

SEBASTIAN BRZozowski

Pracownia Hodowli Odpornościowej, Zakład Fitopatologii
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie

Reakcje krzyżowe przeciwciał poliklonalnych w teście immunofluorescencji pośredniej (IFAS) stosowanym do wykrywania *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Cross-reactions of polyclonal antibodies in the immuno-fluorescence antibody staining (IFAS) test used for detecting *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Wyzolowano z bulw ziemniaka porażonych przez bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) i wykazujących objawy choroby 19 izolatów bakterii, które dały reakcję krzyżową w teście IFAS z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych przeciwko Cms. Stwierdzono, że komórki bakterii siedmiu izolatów są morfologicznie zbliżone do Cms. Fakt ten wskazuje na możliwość fałszywie pozytywnej oceny w badaniach rutynowych, przy zastosowaniu przeciwciał poliklonalnych. Analiza 19 izolatów przy zastosowaniu testów biochemicznych i fizjologicznych pozwoliła na odróżnienie ich od Cms. Wykonano test patogeniczności z użyciem inokulum sporządzonego z czystych kultur bakterii dających reakcję krzyżową w teście IFAS. Żaden z izolatów nie wywołał typowych dla Cms objawów chorobowych na roślinach bakłazana.

Słowa kluczowe: bakterioza pierścieniowa ziemniaka, metody

Nineteen isolates of bacteria were detected in potato tubers infected with *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms). Cross-reactions of the isolates with polyclonal antibodies applied in the IFAS test were observed. Seven isolates were morphologically similar to Cms. The occurrence of cross-reactions can lead to obtaining false positive readings in the routine tests. Biochemical and physiological methods used to analyze the 19 cross-reacting isolates made possible to distinguish them from Cms strains. A biological assay on eggplant with the use of inoculum containing pure bacteria cultures was also performed. None of the cross-reacting isolates was found pathogenic to this plant.

Key words: bacterial ring rot of potato, methods

WSTĘP

Bakterioza pierścieniowa ziemniaka wywoływana przez Cms jest jedną z groźniejszych chorób kwarantannowych ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.). Ze względu na systemiczny charakter infekcji oraz możliwość wystąpienia bezobjawowej (latentnej) postaci choroby,

jej wykrywanie przysparza wiele trudności. Obecnie w badaniach rutynowych prób ziemniaków wykonywanych przez Państwową Inspekcję Ochrony Roślin i Nasiennictwa wykorzystywany jest między innymi test immunofluorescencji pośredniej (IFAS), test biologiczny na roślinach bakłażana oraz test oparty na reakcji hybrydyzacji *in situ* połączonej z fluorescencją (FISH). Procedura wykrywania przy pomocy testu IFAS obejmuje stosowanie zarówno przeciwciał poli-, jak i monoklonalnych (Dyrektywa 93/98/EEC; Dyrektywa EEC 2006/56/WE; Janse i Van Vaerenbergh, 1987; Rozporządzenie MRiRW z dnia 13 kwietnia 2004).

Metody serologiczne są obecnie szeroko stosowane w diagnostyce fitopatologicznej (Alvarez, 2004). Obok wielu zalet posiadają również i kilka wad. Jedną z ważniejszych przy stosowaniu przeciwciał poliklonalnych jest możliwość występowania reakcji krzyżowych. Również dla przeciwciał stosowanych do wykrywania Cms zaobserwowano reakcje krzyżowe z innymi bakteriami (De Boer i Copeman; 1980; Calzolari i in., 1982; Crowley i De Boer, 1982; De Boer, 1982). Nieswoiste reakcje serologiczne można wyeliminować stosując przeciwciała monoklonalne, co jednak znacznie zwiększa koszty badania (De Boer i Wiczorek, 1984; Halk i De Boer, 1985).

Celem pracy było zbadanie występowania bakterii nienależących do podgatunku Cms, a reagujących z przeciwciałami poliklonalnymi w teście IFAS stosowanym do wykrywania sprawcy bakteriozy pierścieniowej.

MATERIAŁ I METODY

Izolacja szczepów bakterii z ekstraktów z tkanki bulw ziemniaka

Materiałem do badań było 25 ekstraktów z bulw ziemniaka porażonych Cms. Z bulw wykazujących charakterystyczne objawy bakteriozy pierścieniowej, w których potwierdzono obecność bakterii Cms, pobierano zmacerowaną tkankę i przygotowywano ekstrakty w 1ml buforu fosforanowego PB 0,01 M, pH 7,2. Ekstrakty rozcieńczano dziesięcio-, stu- i tysiąckrotnie po czym wykonywano ich posiew powierzchniowy na półselektywną pożywkę MNTA (Jansing i Rudolph 1998) — po 50µl każdego ekstraktu i ich rozcieńczeń. Szalki inkubowano w ciemności, w stałej temperaturze 22°C. Po kilku dniach (n = 5-7) pasażowano pojedyncze kolonie (przypominające wyglądem kolonie tworzone przez Cms) na agar peptonowo-glukozowo-drożdżowy (Rozporządzenie MRiRW z dnia 13 kwietnia 2004) w celu uzyskania czystych kultur bakterii. Otrzymano w ten sposób 365 izolatów.

Test immunofluorescencji pośredniej

Wykonano po 1 ml zawiesiny wszystkich otrzymanych izolatów bakterii w buforze fosforanowym PB 0,01 M, pH 7,2. Przygotowane w ten sposób zawiesiny bakteryjne rozcieńczano dziesięcio- i stukrotnie w buforze PB 0,01 M, pH 7,2. Zarówno ekstrakty, jak i rozcieńczenia nanoszono na szkiełka wielopunktowe w ilości 20µl na okienko, suszono na płycie grzejnej w temperaturze około 40°C i utrwalano 95% alkoholem etylowym. Preparaty immunofluorescencyjne wykonano przy zastosowaniu poliklonalnych przeciwciał kozich (anty-Cms) i koniugatu króliczego znakowanego indokarbocyaniną (Cy3) z firmy Loeve. Preparaty pokryte przeciwciałami inkubowano przez 30 min.

w wilgotnej, ciemnej komorze. Następnie przeprowadzano dwukrotne płukanie w buforze PBS 0,01 M, pH 7,2 i suszenie. W ostatnim etapie na szkiełka podstawowe nanoszono 0,1 M roztwór PB z glicerolem, pH 7,6 i przykrywano je szkiełkami nakrywkowymi. Preparaty obserwowano w mikroskopie epifluorescencyjnym Nikon Eclipse E600, przy powiększeniu 1000 razy.

W przypadku uzyskania pozytywnego wyniku testu IFAS z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych, wykonywano dla danego izolatu test IFAS z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych. W tym celu zastosowano monoklonalne przeciwciała mysie (anty-cms) oraz koniugat znakowany izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) produkcji Agdia. Procedura przygotowania preparatów była podobna jak dla przeciwciał poliklonalnych, różniła się jedynie warunkami inkubacji preparatów z przeciwciałami. Dla przeciwciał monoklonalnych zastosowano inkubację przez 1 h w wilgotnej, ciemnej komorze w temperaturze 37°C.

Testy biochemiczne i fizjologiczne

Dla izolatów, które dały pozytywną reakcję w teście IFAS z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych przeprowadzono szereg testów biochemicznych i fizjologicznych (tab. 1). W trakcie wykonywania testów biochemicznych zastosowano bakterie Cms (szcep 25.2) jako czynnik kontrolny. Wszystkie testy wykonano według metodyki opisanej w załączniku nr 1 do Rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 13 kwietnia 2004 „W sprawie szczegółowych sposobów postępowania przy zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzeniania się bakterii Cms”.

Tabela 1

Wykaz testów biochemicznych i fizjologicznych wykorzystywanych do identyfikacji Cms
Biochemical and physiological tests used for identification of Cms

| Test: | Wynik charakterystyczny dla Cms Result characteristic of Cms |
|--|---|
| Oksydacyjno/fermentacyjny (O/F) — Oxidation/fermentation (O/F) | obojętna lub słabo utleniająca neutral or weak oxidation |
| Aktywność oksydazy — Oxidase activity | - |
| Aktywność katalazy — Catalase activity | + |
| Redukcja azotanów — Nitrates reduction | - |
| Aktywność ureazy — Urease activity | - |
| Produkcja H ₂ S — H ₂ S production | - |
| Produkcja indolu — Indole production | - |
| Wykorzystanie cytrynianu jako źródła węgla — Citrate as a source of carbon | - |
| Hydroliza skrobi — Starch hydrolysis | lub słaba — or weak |
| Wzrost w temperaturze 37°C — growth at 37°C | - |
| Wzrost w obecności 7% NaCl — growth at 7% NaCl | - |
| Hydroliza żelatyny — Gelatin hydrolysis | - |
| Hydroliza eskuliny — Esculin hydrolysis | + |
| Produkcja kwasu z: Acid produced from: | lub słaba — or weak |
| glicerolu — glycerol | - |
| laktozy — lactose | - |
| ramnozy — rhamnose | - |
| salicyny — salicin | - |

Biologiczny test patogeniczności na oberżynie

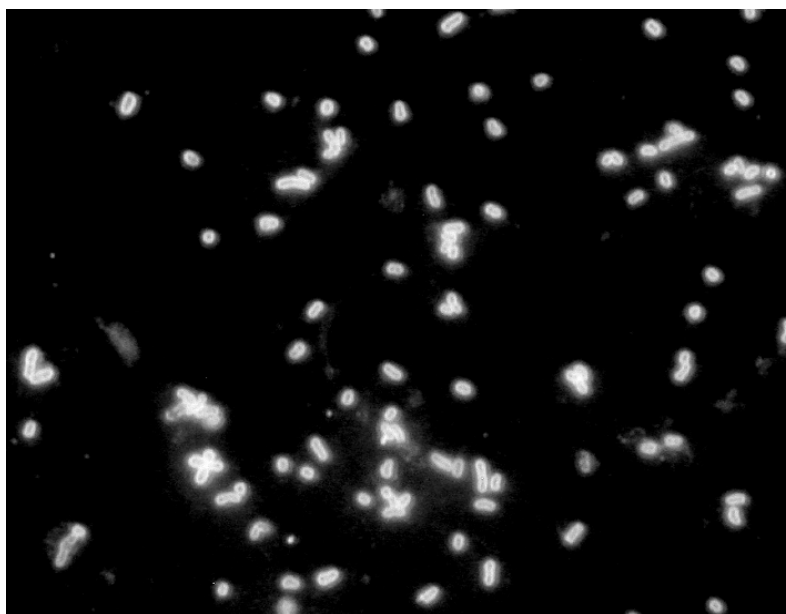
W celu określenia patogeniczności szczepów bakterii dających reakcję krzyżową w teście IFAS, wykonano szereg testów biologicznych na roślinach bakłażana (*Solanum melongena*). Z czystych kultur bakterii sporządzono inokulum, które posłużyło do zakażenia roślin testowych.

W celu przeprowadzenia testów patogeniczności wykonano następujące czynności:

- W sterylnych warunkach przygotowano po 1 ml zawiesiny każdego izolatu bakterii w sterylnej redestylowanej wodzie.
- W spektrofotometrze BioPhotometr wykonano pomiar gęstości optycznej (OD) przy długości fali $\lambda = 600$ nm, przygotowanych wcześniej zawiesin bakteryjnych.
- Wykonano rozcieńczenia zawiesin, do gęstości optycznej 0,1 aby uzyskać stężenie bakterii około 10^8 jtk/ml (jtk- jednostki tworzące kolonie)
- Dla każdej próby zastosowano po 6 roślin testowych.
- Inokulowane rośliny inkubowano w szklarni i od 5. dnia testu oceniano występowanie symptomów porażenia.

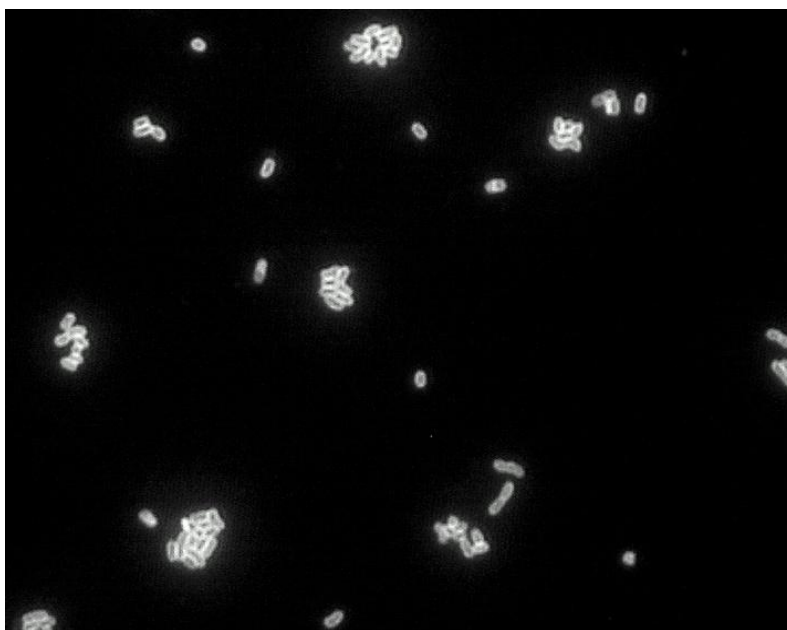
WYNIKI

Na podstawie obserwacji mikroskopowych preparatów IFAS wykonanych z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych stwierdzono pozytywną reakcję dla 19 izolatów bakterii spośród 365 badanych.



Rys. 1. Mikroskopowy obraz bakterii Cms uzyskany w teście IFAS z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych (powiększenie 1000x)

Fig. 1. Microscopic image of Cms obtained in the IFAS test using polyclonal antibodies (magnification 1000x)



Rys. 2. Mikroskopowy obraz reakcji krzyżowej izolatu bakterii 142.5 uzyskany w teście IFAS z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych (powiększenie 1000x)
Fig. 2. Microscopic image of cross-reacting bacterial isolate 142.5 obtained in the IFAS test using polyclonal antibodies (magnification 1000x)

Stwierdzono, że komórki bakterii 7 izolatów są morfologicznie (kształtem i wielkością) zbliżone do bakterii Cms. Test IFAS wykonany z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych dla wszystkich 19 izolatów dał negatywny wynik.

Na szczególną uwagę zasługuje izolat oznaczony numerem 142.5 (rys. 2), w przypadku którego kształt i wielkość bakterii są bardzo podobne do Cms. Fakt ten wskazuje na możliwość fałszywie pozytywnej oceny w badaniach rutynowych, przy zastosowaniu przeciwciał poliklonalnych.

Charakterystyka pozwoliła na wyróżnienie 17 profili dla 19 izolatów bakterii za pomocą testów biochemicznych i fizjologicznych. Stwierdzono również, iż żaden z 19 izolatów bakterii nie należy do podgatunku Cms, ponieważ izolaty wykazały inny szereg reakcji zaobserwowanych na pożywkach w porównaniu do szczepu kontrolnego Cms, 25.2 (tab. 2).

Żaden z badanych izolatów bakterii dających reakcję krzyżową nie wywołał typowych dla Cms objawów chorobowych na roślinach oberżyny w teście biologicznym.

Tabela 2

Właściwości biochemiczne i fizjologiczne izolatów bakterii dających reakcję krzyżową w teście IFAS z przeciwciałami poliklonalnymi
Biochemical and physiological properties of the bacteria cross-reacting with polyclonal antibodies in the IFAS test

| Izolat Isolate | Testy biochemiczne i fizjologiczne Biochemical and physiological tests | | | | | | | | | | | | | Produkcja kwasu z: Acid produced from | |
|-------------------|---|---|----|-----|----|---|----|-----|------|----|---|----|-----------|--|--|
| | O/F | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X | XI | glicerolu | ramnozy | |
| | | | | | | | | | | | | | glycerol | rhamnose | |
| Gracja 3.5 | F | + | + | - | + | - | - | ++ | - | - | - | + | n.b. | + | |
| 2390.2 | F | + | + | + | + | - | + | +++ | - | + | + | + | + | - | |
| 91.4 | F | + | + | + | + | - | - | + | - | + | - | + | + | + | |
| K4.5 | F | - | - | - | - | - | - | ++ | - | - | - | + | n.b. | + | |
| K4.6 | F | - | - | - | - | - | - | ++ | - | - | - | + | + | + | |
| 18.R | F | - | + | + | + | - | + | - | - | + | - | - | + | - | |
| 16838.4 | F | - | + | - | + | - | - | ++ | - | - | + | + | + | + | |
| 2861.5 | F | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | - | n.b. | |
| 2759.4 | F | - | + | + | + | - | + | - | - | - | - | + | + | + | |
| 2/Rz.2 | F | - | + | + | - | - | + | - | - | + | - | - | + | - | |
| 2/Rz.3 | F | - | + | + | + | - | + | - | - | + | - | - | n.b. | - | |
| 4/Rz.3 | F | + | + | + | + | - | + | - | - | - | - | - | n.b. | + | |
| 142.4 | F | - | + | - | + | - | - | + | - | - | - | + | + | - | |
| 142.5 | O/O | - | + | + | - | - | + | + | - | - | + | - | n.b. | - | |
| 6518.8 | F | + | + | - | - | - | - | ++ | - | - | - | + | n.b. | n.b. | |
| 6518.11 | F | + | + | - | + | - | - | +++ | - | - | - | + | + | - | |
| 3667.2 | O/O | + | + | + | + | - | + | - | - | + | - | - | n.b. | + | |
| 3667.3 | F | + | + | + | - | - | + | - | - | - | - | - | n.b. | - | |
| 3091.9 | F | - | - | - | - | - | - | ++ | - | - | - | + | n.b. | n.b. | |
| Cms-25.2 | O | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | |

n.b. — Nie badano — Not tested

I — Aktywność oksydazy — Oxidase activity

II — Aktywność katalazy — Catalase activity

III — Aktywność ureazy — Urease activity

IV — Produkcja H₂S — H₂S production

V — Produkcja indolu — Indole production

VI — Wykorzystanie cytrynianu jako źródła węgla — Citrate as a source of carbon

VII — Hydroliza skrobi — Starch hydrolysis

VIII — Wzrost w 37°C — Growth at 37°C

IX — Tolerancja na 7% NaCl — Growth at 7% NaCl

X — Hydroliza żelatyny — Gelatin hydrolysis

XI — Hydroliza eskuliny — Esculin hydrolysis

DYSKUSJA

Występowanie reakcji krzyżowych przeciwciał poliklonalnych z bakteriami innymi niż Cms obserwowano w preparatach mikroskopowych wykonanych techniką IFAS, z ekstraktów tkankowych przygotowanych z fragmentów przystolonowych bulw ziemniaka (De Boer i Copeman 1974, 1980; Crowley i De Boer 1982; Miller 1984). Calzolari i inni (1982) zaobserwowali reakcje krzyżowe poliklonalnych przeciwciał anti-Cms z saprofitycznymi maczugowcami (*Coryneform*) z gatunku *Arthrobacter polychromogenes*.

Rozcieńczanie przeciwciał może zmniejszać ilość reakcji krzyżowych, ale jednocześnie może prowadzić do uzyskiwania fałszywie negatywnych wyników dla prób porażonych przez Cms (De Boer i Copeman, 1980). Rutynowo stosowane procedury wykrywania i identyfikacji Cms obejmują wykonanie kilku rozcieńczeń ekstraktów z tkanki ziemniaka w celu uniknięcia fałszywie negatywnych wyników badania przy wysokim rozcieńczeniu przeciwciał (Dyrektywa 93/98/EEC).

W przeprowadzonych doświadczeniach zaobserwowano reakcję krzyżową przeciwciał poliklonalnych przy relatywnie dużym rozcieńczeniu przeciwciał, a także dla zawiesin bakterii o różnym stężeniu. Reakcje krzyżowe obserwowano przy rozcieńczeniu przeciwciał anty-Cms, rzędu 10 000x. Takie rozcieńczenie jest rekomendowane przez producenta jako najodpowiedniejsze. Reakcje krzyżowe mogą być czasami rozpoznawane przez dokładną obserwację kształtu, wielkości i wzajemnego ułożenia fluoryzujących komórek bakterii. Niestety saprofityczne bakterie maczugowe, które najczęściej dają reakcję krzyżową są nie tylko podobne do Cms pod względem serologicznym, ale mają także podobny kształt i wielkość. Potwierdziły to obserwacje mikroskopowe preparatów mikroskopowych IFAS wykonanych dla szczepu 142.5.

Innym sposobem na wyeliminowanie fałszywie pozytywnych wyników testu IFAS jest zastosowanie przeciwciał monoklonalnych (De Boer i Wieczorek, 1984). Nie obserwowano dotychczas reakcji krzyżowych dla tego rodzaju przeciwciał, co wynika ze sposobu ich produkcji, a co za tym idzie wysokiej specyficzności.

Na podstawie przedstawionych w niniejszej pracy wyników szeregu biochemicznego dla 19 badanych izolatów bakterii można stwierdzić, iż należą one do 17 różnych grup taksonomicznych. Podkreślić należy, zatem fakt, że przeciwciała poliklonalne użyte w niniejszej pracy charakteryzują się niską specyficznością, co objawia się występowaniem reakcji krzyżowych. Należy, zatem stosować przeciwciała monoklonalne, które charakteryzują się wyższą specyficznością (De Boer i McNaughton, 1986; Kokoskova i Pankova, 1998; Pankova i Kokoskova, 2002). Ze względów technicznych nie możliwe jest wytworzenie poliklonalnych przeciwciał anty-Cms o wyższej specyficzności, co pozwoliłoby wyeliminować reakcje krzyżowe (De Boer i in., 1988; Gudmestad i in., 1991).

Występowanie reakcji krzyżowych może również wpływać na fałszywie pozytywną ocenę badanych prób ziemniaka. Nawet doświadczony mikrobiolog nie jest w stanie jednoznacznie odróżnić na podstawie kształtu i wielkości komórek bakterii Cms od niektórych innych bakterii dających reakcję krzyżową. Dlatego też rutynowe badania bulw ziemniaka pod kątem obecności tego patogena obejmują kilka metod, które stosowane jednocześnie pozwalają na uzyskanie wiarygodnych wyników.

WNIOSKI

1. Bakterie dające reakcję krzyżową w teście IFAS z zastosowaniem przeciwciał poliklonalnych mogą wpływać na ocenę badanego materiału pod kątem obecności Cms.
2. Konieczne jest stosowanie jednocześnie różnych metod wykrywania i identyfikacji Cms, zarówno technik serologicznych, molekularnych oraz testów biologicznych, co

pozwoli zweryfikować zarówno fałszywie pozytywne, jak i fałszywie negatywne wyniki.

LITERATURA

- Alvarez A. M. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 339 — 366.
- Anonim. 1990. Quarantine procedure. *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. Inspection and test methods. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 20: 235 — 254.
- Calzolari A., Bazzi C., Mazzucchi U. 1982. Cross- reactions between *Corynebacterium sepedonicum* and *Arthrobacter polychromogens* in immunofluorescence staining. *Potato Res.* 25: 239 — 246.
- Crowley C.F., De Boer S.H. 1982. Nonpathogenic bacteria associated with potato stems cross-react with *Corynebacterium sepedonicum* antisera in immunofluorescence. *Am. Potato J.* 59: 1 — 8.
- De Boer S. H., Copeman R.J. 1974. Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. *Can. J. Plant Sci.* 54: 115 — 122.
- De Boer S. H., Copeman R.J. 1980. Bacterial ring rot testing with the indirect fluorescent antibody staining procedure. *Am. Potato J.* 57: 457 — 466.
- De Boer S. H., McNaughton M. E. 1986. Evaluation of immunofluorescence with monoclonal antibodies for detecting latent bacterial ring rot infections. *Am. Potato J.* 63: 533 — 542.
- De Boer S.H. 1982. Cross-Reaction of *Corynebacterium sepedonicum* antisera with *C. insidiosum*, *C. michiganense*, and an unidentified *Coryneform* bacterium. *Phytopathol.* 72: 1474 — 1478.
- De Boer S.H., Wieczorek A. 1984. Production of monoclonal antibodies to *Corynebacterium sepedonicum*. *Phytopathology* 74 (12): 1431 — 1434.
- De Boer S.H., Wieczorek A., Kummer A. 1988. An ELISA test for bacterial ring rot of potato with a new monoclonal antibody. *Plant Dis.* 72: 874 — 878.
- Dyrektywa EEC Nr 93/85. *Official Journal L* 259.18.10.1993.
- Dyrektywa EEC Nr 2006/56/WE. *Official Journal L* 182/1. 4.07.2006.
- Gudmenstad N. C., Baer D., Kurowski C. J. 1991. Validating immunoassay test performance in the detection of *Corynebacterium sepedonicum* during the growing season. *Phytopathol.* 81: 475 — 480.
- Halk E. L., De Boer S. H. 1985. Monoclonal antibodies in plant-disease research. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23: 321 — 350.
- Janse J. D., Van Vaerenbergh J. 1987. Interpretation of the EC method for the detection of latent *Corynebacterium sepedonicum* infections in potato. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 17: 1 — 10.
- Jansing H., Rudolph K. 1998. Physiological capabilities of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and development of a semi-selective medium. *Z. PflKrankh. PflSch.* 105(6): 590 — 601
- Kokoskova B., Pankova I. 1998. Sensitivity and specificity of polyclonal antisera for determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and their use by the slide agglutination method. *Plant Prot. Sci.* 34: 121 — 125.
- Miller H. J. 1984. Cross- reactions of *Corynebacterium sepedonicum* antisera with soil bacteria associated with potato tubers. *Neth. J. Plant Pathol.* 90: 23 — 28.
- Pankova I., Kokoskova B. 2002. Sensitivity and Specificity of Monoclonal Antibody Mn-Cs1 for Detection and Determination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, the Causal Agent of Bacterial Ring Rot of Potato. *Plant Protection Science* 38 (4): 117 — 124.
- Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 13 kwietnia 2004. W sprawie szczegółowych sposobów postępowania przy zwalczaniu i zapobieganiu rozprzestrzenianiu się bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Dziennik Ustaw* Nr 75, poz. 709.