OBTENCIÓN DE ANTISUEROS PARA EL DIAGNÓSTICO DE *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV *TABACI*

Marusia Stefanova,[1] Ariel Basalto,[2] Geraldo H. N. Oliveira[3] y Fernanda C. Viana[3]

[1] *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600*

[2] *Instituto de Investigaciones del Tabaco. Carretera Tumbadero Km 8½, San Antonio de los Baños, La Habana*

[3] *Centro de Investigación y Desarrollo de Souza Cruz, Brasil. Av. D. Hélder Câmara 2066, CEP 21059-900, Río de Janeiro, RJ Brasil*

RESUMEN

El fuego salvaje causado por Pseudomonas syringae *pv* tabaci *es una enfermedad exótica en el cultivo de tabaco y objeto de cuarentena en Cuba. Para fortalecer la vigilancia fitosanitaria en frontera y en el territorio nacional, se obtuvieron antisueros policlonales contra la bacteria mediante la inmunización de conejos por vía intravenosa. La titulación se realizó por precipitación en tubos y por inmunofluorescencia indirecta (IFI). La lectura espectrofotométrica confirmó el alto título de los antisueros (1/5120) y su elevada capacidad precipitante. Las diluciones de los antisueros entre trescientas veinte y mil doscientas ochenta veces provocaron la precipitación del 100% de la suspensión bacteriana empleada en el ensayo. La dilución más alta por IFI en la que se obtuvo reacción serológica fue de 1/3 200. Los antisueros producidos formaron bandas de precipitación en agar noble 0,75% con cepas del patógeno de diferente origen y años, pertenecientes a la colección del Centro de Investigación y Desarrollo de Souza Cruz, en Brasil. Los resultados acreditan los antisueros para el desarrollo de técnicas serológicas convencionales y de alta resolución para el diagnóstico de la bacteria.*

Palabras clave: *tabaco, Pseudomonas syringae pv tabaci , antisueros policlonales*

ABSTRACT

Wildfire caused by Pseudomonas syringae *pv* tabaci *is an exotic disease in tobacco crop and object of quarantine in Cuba. In order to strengthening phytosanitary surveillance both at the border and in the national territory, polyclonal antisera to detect the bacteria have been obtained through intravenous immunization of rabbits. Titration was carried out by precipitation in tubes and indirect immunofluorescence (IFI). Spectrophotometric readings confirmed the titer of the antisera to be as 1/5120 and their high precipitating capacity, as well. The antiserum dilution between 320 and 1280 times caused the bacterial suspension used in the assay to precipitate by 100%. IFI dilution which produced the highest serological reaction was 1/3200. The antisera produced formed precipitation ranges in 0.75% Noble agar-agar with pathogen strains of different origin and different tobacco growing areas which came from Souza Cruz Research & Development Center's collection in Brazil. The data obtained warrant the antisera for the development of both conventional and high resolution serological techniques for this bacterial diagnosis.*

Key words: *tobacco, Pseudomonas syringae pv tabaci, policlonal antisera*

INTRODUCCIÓN

El fuego salvaje, causada por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, es una enfermedad importante en el cultivo de tabaco que provoca pérdidas de consideración tanto en los semilleros como en el campo. La enfermedad, denominada también *fuego negro, fuego de campo, mancha angular de las hojas*, *quemado* y *moho*, está distribuida en casi todas las áreas de producción de tabaco del mundo [Shoemaker, 1990]. Cuba es probablemente el único país productor que no tiene registrado el patógeno debido posiblemente a la limitada introducción de semillas del exterior.

Las técnicas basadas en la reacción de antígenos-anticuerpos resultan una herramienta muy útil para el diagnóstico de numerosas bacterias fitopatógenas. Respecto a esta enfermedad, Allington (1945) obtuvo antisueros a partir de cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* de tabaco y soya para el estudio del patógeno. Además del tabaco, la enfermedad fuego salvaje ha sido informada en Brasil en la soya, el frijol, el pepino, el chícharo y recientemente la frutabomba [Allington, 1945; Ribeiro *et al*., 1979; Robbs *et al*., 1990, Tanaka *et al*., 1996; Beriam *et al*., 2002]. El re-

conocimiento serológico es uno de los métodos empleados para el diagnóstico.

Con el objetivo de obtener antisueros policlonales para la vigilancia fitosanitaria de la enfermedad, en Cuba se desarrolló el presente trabajo en el Laboratorio de Fitopatología en el Centro de Investigación y Desarrollo de Souza Cruz, Río de Janeiro, con el apoyo del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro, en Brasil.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron tres aislamientos de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* (13286, 6214 y 5886) de la colección del laboratorio, los que se sembraron en placas Petri con el medio de cultivo KB [King *et al.*, 1954] para comprobar su pureza. A las 48 horas se seleccionaron colonias con morfología típica y se transfirieron a tubos de ensayos con agar nutriente (AN). A las 24 horas de incubación el crecimiento bacteriano se recolectó del medio de cultivo con la solución PBS estéril (8,0 g NaCl, 0,2 g KH_2PO_4, 2,9 g Na_2HPO_4 12 H_20 para 1 L H_2O, pH 7,4), y se lavó tres veces mediante centrifugación a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4ºC. El pellet fue finalmente resuspendido en PBS.

Después del último lavado se ajustó la concentración de la suspensión bacteriana a 1,5 x 10^9 células/mL, según la escala espectrofotométrica de Mc. Farland. Los antígenos así obtenidos se distribuyeron en frascos estériles y se conservaron a 5ºC hasta ser administrados a los conejos, según el protocolo de inmunización.

Seis conejos de la raza New Zeland, de aproximadamente dos meses de edad y entre 2,5-3 kg de peso, fueron inmunizados con dosis crecientes de los antígenos anteriormente preparados, desde 0,2 hasta 3 mL. Las inmunizaciones fueron realizadas por vía intravenosa dos veces por semana durante 21 días, o sea, seis dosis en total. Cada cepa fue inoculada en dos animales. Seis días después de la última inyección se tomó una muestra de sangre para la titulación de los antisueros. El desangrado de los animales se llevó a cabo mediante punción cardíaca. La sangre obtenida de cada uno de los conejos por separado fue mantenida durante una hora a temperatura ambiente y luego centrifugada a 10 000 rpm durante cinco minutos. A los antisueros les fue añadida asida sódica para su preservación y se conservaron a 4ºC.

La titulación se llevó a cabo mediante precipitación en tubos. Diluciones seriadas de los antisueros, desde 1/10 hasta 1/5 120 fueron realizadas en PBS estéril para un volumen final de 1,0 mL. Posteriormente a cada tubo le fue añadida suspensión bacteriana de igual concentración a la que se utilizó para la inmunización. Los ensayos de inmunoprecipitación con cada cepa fueron seguidos con controles de suspensión bacteriana en PBS. Los tubos se incubaron a 37ºC por una noche. La evaluación de los resultados se realizó mediante observación visual y lectura turbidimétrica en el espectrofotómetro de Mc Farland, cuyos valores se utilizaron para el cálculo del porcentaje de inmunoprecipitación. Los antisueros producidos se enfrentaron a cepas de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*, mediante inmunodifusión en agar, según Ouchterlony (1949). En el Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal de Cuba, donde se depositaron los antisueros obtenidos, se realizó una titulación por inmunofluorescencia indirecta. Se emplearon células, muertas por calor, de las cepas 13286, 6214 y 5886, inactivas en Brasil.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los inmunosueros mostraron altos títulos y a simple vista se detectaron precipitaciones fuertes hasta la dilución 1/2 560 (*Tabla 1*).

Tabla 1. Precipitación en tubos de los antisueros obtenidos frente a sus antígenos homólogos

Ac/título	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1 280	1/2 560
13286-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
13286-2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
5886-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
5886-2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
6214-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
6214-2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++

+++ Precipitación fuerte ++ Precipitación mediana

La lectura espectofotométrica confirmó el alto título de los antisueros (1/5120) y su elevada capacidad precipitante. Diluciones de los antisueros entre trescientos y mil doscientas ochenta veces provocaron la precipitación de ciento por ciento de la suspensión bacteriana empleada en el ensayo (*Fig. 1*).

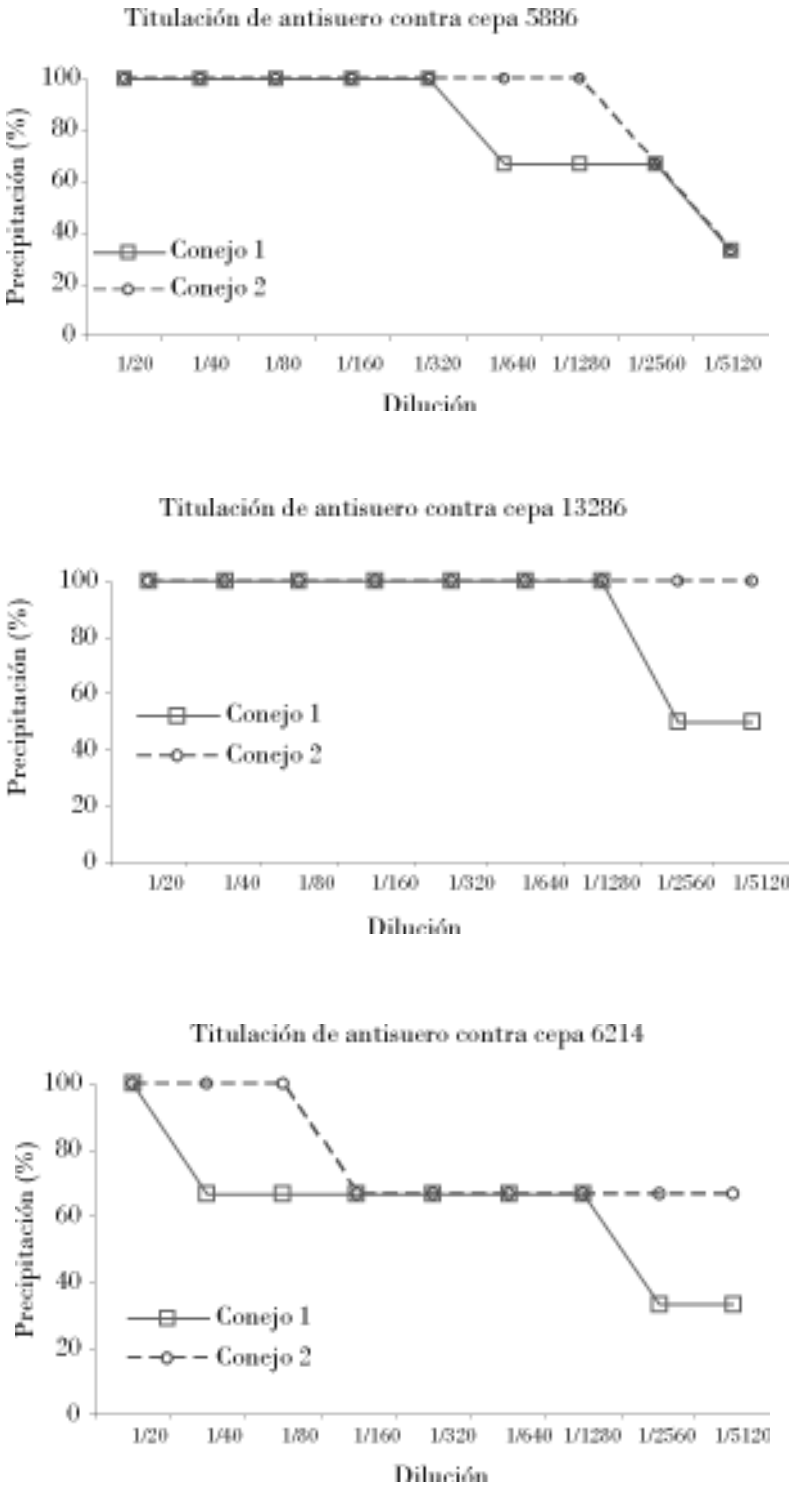

Figura 1. Porcentaje de precipitación de los sueros anti *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* con tres cepas del patógeno (5886, 6214, 13286).

Los antisueros producidos reaccionaron positivamente, y formaron bandas de precipitación en agar noble 0,75% a las 24 horas, con cepas del patógeno de diferente origen y años, tomados de la colección del laboratorio. El resultado señala la posibilidad de ser utilizados en la caracterización serológicas de aislamientos de la bacteria, así como para el desarrollo de técnicas serológicas para su diagnóstico.

La dilución más alta en la que se obtuvo reacción serológica por inmunofluorescencia indirecta (IFI) fue de 1/3200, y se definió como título de trabajo la dilución de 1/1600, totalmente aceptable para el desarrollo de la técnica. De haberse utilizado células vivas el título hubiese sido mucho más alto, ya que, aunque la técnica reconoce células muertas, la emisión de fluorescencia por ellas es menos fuerte.

Los títulos, tanto por IFI como por la precipitación en tubos, acreditan los antisueros para el desarrollo de técnicas serológicas de alta resolución, para un sistema de diagnóstico y de vigilancia fitosanitaria del fuego salvaje en el cultivo.

En 1945 Allington demostró por macroprecipitación que entre los aislamientos de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* de tabaco y soya existe una estrecha relación y respuesta positiva de identidad serológica. Por otra parte, Ribeiro *et al*. (1979) y Prestes *et al*. (1998) encontraron que el antisuero policlonal de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* reconoció los aislamientos del patógeno a partir del pepino, tabaco y frijol, con una identidad total entre las cepas independientemente del hospedante, y no fue observada reacción cruzada entre el antisuero y las cepas pertenecientes a los patovares *lachrymans* y *syringae*, resultado que confiere confianza a la prueba.

La identidad serológica entre las cepas de diferentes hospedantes [Ribeiro *et al*., 1979] permite detectar e identificar la bacteria en otras plantas hospedantes con el empleo de antisueros policlonales. Los obtenidos en este trabajo pueden ser utilizados en el Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal para el diagnóstico de la bacteria en las semillas de soya importadas de Brasil, y además para la vigilancia de la enfermedad en los otros cultivos hospedantes no registrados hasta el momento en Cuba, en conjunto con los laboratorios provinciales de sanidad vegetal.

CONCLUSIONES

- Los tres antisueros contra *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* obtenidos poseen altos títulos determinados por precipitación e inmunofluorescencia indirecta, por lo que se recomienda su empleo para el diagnóstico de la bacteria mediante técnicas serológicas rutinarias y de alta sensibilidad.

REFERENCIAS

Allington, W. B.: «Wildfire Disease of Soybean», *Phytopathology* 35 (11):857-869, 1945.

Beriam, L. O. S.; I. M. G. Almeida; J. T. Ferrari; E. Grabert; A. F. Barbosa; I. Barbosa; I. M. Loureizo: «Bacteriose em mamoeiro (*Carica papaya* L.) causada por patovar de *Pseudomonas syringae* strain», *Summa Phytopathologica* 28(1):95, 2002.

Ouchterlony, O.: «Antigen-antibody Reaction in Gel», *Acta Pathol. Microbiol. Scand*. 26:507, 1949.

Prestes, E. B.; I. M. G. Almeida; L. O. S. Beriam; V. A. Malavolta Jr.; T. Yano: «Variabilidad entre isolados de *Pseudomonas* patogenicos ao pepino», *Summa Phytopathologica* 24(3/4):210-215, 1998.

Ribeiro, R. de L. D.; D. J. Hagedorn; R. D. Durbin; T. F. Uchytil: «Characterization of the Bacterium Inciting Bean Wildfire in Brasil», *Phytopathology* 69(3):208-212, 1979.

Robbs, C. F.; J. R. Neto; L. O. S. Beriam; V. A. Malavolta Jr.: «Ocorrencia de *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* em cultura de pepino em Sao Paulo», *Fitopatologia Brasileira* 15(2):126, 1990.

Shoemaker, P. B.: «Foliar Diseases Caused by Bactéria», *Compendium of Tobacco Diseases*, APS Press, The American Phytopathology Society, 1990.

Tanaka, M. A. de S.; M. F. Ito; C. Dudienas; N. J. RodrÍguez; M. H. Sugimori: «*Pseudomonas syringae* pv *tabaci* em *Phaseolus vulgaris* (feijão vagem), *Desmodium canum e Ipomea* spp. na região de Itatiba», *Summa Phytopatologica* 22(3/4):248-251, 1996.