

Diagnostyka **Diagnostics**

Test immunofluorescencji pośredniej dla bakterii patogenicznych dla roślin

Zakres

Standard ten opisuje w jaki sposób wykonać test immunofluorescencji pośredniej (IF) dla bakterii patogenicznych dla roślin¹.

Zatwierdzenie i nowelizacja

Zatwierdzono jako Standard EPPO 2009-09.

W Załączniku 1 zawarto instrukcję wykonania testu IF. Do wykonania testu należy użyć zwalidowanych przeciwciał lub surowicy przeciw poszukiwanemu organizmowi. Laboratorium zobowiązane jest do wykonania walidacji w przypadku gdy dane dotyczące walidacji nie zostały dostarczone przez dostawcę odczynnika. Miano surowicy/przeciwciał należy określić dla każdej partii odczynnika. Zgodnie z zaleceniami producenta miano określa się jako najwyższe rozcieńczenie przy którym występuje optymalna reakcja podczas badania zawiesiny szczepu referencyjnego poszukiwanego organizmu zawierającej 10^5 – 10^6 komórek bakterii na mililitr przy użyciu odpowiedniego rozcieńczenia koniugatu znakowanego barwnikiem fluorescencyjnym (np. fluoresceiną lub rodaminą). Zalecany szczep referencyjny powinien być homologiczny ze szczepem wykorzystanym do produkcji surowicy/przeciwciał. Nie rozcieńczone surowice poliklonalne powinny, jeśli to jest możliwe, mieć minimalne miano o wartości 2000. Do testów rutynowych należy używać rozcieńczeń roboczych surowicy/przeciwciał (RR), które osiągają wartość bliską lub równą wartości miana.

W celu wykrycia poszukiwanego organizmu należy zastosować test IF na świeżo przygotowanym ekstrakcie próbki. W celu dokonania identyfikacji bakterii test IF należy przeprowadzić na zawieszynie wyizolowanej czystej kultury. W razie konieczności test IF można w zadawalający sposób wykonać na ekstrakcie z dodatkiem glicerolu (10–25% obj./obj.) przechowywanym w temperaturze poniżej -68 °C. Glicerol można usunąć z ekstraktu poprzez dodanie i wymieszanie z taką samą ilością buforu do zawieszania osadu w stosunku do ilości ekstraktu (Załącznik 2), a następnie odwirowanie przez 15 minut z przyspieszeniem 7000 g i zawieszenie osadu w takiej samej ilości buforu do zawieszania osadu jaką stanowił początkowo uzyskany ekstrakt.

Szkiełka mikroskopowe zawierające kontrole należy przygotować oddzielnie, zgodnie z Załącznikiem 3. Kontrolę surowicy/przeciwciał (= kontrola pozytywna) należy przygotować z wykorzystaniem izolatu homologicznego lub innego izolatu referencyjnego poszukiwanego organizmu zawieszzonego w ekstrakcie próbki, która wcześniej została uznana za wolną od poszukiwanego organizmu. Opcjonalnie można przygotować zgodnie z Załącznikiem 3 zawiesinę komórek w buforze do zawieszania osadu. W tym celu należy

¹ Użycie w tym standardzie EPPO nazw firm produkujących odczynniki lub wyposażenie nie sugeruje wyłączności ich zastosowania, gdyż inne odczynniki również mogą zostać zastosowane.

użyć zamrożone lub zliofilizowane ekstrakty skontaminowane wybranym izolatem.

Jeśli to jest możliwe należy użyć na tym samym szkiełku mikroskopowym jako dodatkową kontrolę pozytywną zliofilizowany lub zamrożony w temperaturze -16°C ekstrakt pochodzący z naturalnie zainfekowanej tkanki. Pozwoli to na obserwację w ekstrakcie porażonym w sposób naturalny morfologii komórek bakterii, która może różnić się znacznie od morfologii komórek pochodzących z podłoża hodowlanego, które zostały wykorzystane do sztucznej kontaminacji.

Zawiesinę ekstraktu próbki, w której nie stwierdzono obecności poszukiwanego organizmu należy użyć jako kontroli dla testu IF (= kontrola negatywna) (Załącznik 3).

Test IF można zastosować także w celu dokonania identyfikacji czystych kultur podejrzanych izolatów bakterii. W tym celu należy przygotować i użyć zawiesinę bakterii o gęstości 10^6 komórek na mililitr buforu do testu IF (Załącznik 2).

Podziękowanie

Opis testu IF został opracowany przez P. Muller (JKI, DE), J. Janse (Dutch General Inspection Service, NL) na podstawie Dyrektywy Rady UE dotyczącej zwalczania *Ralstonia solanacearum* (UE, 1998) oraz Dyrektywy Komisji 2006/63/WE z 14 lipca 2006 zmieniającej Załączniki II do VII do Dyrektywy Rady 98/57/WE dotyczącej zwalczania *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.; Dziennik Urzędowy Wspólnoty Europejskiej (UE, 2006).

Materiały źródłowe

UE (1998) Dyrektywa Rady 98/57/WE z 20 lipca 1998 dotycząca zwalczania *Ralstonia solanacearum* Załącznik II – schemat badania diagnostycznego, wykrywania oraz identyfikacji *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.; Dziennik Urzędowy Wspólnoty Europejskiej nr L235, 8-39.

UE (2006) Dyrektywa Komisji 2006/63/WE z 14 lipca 2006 zmieniająca Załączniki II do VII do Dyrektywy Rady 98/57/WE dotyczącej zwalczania *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.; Dziennik Urzędowy Wspólnoty Europejskiej nr L206, 36-106.

Załącznik 1 – Instrukcja wykonania testu IF

Do testów IF należy użyć wielopunktowych szkiełek mikroskopowych najlepiej z 10 okienkami o średnicy co najmniej 6 mm.

Materiał kontrolny należy traktować w taki sam sposób jak próbkę (próbki).

1. Przygotowanie szkiełek

Przygotować szkiełka testowe według jednej z następujących procedur.

1.1 Dla ekstraktów roślinnych uzyskanych z próbek zawierających stosunkowo małą ilość osadu skrobi/ zanieczyszczeń:

Za pomocą pipety nanieść standardową objętość (objętość 15 μl jest odpowiednia dla szkiełka o średnicy okienka 6 mm – należy zwiększyć objętość dla szkiełek o większej średnicy okienek) rozcieńczenia ekstraktu próbki w stosunku 1:100 na pierwsze okienko szkiełka do IF. Następnie na pozostałe okienka w tym samym rzędzie nanieść za pomocą pipety taką samą objętość nie rozcieńczonego ekstraktu próbki (1:1). Drugi rząd może zostać wykorzystany dla powtórzenia próbki lub dla innej próbki² jak to przedstawiono na rys. 1A.

² Należy zwrócić uwagę aby nie doszło do kontaminacji próbek

1.2 Dla innych ekstraktów próbek:

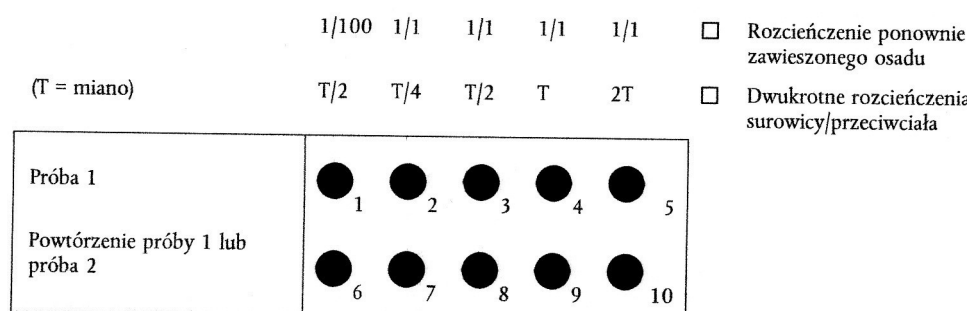
Należy przygotować dziesięciokrotne rozcieńczenia (1:10, 1:100) ekstraktu roślinnego w buforze do zawieszania osadu. Za pomocą pipety nanieść standardową objętość (objętość 15 µl jest odpowiednia dla szkiełka o średnicy okienka 6 mm – należy zwiększyć objętość dla szkiełek o większej średnicy okienek) ekstraktu próbki oraz każdego z rozcieńczeń na poszczególne okienka w rzędzie szkiełka mikroskopowego. Drugi rząd może zostać wykorzystany dla powtórzenia próbki lub dla innej próbki jak to przedstawiono na rys. 1B.

2. Utrwalanie komórek bakterii

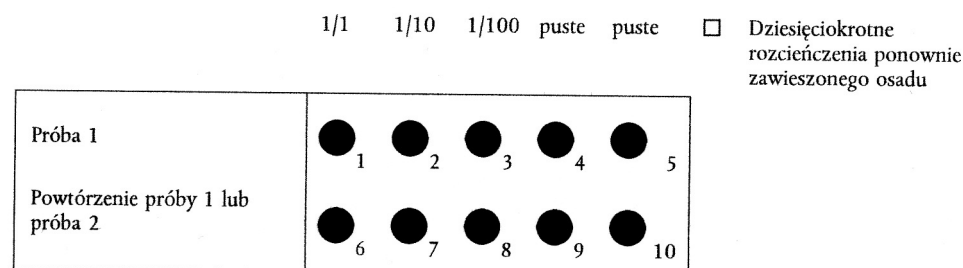
Wysuszyć krople w temperaturze otoczenia lub poprzez ogrzewanie (temperatura maksymalna 45 °C). Utrwalić komórki bakterii na szkiełku przez opalenie szkiełek albo ogrzewanie preparatów (15 minut w temperaturze maksimum 60 °C) lub przez pokrycie okienek szkiełka etanolem (>95%) przez 3 minuty lub zgodnie ze szczegółową instrukcją dołączoną przez dostawcę przeciwciał.

Szkiełka należy poddać dalszemu badaniu tak szybko jak to możliwe lub jeśli to konieczne utrwalone szkiełka można przechowywać w suchym pojemniku w stanie zamrożonym (maksymalnie do 3 miesięcy) przed dalszym badaniem.

A



B



Rys. 1 (A) Rozcieńczenia ekstraktu próbki, naniesione na szkiełko testowe zgodnie z punktem 1.1 i 3.1. (B) Rozcieńczenie robocze surowicy/przeciwciał naniesione na szkiełko testowe zgodnie z punktem 1.2 i 3.2.

3. Procedura IF

3.1 W zależności od sposobu przygotowania szkiełek testowych – punkt 1.1

Przygotować zestaw dwukrotnych rozcieńczeń przeciwciał w buforze do testu IF (Załącznik 2). Pierwsze rozcieńczenie powinno mieć wartość 1/2 miana (T/2), a pozostałe odpowiednio: 1/4 miana (T/4), 1/2 miana (T/2), miano (T) i podwójna wartość miana (2T) (T=miano).

- 3.2 Przygotowanie szkiełek testowych zgodnie z punktem 1.2:
Przygotować rozcieńczenie robocze (RR) przeciwciał (bliskie lub równe mianu) w buforze do IF (Załącznik 2).
- 3.3 Umieścić szkiełka na wilgotnej bibule. Pokryć całkowicie wszystkie okienka szkiełka testowego rozcieńczonymi przeciwciałami. Objętość przeciwciał naniesiona na każde z okienek szkiełka powinna odpowiadać co najmniej objętości naniesionego ekstraktu.
Etap ten należy przeprowadzić w przypadku braku szczegółowej instrukcji od dostawcy przeciwciał.
- 3.4 Inkubować szkiełka na wilgotnej bibule pod przykryciem przez 30 minut (± 10 min) w temperaturze otoczenia ($18 - 25^{\circ}\text{C}$).
- 3.5 Strzepnąć krople z każdego szkiełka i płukać ostrożnie w buforze do IF. Płukać szkiełka poprzez zanurzenie przez około 5 minut w buforze do IF z dodatkiem Tween (Załącznik 2), a następnie w buforze do IF bez dodatku Tween. Unikać powstawania aerozolu lub przeniesienia kropli, co może spowodować kontaminację. Usunąć delikatnie nadmiar wilgoci za pomocą bibuły.
- 3.6 Umieścić szkiełka na wilgotnej bibule. Przykryć okienka szkiełka rozcieńczonym koniugatem FITC wykorzystywanym do określenia miana. Objętość koniugatu naniesiona na okienka szkiełka powinna odpowiadać co najmniej objętości naniesionych przeciwciał.
- 3.7 Inkubować szkiełka na wilgotnej bibule pod przykryciem przez 30 minut (± 10 min) w temperaturze otoczenia ($18 - 25^{\circ}\text{C}$).
- 3.8 Strzepnąć ze szkiełka krople koniugatu. Zanurzyć szkiełka i płukać jak poprzednio (3.5). Usunąć delikatnie nadmiar wilgoci za pomocą bibuły.
- 3.9 Za pomocą pipety nanieść na każde okienko szkiełka $5 \mu\text{l} - 10 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ M}$ buforu fosforanowo-glicerynowego (Załącznik 2) lub innego dostępnego w handlu utrwalacza albo nanieść odpowiednią ilość w poprzek szkiełka i przykryć je szkiełkiem nakrywkowym unikając nadmiernej ekspozycji szkiełka na światło.

4. Odczytywanie testu IF

- 4.1 Sprawdzić szkiełka pod mikroskopem epifluorescencyjnym z filtrem i źródłem światła właściwym dla wzbudzenia FITC, pod olejem, glicerolem lub wodą immersyjną przy powiększeniu $500 - 1000$ razy. Okienka przeglądać wzdłuż dwóch średnic i dookoła obwodu okienka. Sprawdzić przynajmniej 40 pól mikroskopowych w przypadku próbek nie zawierających komórek lub zawierających ich małą ilość. Sprawdzić najpierw szkiełko z kontrolą pozytywną. Komórki muszą fluoryzować jasno, a ściany komórkowe muszą być całkowicie wybarwione przy określonym mianie przeciwciał lub rozcieńczeniu roboczym. Test IF należy powtórzyć jeśli wybarwienie nie jest właściwe.

- 4.2 Poszukiwać w okienkach szkiełek testowych jaskrawo fluoryzujących komórek o charakterystycznej morfologii dla poszukiwanego organizmu. Intensywność fluorescencji przy tym samym rozcieńczeniu surowicy musi być równoważna intensywności wykazywanej przez szczep wykorzystany w kontroli pozytywnej. Komórki niecałkowicie wybarwione lub komórki o słabej fluorescencji należy odrzucić.

W przypadku podejrzenia wystąpienia kontaminacji test należy powtórzyć. W przypadku gdy wszystkie szkiełka w badanej partii wykazują obecność pozytywnych komórek lub gdy pozytywne komórki znajdują się na szkiełku nakrywkowym (na zewnątrz okienek szkiełka mikroskopowego) można podejrzewać kontaminację buforu.

- 4.3 Istnieje kilka problemów wynikających ze specyfiki testu immunofluorescencji. W przypadku próbek roślinnych oraz próbek nasion można obserwować w tle obecność fluoryzujących komórek o nietypowej morfologii, jak również krzyżowo reagujące bakterie saprofityczne posiadające wymiary i morfologię podobne do wymiarów i morfologii poszukiwanego organizmu.
- 4.4 Uwzględnić wyłącznie fluoryzujące komórki o typowym rozmiarze i morfologii przy określonym mianie surowicy/przeciwciał lub rozcieńczeniu roboczym.

5. Interpretacja wyników testu IF

Test IF należy uznać za pozytywny jeśli w zawieszynie osadu lub w ekstrakcie próbki zostaną wykryte fluoryzujące komórki o typowej morfologii. Jednakże w przypadku próbki porażonej w sposób utajony w żadnym wypadku nie można wydać miarodajnego wyniku na podstawie jedynie pozytywnego wyniku testu IF. Pozytywny wynik testu IF jedynie sugeruje podejrzenie wystąpienia poszukiwanego organizmu w próbce. W celu potwierdzenia lub odrzucenia wyników testu IF zawieszyna osadu lub ekstrakt próbki wymagają dalszych badań z wykorzystaniem innych testów.

Próg wykrywalności dla testu IF mieści się zwykle pomiędzy 10^3 – 10^4 komórek na mililitr zawieszyny osadu lub ekstraktu próbki. Zwykle pozytywne wyniki testu IF dla progu wykrywalności są powodowane przez reakcje krzyżowe komórek bakterii. W przypadku porażenia utajonego należy najpierw starannie obliczyć poziom porażenia dla progu wykrywalności. W przypadku gdy test IF jest na poziomie progu wykrywalności może on zostać uznany za pozytywny i jest wówczas wymagana ocena eksperta w celu podjęcia decyzji jakie dalsze analizy należy wykonać.

Należy podkreślić że określenie liczby komórek bakterii jest wymagane w przypadku wykrycia obecności poszukiwanego organizmu w próbkach porażonych w formie utajonej, natomiast nie jest wymagane w przypadku zastosowania testu IF dla zawieszyny czystych kultur lub ekstraktów zainfekowanej tkanki rośliny żywicielskiej (jako próbki lub jako kontrole).

6. Określenie poziomu porażenia w teście IF

6.1 Obliczyć średnią ilość typowych, fluoryzujących komórek przypadających na jedno pole widzenia (c).

6.2 Obliczyć ilość typowych fluoryzujących komórek przypadających na jedno okienko szkiełka mikroskopowego (C).

$$C = c \times S/s$$

Gdzie S = powierzchnia okienka szkiełka wielopunktowego, a s = powierzchnia pola obiektywu.

$$s = \pi i^2 / 4G^2K^2$$

Gdzie i = współczynnik pola (wahający się od 8 do 24 w zależności od typu okularu),
 K = współczynnik tubusu (1 lub 1,25), G = powiększenie obiektywu (100x, 40x itd.).

6.3 Obliczyć ilość typowych fluoryzujących komórek przypadających na mililitr zawieszonego osadu (N)

$$N = C \times 1000/y \times F$$

Gdzie y = objętość zawieszonego osadu umieszczonego na każdym okienku, a F = współczynnik rozcieńczenia zawieszonego osadu.

Załącznik 2 – Bufory

Bufor do zawieszania (10 mM bufor fosforanowy, pH 7,2)

Bufor ten wykorzystywany jest zarówno do zawieszania skoncentrowanego poprzez wcześniejsze odwirowanie osadu ekstraktu próbki jak i do wykonania dalszych rozcieńczeń próbki.

Na₂HPO₄·12H₂O 2,7 g

NaH₂PO₄·2H₂O 0,4 g

Woda destylowana 1,0 l

Składniki rozpuścić, sprawdzić pH i wysterylizować poprzez autoklawowanie w temp. 121 °C przez 15 min.

Bufor do IF [10 mM bufor fosforanowy z dodatkiem soli (PBS), pH 7,2]

Bufor ten wykorzystywany jest do rozcieńczania przeciwciał

Na₂HPO₄·12H₂O 2,7 g

NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O	0,4 g
NaCl	8,0 g
Woda destylowana	1,0 l

Składniki rozpuścić, sprawdzić pH i wysterylizować poprzez autoklawowanie w temp. 121°C przez 15 min.

Bufor do IF z dodatkiem Tween

Bufor ten wykorzystywany jest do płukania szkiełek mikroskopowych.

Dodać 0,1% Tween 20 do buforu do IF.

Bufor fosforanowo -glicerynowy, pH 7,6

Bufor ten wykorzystywany jest jako utrwalacz, który po naniesieniu na okienka szkiełek do IF wzmacnia fluorescencję.

Na ₂ HPO ₄ x12H ₂ O	3,2 g
NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O	0,15 g
Glicerol	50 ml
Woda destylowana	100 ml

Roztwór utrwalacza przeciwdziałający wyświecaniu się fluorescencji jest dostępny w handlu pod nazwą Vectashield[®] (Vector Laboratories, Peterborough, Wielka Brytania) lub Citifluor[®] (Leica, Karlsruhe, Niemcy).

Załącznik 3 – Przygotowanie ekstraktów i szkiełek kontroli pozytywnej i negatywnej.

Przygotować osobno szkiełka kontroli pozytywnej przy użyciu szczepu homologicznego lub innego szczepu referencyjnego poszukiwanego organizmu zawieszając go w ekstrakcie roślinnym, jak to przedstawiono poniżej lub opcjonalnie w buforze. Jeśli to jest możliwe należy na tym samym szkiełku użyć jako kontroli pozytywnej naturalnie zainfekowanej tkanki (przechowywanej w formie zliofilizowanej lub zamrożonej w temperaturze poniżej -16°C). Jako kontrolę negatywną użyć należy ekstraktu próbki, która wcześniej w badaniach została uznana za wolną od poszukiwanego organizmu. Zaleca się używania szczepów referencyjnych jako kontroli pozytywnej lub podczas optymalizacji testów, w celu uniknięcia błędnej interpretacji z powodu reakcji krzyżowych. Szczepy referencyjne są dostępne w handlu z następujących kolekcji:

- a. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (NCPBB), Central Science Laboratory, York (Wielka Brytania)

b. Culture Collection of the Plant Protection Service (PD), Wageningen (Holandia).

c. Collection Française de Bactéries Phytopathogènes (CFBP), INRA Station Phytobactériologie, Angers (Francja).

1. W celu otrzymania zawiesiny komórek bakterii w buforze do zawieszania o gęstości około 10^8 komórek na mililitr należy przeprowadzić hodowlę wirulentnego szczepu poszukiwanego organizmu poprzez inkubację szczepu przez określony czas (najczęściej 48 godzin) na Agarze Odżywczym (NA) lub innym odpowiednim podłożu (Załącznik 2). Można to otrzymać przygotowując słabo gęstą zawiesinę odpowiadającą optycznej gęstości około 0,15 przy długości fali 600 nm. Przygotować materiał roślinny, uznany za wolny od poszukiwanego organizmu w wyniku przeprowadzonych wcześniej testów i zawiesić osad w 10 ml buforu do zawieszania osadu (Załącznik 2).

2. Przygotować 10 sterylnych mikroprobówek o pojemności 1,5 ml zawierających po 900 μ l zawieszonego osadu (po odwirowaniu lub ekstraktu roślinnego) lub nie rozcieńczonego ekstraktu tkanki roślinnej. Do pierwszej mikroprobówki przenieść 100 μ l zawiesiny poszukiwanego organizmu. Wstrząsnąć za pomocą worteksu. Ustalić dziesięciokrotne poziomy kontaminacji poprzez dalsze rozcieńczenia w następnych czterech mikroprobówkach. Przenieść 100 μ l buforu do zawieszania osadu do pięciu nie skontaminowanych mikroprobówek. Pierwsze pięć skontaminowanych mikroprobówek należy używać jako kontrole pozytywne. Następne pięć nie skontaminowanych mikroprobówek należy użyć jako kontrole negatywne. Mikroprobówki odpowiednio oznaczyć za pomocą etykiet.

3. Najpierw należy za pomocą testu IF potwierdzić czy jest obecny i w jakiej ilości poszukiwany organizm.

4. Do sterylnych mikroprobówek przenieść po 100 μ l każdego rozcieńczenia, tak by uzyskać dziewięć powtórzeń każdej próbki kontrolnej. Mikroprobówki odpowiednio oznaczyć za pomocą etykiet. Do chwili użycia przechowywać w temperaturze poniżej -16°C .

5. Kontrolne szkiełka mikroskopowe do testu IF przygotować w następujący sposób: Wykonać rozcieńczenie skontaminowanej zawiesiny tak by otrzymać następujące poziomy porażenia: około 1×10^6 , około 1×10^4 i około 5×10^3 komórek na mililitr. Nanieść standardową objętość każdego rozcieńczenia i kontrolę negatywną na szkiełko kontrolne (15 μ l jest odpowiednią ilością dla okienek o średnicy około 6 mm – w przypadku większych okienek należy odpowiednio dostosować nanoszoną objętość; ale należy pamiętać aby nanieść taką samą objętość jak w przypadku próbki która będzie badana). Dodatkowo (jeśli to możliwe) należy na szkiełko nanieść ekstrakt próbki naturalnie porażonej oraz jej dwa 10-krotne rozcieńczenia. Jako kontrolę negatywną koniugatu (KN) należy użyć rozcieńczenie 1×10^6 oraz ekstrakt naturalnie porażonej próbki. Kontrole nanieść na szkiełka najlepiej w sposób pokazany na rysunku 2.

Kontrolę pozytywną i negatywną należy przygotowywać dla każdej serii badanych próbek. Poszukiwany organizm musi być wykryty w kontroli pozytywnej i nie może być wykryty w żadnej z kontroli negatywnych.

Szkiełko kontrolne	●	●	●	●	●
	KN 1×10^6	1×10^6	1×10^4	5×10^3	negatywna
	●	●	●	●	●
	KN naturalnie zainfekowana	Naturalnie zainfekowana	naturalnie zainfekowana 1:10	naturalnie zainfekowana 1:100	pusta

KN: kontrole negatywne koniugatu

Rysunek 2. Sposób naniesienia kontroli pozytywnej i negatywnej na szkiełko kontrolne.

Tłumaczenie z jęz. angielskiego:	Sprawdził:	Zatwierdził:
Anna Kołodziejska (GIORiN CL)	Monika Kordyla-Bronka (GIORiN CL)	Janina Butrymowicz (GIORiN CL)
04.11.2011	04.11.2011	04.11.2011