dias. Um terceiro coelho foi utilizado como controle do ambiente, para verificar se as condições de criação dos animais por si não causava reações imunológicas ou mesmo se o animal já não possuía antígenos idênticos a bactéria que se deseja produzir.

Os imunógenos foram preparados a partir de células puras e intactas da bactéria alvo. A bactéria foi crescida em frascos contendo 50 mL do meio NFb (DÖBEREINER et al., 1995) acrescido de 0,1% de NH₄Cl. As células foram mantidas a 30° sob agitação de 175 rpm e coletadas após 24 h. Após o crescimento, as bactérias foram transferidas para tubos do tipo FALCON™ com capacidade para 50 mL e lavadas

3 vezes por centrifugação a 10.000 rpm por 6 min à 25°C utilizando água destilada estéril para eliminar os produtos do metabolismo da bactéria. O sobrenadante (meio de cultivo) foi descartado e o pellet ressuspensionado em 2 mL de água destilada estéril. A suspensão foi tratada termicamente a 90°C por 30 min para neutralizar e eliminar proteínas do flagelo, mantendo as células vivas e intactas. Após este tratamento os animais foram inoculados.

2. Produção dos soros policlonais

Inicialmente, foi retirado cerca de 5 mL de sangue de cada animal para a obtenção do soro pré-imune. Este soro foi utilizado como controle (branco) nos imunoensaios. A primeira imunização consistiu da mistura de 0,5 mL de cada adjuvante de Freund's: completo e incompleto (SIGMA CHEMICAL CO., USA) misturado a 1mL da suspensão bacteriana, sendo então homogeneizados. As aplicações foram feitas no dorso do animal via subcutânea, em seis diferentes pontos por coelho (HARLOW & LANE, 1998). Sete dias após a primeira imunização foi feita a segunda inoculação, sendo esta intramuscular, num total de nove imunizações com intervalos de sete dias entre aplicações de 1mL do inóculo bacteriano, sendo as cinco últimas com intervalos de dois dias entre aplicações perfazendo um total de 2,5 meses para a obtenção do soro. Antes da sangria total foi retirada uma amostra de 5 mL do sangue, obtido do terço médio superior das orelhas dos coelhos com auxílio de seringa plástica descartável, para acompanhar a evolução das imunoglobulinas da classe G. A coleta final do sangue resultou em

aproximadamente 50 mL por coelho retirado através de pulsão cardíaca (direto do coração) com o auxílio de uma agulha e seringa de 50 mL. Este procedimento não causa a morte do animal se feito com cuidado. O sangue coletado ficou coagulando por 3 h à temperatura ambiente, dentro da seringada 50 mL, para que o plasma sangüíneo fosse liberado. Posteriormente, o plasma foi transferido para microtubos de centrífuga com 1,5 mL de capacidade, centrifugados a 4°C por 10 min a 10.000 g para remover partículas sólidas presentes, como hemáceas. Após esta etapa, apenas o sobrenadante foi recolhido, transferido para novos microtubos, onde sofreu tratamento térmico a 56°C por 30 min a fim de inativar as proteínas do sistema complemento. Ao final, alíquotas de 1mL do soro foram transferidas para frascos de vidro estéreis e armazenados a -18°C (freezer), podendo ficar armazenados nestas condições por 2 anos ou mais, dependendo da reatividade. Este soro é denominado de soro bruto pois não recebe nenhum tipo de purificação.

3. Purificação utilizando coluna preenchida com proteína-A

Para a purificação do soro visando a eliminação das imunoglobulinas inespecíficas foi utilizada uma coluna preenchida com proteína-A extraída de *Staphylococcus aureus* - (HI-TRAP, Merk), com capacidade de retenção de 0,5-1,0 mg de IgG. A purificação do anticorpo foi realizada para aumentar a afinidade dos mesmos e melhorar seu desempenho no Método ELISA Indireto, além de diminuir o background de reação e aumentar a concentração de imunoglobulinas específicas (HARLOW & LANE, 1988). O método baseia-se na afinidade específica da proteína A pela fração IgG do anticorpo, responsável pela resposta específica aos抗ígenos, e eliminação de imunoglobulinas inespecíficas (IgM, IgA, IgD e IgE).

Inicialmente lavou-se a coluna duas vezes com 1 mL de Tampão de Lavagem (Tris [100 mM], pH 8,0, GibcoBRL, Life Technologies). Esta lavagem tem o objetivo de limpar a coluna e promover seu equilíbrio para as condições reinantes no tampão.

Em seguida aplicou-se 10 mL do soro diluído 1:100 no Tampão de Lavagem. Lavou-se novamente a coluna, utilizando-se o mesmo tampão (duas vezes 1 mL), para que as imunoglobulinas – IgM, IgE, IgD, IgA e outras - sem afinidade com a coluna fossem removidas. A próxima etapa consistiu na eluição das imunoglobulinas específicas (IgG's) de sua fase estacionária (proteína A em agarose) através da lavagem da coluna com duas vezes 1 mL de Tampão Glicina ([100 mM], pH 3,0 e/ou 4,0, Vetec). As alíquotas eluídas foram recolhidas em frascos de vidro estéril. Ajustou-se o pH do anticorpo purificado para próximo de sete utilizando-se NaOH 0,5 M (50 µL para os eluídos em pH 3,0 e 15 µL para os eluídos em pH 4,0). Em seguida precedeu-se a leitura da densidade ótica para verificar a concentração total de proteínas purificadas. A leitura foi realizada no comprimento de onda 280 nm e os valores de absorbância obtidos foram convertidos em valores de concentração de proteína pela relação $ABS_{280\text{nm}} = 1 \Leftrightarrow 0,75 \text{ mg de ptn}$ (HARLOW & LANE, 1988). Os soros purificados foram armazenados a 4°C após a adição de azida sódica (20 µL do estoque 2% em PBS para cada 2 mL de soro). Para a armazenagem da coluna, após a purificação, lavou-se a mesma duas vezes com 1 mL de Tampão Glicina (pH 3,0) e a mesma foi armazenada com o Tampão Tris a 4°C. Este soro foi denominado de soro purificado.

4. Aplicação do ELISA indireto (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

O procedimento adotado para o método ELISA ("Enzyme-linked Immunosorbent Assay") foi o indireto, seguindo a metodologia descrita por REIS et al., (2000). Este procedimento consiste do crescimento das estirpes bacterianas em meio líquido, neste caso NFb para *A. brasiliense*, a 175 rpm por 24 h a 30°C. Alíquotas de 1 mL foram centrifugadas a 7000 g por 5 min e ressuspensas em 1 mL de tampão carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,5. Em seguida, foi feito o ajuste da concentração celular para 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) mL^{-1} numa densidade ótica igual a 1,0, lida no comprimento

de onda de 436 nm, que foi usado em todos os testes. O teste de ELISA indireto avaliou o soro bruto e o mesmo purificado em coluna preenchida com proteína A isolada de *Staphylococcus aureos* (Hi TrapTM) conforme metodologia descrita por REIS et al., (2000). Os poços das placas de ELISA indireto foram impregnados com 50 µL do antígeno calibrado, e ficaram incubando por um período de 18 h a 4°C. Decorrido este tempo, o excedente foi descartado e os poços foram lavados com solução de lavagem [Tampão PBS (g L⁻¹): NaCl – 8,0; KCl – 0,2; Na₂HPO₄. H₂O - 1,4; KH₂PO₄ – 0,2 + 0,05% Tween 20 + 0,5% BSA]. Cada placa recebeu o controle pré-imune, além de controles da reação tais como: sem anticorpo primário, sem anticorpo conjugado, sem células e só o substrato. Para as reações inespecíficas, foi utilizado 200µL da solução de bloqueio com leite desnatado (leite Molico solução 3% em PBS) a 37° por 30 min. Adicionou-se 50 µL por poço na diluição adequada ao tipo de ensaio o anticorpo primário, as placas foram incubadas por um período de 30 min a 37°C. Após esta etapa, o excesso foi eliminado e a placa foi lavada por três vezes com 200 µL de solução de lavagem por poço. Adicionou-se 50 µL por poço na diluição 1: 4000 do anticorpo secundário (anti-rabbit IgG Alkaline Phosfatase conjugate, SIGMA). As placas foram incubadas por um período de 45 min a 37°C. Após esta etapa, o excesso foi eliminado e as placas foram lavadas por cinco vezes com 200 µL de solução de lavagem por poço. Em seguida, adicionou-se 100 µL do substrato (p-Nitrophenyl Phosphate, Calbiochem) para a enzima. As placas foram agitadas a 100 rpm por 30 min a 37°C no escuro em agitador para microplacas (IKA SCHUTTLER, Germany). As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro Labsystems iEMS READER MF (Labystems Oy, Helsinki - Finlândia) com filtro de interferência a 405 nm, acoplado a um computador pessoal Pentium, onde os dados foram armazenados.

5. Caracterização dos soros policlonais bruto e purificado

5.1. Título

Foram feitos os títulos do soro bruto e do purificado para determinar a melhor diluição deste visando a sua utilização nos testes posteriores. Os títulos foram preparados através de diluições seriadas dos soros que variaram de 1:500 a 1:20.000 para o soro bruto e para o soro purificado foram utilizadas as diluições seriadas que variaram de 1:10 a 1:1000 através do método de ELISA indireto, com as microplacas sensibilizadas com antígenos alvos ajustados para 10⁸ células mL⁻¹. Foram feitas três repetições de cada leitura.

5.2. Sensibilidade

Para testar a sensibilidade máxima dos soros bruto e purificado foram feitas diluições seriada do antígeno utilizado para a imunização, que variaram de 10⁸ a 10¹ células mL⁻¹ a partir da amostra inicial onde a D.O. foi igual a 1 (10⁸ células mL⁻¹). As microplacas de ELISA foram sensibilizadas com as células de *Azospirillum brasiliense* estirpe Cd. Foram feitas quatro repetições de cada leitura.

5.3. Especificidade

O teste de especificidade foi feito utilizando estirpes purificadas e depositadas na coleção de bactérias diazotróficas de Embrapa Agrobiologia (www.cnpab.embrapa.br) e pertencentes à diferentes gêneros e espécies bacterianas. Todos os isolados foram crescidos em meio líquido variando a formulação de acordo com a espécie que se deseja crescer. Neste caso do nosso exemplo, foram utilizados os meio de cultivo descrito por DÖBEREINER et al., (1995) tais como NFb para *Azospirillum brasiliense* e *A. lipoferum*, LGI para os isolados *Azospirillum amazonense*, JNFb para os isolados de *Herbaspirillum* spp., JMV pH 5,5 para *Burkholderia* spp (BALDANI, 1996) e o meio líquido 79 com pH 7,0 para estirpes de *Rhizobium* spp. As estirpes foram crescidas à 30°C por 16 horas a 175 rpm. A densidade ótica foi ajustada para que todas as estirpes estivessem com 10⁸ células mL⁻¹. As microplacas foram sensibilizadas e aplica-se o

teste ELISA indireto utilizando os soros bruto e purificado. Foram feitas três repetições de cada leitura.

Os isolados utilizados nos testes de reação cruzada estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Isolados utilizados nos imunoensaios de especificidade dos soros produzidos contra o *Azospirillum brasiliense* estirpe Cd.

Espécie/Estirpe	Planta	Parte da Planta	Origem
<i>A. brasiliense</i>			
1- Cd ^T	<i>Cynodon dactylon</i>	Raízes	Israel
2- Sp 245	Trigo	Raiz desinfestada	Brasil
3- 7Mst	Milho	Raiz esterilizada	Argentina
4- 48BC(1)	Milho	Solo	CNPAB
5- Sp108	Milho	Raiz desinfestada	CNPAB
6- Sp 80	Milho	Raiz estéril	CNPAB
7-15C4	Milho	Mutante NR ⁻	Argentina
8-F2	Milho	Mutante	México
9- RLM ⁻² R3	Milho	Raiz lavada	CNPAB
10- Sp107	Trigo	Raiz desinfestada	Brasil
11- 4REe1	Milho	Raiz lavada	CNPAB
12- 15REa	Milho	Raiz lavada	CNPAB
13- Sp242	Milho	Raiz estéril	CNPAB
14- JA16	Trigo	Raiz lavada	CNPAB
15- 48BC	Milho	Solo entrelinha	CNPAB
16-I2	Feijão	sementes	Brasil
<i>A. lipoferum</i>			
17- JA10	Trigo	Raiz lavada	Brasil
18- D13	Mutante NR ⁻ de 242	Rizosfera	Brasil
19- Sp59a ^T		Raiz desinfestada	Brasil
20-BR 17 ^T	Milho	Raiz lavada	Brasília
21- JA4	Trigo	Raiz desinfestada	Brasil
22- RL ⁻³ 11	Milho	Raiz desinfestada	CNPAB
23-Sp204	Milho	Raiz lavada	Brasil
24- 12REC1	Milho	Raiz desinfestada	CNPAB
25- BSL505	Milho	Raiz lavada	CNPAB
26- R1	Trigo	Raiz	Brasil
27- I4	Trigo	Xilema	Brasil
28- 2569	Milho	SI	CNPAB
29-JA2	Milho	Raiz lavada	P. Fundo
<i>A. amazonense</i>			
30- Ym 6 ^T	Milho	Rizosfera	CNPAB
31- Ym 10	Milho	Rizosfera	CNPAB
32-Am3	Milho	Xilema	CNPAB
33-Ym54	Milho	Raiz lavada	CNPAB
34-Am7	Milho	Xilema	CNPAB
35-Am 12	Milho	Xilema	CNPAB
36- Am 15	Milho	Xilema	CNPAB
37-Ym148	Milho	Solo rizosfera	CNPAB
38-Am5	Milho	Xilema	CNPAB
39-Y2 ^T	<i>Hyparrhenia rufa</i>	Raiz esterilizada	CNPAB
40-Am28	Milho	Xilema	CNPAB
41-Ym22	Milho	Solo rizosfera	CNPAB
42-CBAmC	<i>Cana-de-açúcar</i>	Colmo	CNPAB
43-Y6		Raízes	CNPAB
44-Y36	Milho	Raiz desinfestada	CNPAB
45-Am19	Milho	Xilema	CNPAB
46-Am8	Milho	Xilema	CNPAB
47-Am76	Milho	Raiz lavada	CNPAB
48-Eym42	Milho	Raiz lavada	CNPAB
49-Am16	Milho	Xilema	CNPAB
50-Ym11	Milho	Raiz lavada	CNPAB
51-Ym69	Milho	Raiz desinfestada	CNPAB
52-Am24	Milho	Xilema	CNPAB
<i>H. rubrisubalbicans</i>			
53- HRC51	<i>Cana-de-açúcar</i>	Raízes	CNPAB
54-M1	<i>Cana-de-açúcar</i>	Folhas	CNPAB
55-M5	<i>Cana-de-açúcar</i>	Folhas	CNPAB
56- M4 ^T	<i>Cana-de-açúcar</i>	Folhas	CNPAB
57- HCC103	<i>Cana-de-açúcar</i>	Colmo	CNPAB
<i>H. seropediae</i>			

Espécie/Estirpe	Planta	Parte da Planta	Origem
58- 74 R	Arroz	Rizosfera	CNPAB
59-ZMS 152	Milho	Raízes	CNPAB
60- ZAE 78	Sorgo	Raízes	CNPAB
61- HRC54	Cana-de-açúcar	Raiz esterilizada	CNPAB
62- ZAE67 ^T	Arroz	Raízes	CNPAB
63-HRC80	Cana-de-açúcar	Raízes	CNPAB
64- IR B6 509	Arroz	Raízes	CNPAB
<i>H. frisingense</i>			
65-GSF 30 ^T	<i>Miscanthus sacchariflorus</i>	Raízes	Alemanha
<i>Burkholderia sp.</i>			
66- M130	Arroz	Raiz esterilizada	CNPAB
67- Sp36	Arroz	Raízes lavadas	CNPAB
68- MV219	Arroz	Raiz esterilizada	CNPAB
69-F129	Arroz	Raiz esterilizada	CNPAB
70-F142	Arroz	Parte aérea	CNPAB
71-M130	Arroz	Raiz esterilizada	CNPAB
72- Ppe7	Cana-de-açúcar	Parte aérea	CNPAB
73-TVV75	Arroz	Rizosfera	Vietnã
74-114	Arroz	Parte aérea	CNPAB
75-139	Arroz	Parte aérea	CNPAB
<i>B. gladioli</i>			
76-LMG2216	<i>Gladiolus sp.</i>	-	-
<i>B. sacchari</i>			
77-IPT 101 ^T	Cana-de-açúcar	Solo	USDA
<i>B. tropica</i>			
78- Ppe8 ^T	Cana-de-açúcar	Parte aérea	CNPAB
79-Ppe4	Cana-de-açúcar	Parte aérea	CNPAB
<i>B. kururiensis</i>			
80- KP23 ^T	Aquíferos poluídos		Japão
<i>Rhizobium tropici</i>			
81- BR 520	Feijão	Nódulos de raízes	CPAC
82-BR920	Leucaena	Nódulos de raízes	Brasil
<i>Rhizobium huakii</i>			
83-BR524	<i>Stragalus simicus</i>	Nódulos de raízes	USDA
<i>S. medicae</i>			
84-BR525	<i>Medicago sativa</i>	Nódulos de raízes	USDA
<i>R. geardini</i>			
85-BR529		Nódulos de raízes	
<i>S. saheli</i>			
86-BR526	<i>Sesbania cannabina</i>	Nódulos de raízes	Senegal
<i>R. leguminosarum</i>			
87-BR292	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Nódulos de raízes	USDA

CNPAB – Embrapa Agrobiologia – Coleção de Bactérias Diazotróficas

5.4 Imunoadsorção (REIS et al., 2000)

Após a avaliação da reação cruzada (teste de especificidade), foi escolhida a estirpe que apresentou valor de densidade ótica elevado (em torno de 60 a 70%) comparado com a estirpe usada na imunização e que poderia ser perdida após a adsorção. Em geral, recomenda-se a escolha de estirpes que compartilhem até 60 a 70% de reações cruzadas pois esta porcentagem será perdido, restando de 30 a 40% de reações específicas de interesse.

A estirpe eleita no nosso exemplo foi o isolado de *Azospirillum brasiliense* Sp 80. O isolado cresceu em 500 mL de meio de cultura NFb + 0,1% de NH₄Cl por 24 h a 30°C a 175 rpm. A cultura foi centrifugada a 5.000 g em tubos do tipo FALCONTM, com capacidade para 50 mL, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 500 µL de PBS,

correspondendo a uma D.O. igual a 3 (a 436nm), estando as células concentradas. As células bacterianas (5 mL) foram mortas com a adição de azida sódica (0,002%) por 5 min. Em seguida, adicionou-se 500 μ L do soro purificado de *Azospirillum brasiliense* (Cd) contra a massa celular da estirpe *A. brasiliense* (Sp 80). Incubou-se a massa celular mais o soro sob agitação de 175 rpm por 2 h a 30°C. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 4.000 g durante 5 min, o sobrenadante foi recolhido e o pellet descartado. Esta etapa final foi repetida cinco vezes até a completa eliminação do pellet. Em seguida, novos testes de reação cruzada foram feitos com os soros purificados. Foram feitas três repetições de cada leitura.

6. Resultados

6.1. Elisa indireto para caracterizar os soros policlonais bruto e purificado

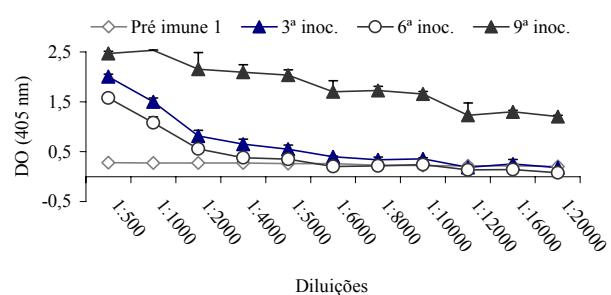
Os imunoensaios foram aplicados para caracterização dos soros policlonais produzidos contra a estirpe de *Azospirillum brasiliense*, Cd. Para tanto foram realizados testes para título, sensibilidade e especificidade dos soros bruto e purificado por cromatografia de afinidade e por imunoadsorção.

6.2. Título

O título dos soros produzidos contra a estirpe Cd (As-Cd) obtido de dois animais diferentes estão apresentados na Figura 2. Podemos notar que o título variou de acordo com o animal imunizado sendo que a reação foi maior e mais constante no animal 1. Mesmo assim só alcançou valores elevados de reatividade, medida através de colorimetria (Densidade ótica), a partir da nona inoculação. Este soro foi utilizado nos diversos ensaios descritos a seguir.

O título dos soros obtidos após o processo de purificação está apresentado na Figura 3. A escolha da melhor diluição de trabalho (a que foi usada em todos os ensaios subsequentes) foi de 1:20 levando-se em consideração o número ideal de IgG's. Poderia ter sido usada até a diluição de 1:50 neste caso. Faz-se necessário conhecer a melhor diluição devido ao que chamamos de zona

a) Animal 1



b) Animal 2

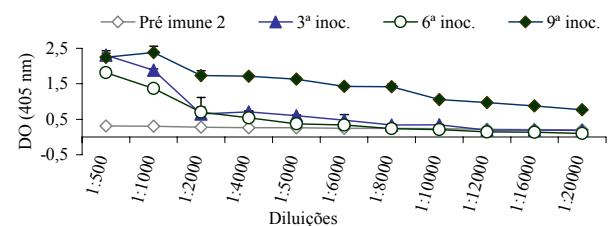


Figura 2. Valores de absorbância a 405 nm dos títulos de pré-imune, parciais e final do soro produzido contra a estirpe padrão de *A. brasiliense* Cd (As-Cd) utilizando o primeiro (a) e segundo (b) animal imunizado. Valores médios de três repetições.

de equivalência entre antígeno e anticorpo pois assim evita-se o excesso de IgG's que atrapalham a reação. Este efeito de excesso de imunoglobulinas é chamado de pró-zona e nesta faixa onde a diluição é pequena (abaixo de 1:10) ocorre diminuição da DO. Foram consideradas satisfatórias as diluições até o valor de 1:100, onde se notou um leve declínio na curva de titulação e neste caso optou-se por trabalhar com a diluição 1:20 nos ensaios subsequentes para o soro.

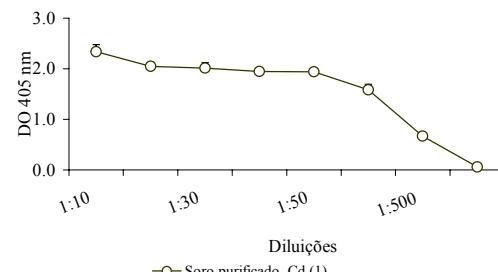


Figura 3. Título do soro produzido para a estirpe Cd de *A. brasiliense* e purificado com proteína-A. Média de três repetições.

6.3. Sensibilidade

Para determinar a sensibilidade do ELISA, foram utilizadas diluições seriadas da bactéria e o anticorpo primário foi diluído 20 vezes. Foram necessários no mínimo 10^5 células mL^{-1} de *A.*

brasiliense Cd para uma detecção positiva, tanto para o soro bruto quanto para o purificado (Figura 4).

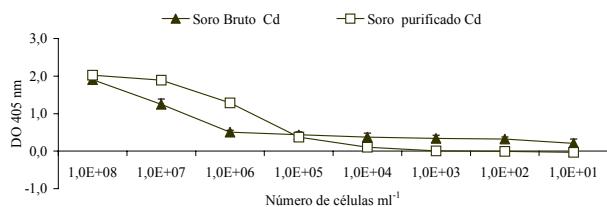


Figura 4. Valores de absorbância a 405 nm da sensibilidade dos soros bruto e purificado por cromatografia de afinidade, produzido contra *A. brasiliense Cd*. Valores médios de quatro repetições.

6.4. Especificidade

Foi avaliada a especificidade do soro As-Cd através de testes de reação cruzada contra 77 estirpes de 4 gêneros de bactérias diazotróficas de diferentes espécies, provenientes da rizosfera, solo, raiz, xilema e aquíferos. Contra estas estirpes, foram testados os soros policlonais produzidos contra *Azospirillum brasiliense Cd* bruto, e o mesmo purificado por cromatografia de afinidade o que visou a diminuição das reações inespecíficas ocasionadas pela presença de imunoglobulinas da classe IgM, IgA, IgD e IgE. A qualidade dos anticorpos produzidos pode ser demonstrada pelo título e especificidade destes. Entretanto, diferentes determinantes estão presentes nos抗ígenos e podem gerar anticorpos policlonais inespecíficos. De acordo com OLIVARES (1997), para um soro com percentuais de reação cruzada superiores a 20%, torna-se necessário um tratamento para a eliminação das imunoglobulinas inespecíficas. Este evento foi verificado através dos valores percentuais das reações com os isolados abaixo testados.

De acordo com os dados obtidos dos percentuais de reações cruzadas houve reconhecimento pelo soro purificado, produzido contra *Azospirillum brasiliense* (Cd), em torno de 60% para os isolados de várias espécies de *Azospirillum* (Figuras 5 e 6). Dos 59 isolados de *Azospirillum spp.* testados, apenas seis apresentaram valores de reação cruzada abaixo de 20%, considerados adequados para um bom teste de especificidade, os 53 restantes ou seja quase 100% apresentaram percentuais de reação cruzada, que oscilaram entre 20 e 80% (Figura 6). Estes resultados

obtidos com o soro bruto a apenas purificado com a proteína-A demonstram um elevado nível de reação cruzada entre as espécies e usando a diluição (1:20) do soro, não foi possível separar as espécies de *Azospirillum spp.* Este fato pode estar relacionado com um elevado grau de compartilhamento de determinantes antigenicos entre estas estirpes.

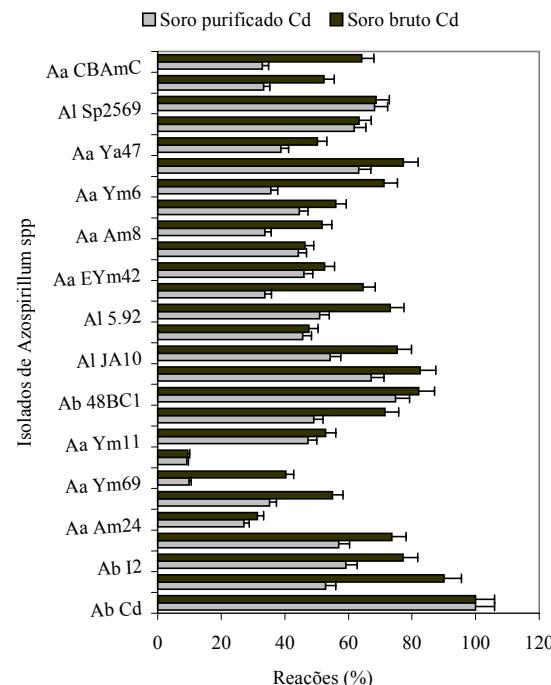


Figura 5. A especificidade dos soros policlonais bruto e purificado em coluna preenchida com proteína-A, contra diferentes isolados de *Azospirillum spp.* (% reação cruzada comparada a estirpe usada por imunização). Barras de erro indicam o desvio padrão.

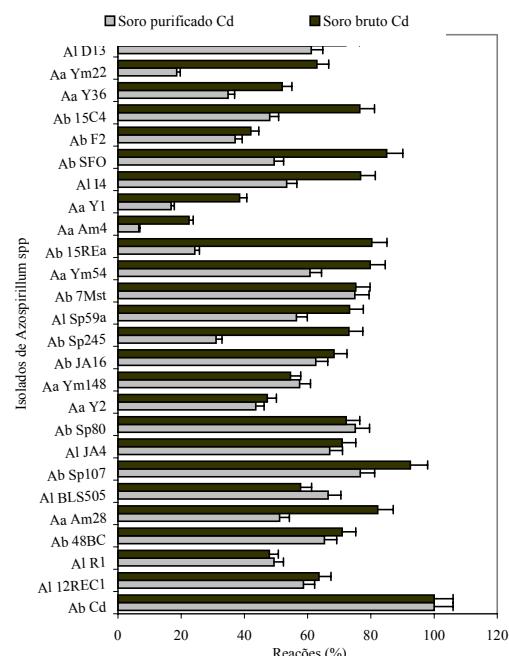


Figura 6. Continuação da especificidade dos soros policlonais bruto e purificado em coluna preenchida com ptn A, contra diferentes isolados de *Azospirillum spp.* (% reação cruzada comparada a estirpe usada por imunização). Barras de erro indicam o desvio padrão. A seta mostra a estirpe usada na etapa de purificação por adsorção.

Os dados obtidos de reação cruzada dos soros purificados produzidos contra o isolado de *Azospirillum brasiliense* Cd apresentou reações entorno de 40% contra os isolados de *Herbaspirillum spp.* (Figura 7).

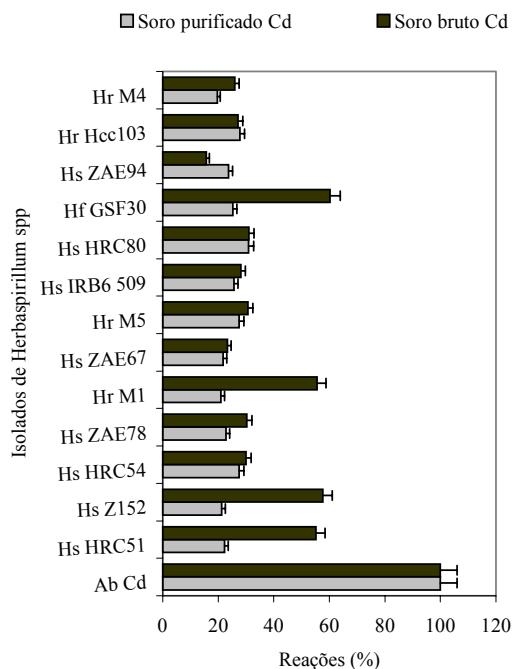


Figura 7. Especificidade dos soros policlonais bruto e purificado em coluna preenchida com ptn A, contra diferentes isolados de *Herbaspirillum spp.* (% reação cruzada comparada a estirpe usada por imunização). Barras de erro indicam o desvio padrão.

Semelhante aos dados obtidos de reações cruzadas para os isolados de *Herbaspirillum spp.*, o soro produzido contra *A. brasiliense* (Cd) apresentou percentuais de reação inespecífica entre 15 a 40% contra os isolados de *Burkholderia spp.* (Figura 8).

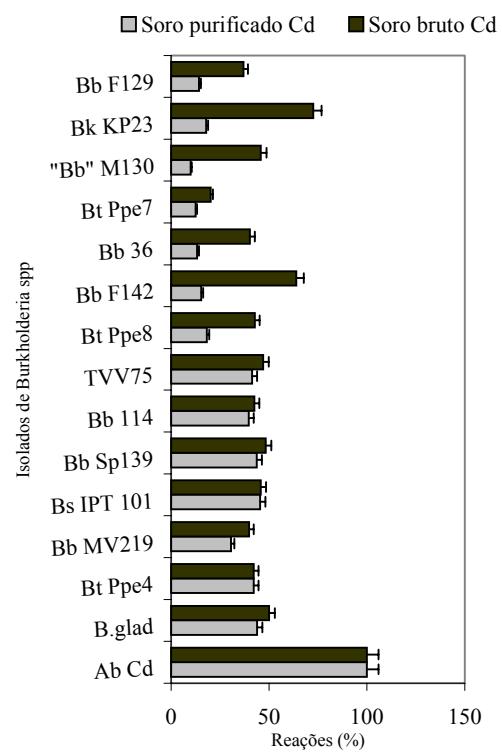


Figura 8. Especificidade dos soros policlonais bruto e purificado em coluna preenchida com ptn A, contra diferentes isolados de *Burkholderia spp.* (% reação cruzada comparada a estirpe usada por imunização). Barras de erro indicam o desvio padrão.

Para os isolados de *Rhizobium spp.*, houve entorno de 60 % de reação cruzada com o soro purificado produzido contra o isolado de *A. brasiliense* (Cd) (Figura 9).

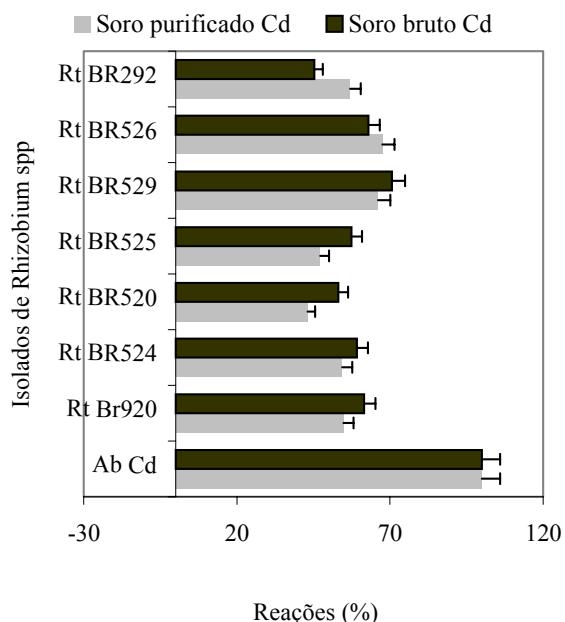


Figura 9. Especificidade dos soros policlonais bruto e purificado em coluna preenchida com ptn A, contra diferentes isolados de *Rhizobium spp.* (% reação cruzada comparada a estirpe usada por imunização). Barras de erro indicam o desvio padrão.

6.5. Adsorção

Após a purificação por adsorção, o soro As-Cd de *A. brasiliense* adsorvido contra a estirpe Sp80 foi obtido um novo soro denominado de soro Cd-Sp80. Este soro mostrou-se com propriedades estirpe-específico para o imunógeno Cd (Figura 10). Quase nenhuma reação cruzada foi observada quando testada com outras espécies de *Azospirillum* spp. que apresentou percentagem de reação cruzada abaixo de 20%. A mesma diluição pode ser usada, pois não houve perda excessiva de anticorpos do soro purificado por imunoadsorção, quando comparado ao soro purificado por cromatografia de afinidade. Isto mostra que a eliminação das imunoglobulinas inespecíficas, geradas pela diversidade de determinantes抗原icos considerados problemáticos, pode ser eliminada por uma simples incubação com células de uma estirpe semelhante mas não idêntica tornando o soro estirpe-específico.

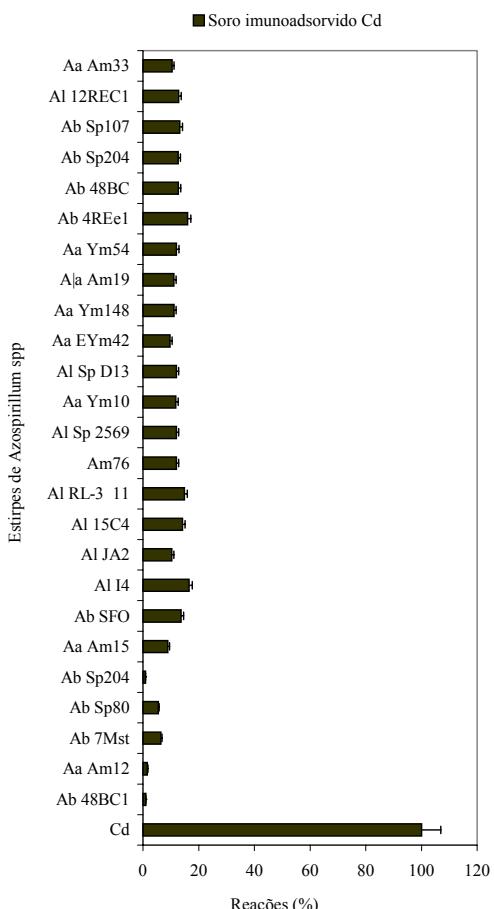


Figura 10. Especificidade do soro purificado por imunoadsorção Cd contra diferentes estíries e espécies de *Azospirillum* usando ELISA indireto (% reação cruzada comparada a estirpe usada por imunização). Barras de erro indicam o desvio padrão.

Considerações finais

Como podemos notar, a simples adição de uma etapa de incubação do soro com uma estirpe próxima a sua estirpe alvo, pode tornar um soro espécie-específico em estirpe específico, sem a perda de reações imunológicas. Esta simples etapa, chamada de adsorção, permite que se obtenha uma ferramenta capaz de detectar, quantificar e localizar uma determinada estirpe, usada por exemplo como inoculante. Esta etapa tem o custo tão reduzido, bastando apenas que seja identificada a estirpe e que se faça uma cultura de células para incubação. A alternativa se refere ao uso de anticorpos monoclonais que é muito mais cara e segue o protocolo de desenvolvimento de soro baseado em cultivo de células de hibridomas. Esta alternativa tem o custo muito elevado, além de necessitar de um laboratório com controle ambiental e um profissional capaz de desenvolver hibridomas, inviabilizando seu uso na maioria dos laboratórios nacionais.

Referências Bibliográficas

- BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica e endofítica do gênero *Burkholderia*.** 1996. 261 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro / Instituto de Agronomia, Itaguaí, RJ.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.** Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.
- ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunosorbent G. **Immunochemistry**, Elmsford, v. 8, p. 871-874, 1971.
- HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies – A Laboratory Manual.** New York: Cold Spring 1988. 726 p.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1591-1601, 1994.

OLIVARES, F. L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na identificação e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum*.** 1997. 250 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

REIS, V. M.; REIS JR., F. B.; SALLES, J. F.; SCHLTER, M. Characterization of different polyclonal antisera to quantify *Herbaspirillum* spp. in Elephant Grass (*Pennisetum purpureum* Schun.). **Symbiosis**, Rehovot, v. 29, p. 139-150, 2000.

Comunicado Técnico, 76



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento



Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia
BR465 – km 7
Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil
Telefone: (0xx21) 2682-1500
Fax: (0xx21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

1ª impressão (2005): 50 exemplares

Comitê de publicações

Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Francisco Adriano de Souza e Gustavo Ribeiro Xavier
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix.
Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia.