

RAZVOJ HITRIH IN ENOSTAVNIH DIAGNOSTI NIH TESTOV ZA DOLO ANJE POVZRO ITELJEV RASTLINSKIH BOLEZNI NA TERENU

Rok LENAR I¹, Polona KOGOVŠEK², Maja RAVNIKAR³

^{1,2,3}Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

²Biotehniška fakulteta, Ljubljana

IZVLE EK

Prepoznavanje bolezni in njihovih povzro iteljev na terenu poteka predvsem z vizualnim pregledom. Za potrditev suma pa je najve krat potrebna še dodatna laboratorijska diagnostika. Še posebno je to pomembno v primeru mikrobnih povzro iteljev bolezni kjer je potrebno za njihovo potrditev uporabiti serološke, molekularne in druge laboratorijske tehnike. Da bi skrajšali as prvega prepoznavanja zastopanosti patogenih mikroorganizmov so se že pred leti na terenu pri eli uporabljati hitri diagnostiki ni testi, sprva serološki v zadnjem asu pa tudi molekularni. Velik korak k u inkoviti diagnostiki na terenu pa je prispeval razvoj hitre molekularne metode LAMP, ki poteka pod pogoji konstantne temperature, za branje rezultatov pa se uporablja enostaven fluorimeter. Metoda LAMP je manj ob utljiva na inhibitorje v vzorcih, zato je priprava vzorca za analizo enostavnejša. Teste razvijamo v okviru dveh evropskih projektov Vitisens in Q-detect. Razvite teste bo mogo e prilagoditi za enostavno uporabo tako v laboratoriju kakor tudi pri pridelovalcih, v skladiš ih, letališ ih, pristaniš u in na mejnih prehodih.

429

Klju ne besede: diagnostika, molekularni testi, LAMP, pomnoževanje nukleinskih kislin

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF FAST AND SIMPLE DIAGNOSTIC TESTS FOR FIELD DETECTION OF PLANT PATHOGENS

Discovery of diseases and their causes in the field is performed with visual inspection. To confirm the presence, the laboratory diagnostics is often required. This is specially unavoidable in the case of plant pathogens, where use of serological, molecular or other laboratory methods is needed. To shorten the time of first plant pest recognition, fast, serological and later molecular on-site detection methods were developed. The major progress was reached with the development of fast, molecular method LAMP, which can be performed under constant temperature, with simple fluorimeter used for detection of LAMP product. The method is less prone to inhibitors; therefore the sample preparation could be faster and simpler. The tests are developed in the frame of two European projects Vitisens and Qdetect. Developed test could be adapted for easy use in the laboratory, at the production site, warehouses, airports, ports and country borders.

Key words: diagnostics, molecular tests, LAMP, DNA amplification

¹ dr. znan., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

² dr. bioteh. znan., prav tam

³ prof. dr. biol. znan., prav tam

1 UVOD

V zadnjem času pospešen razvoj svetovne trgovine omogoča vse hitrejši uvoz in izvoz rastlinskega materiala, kjer je hitrost transporta ključna za ohranitev kvalitete. To pa omogoča tudi učinkovit transport živih rastlinskih škodljivcev ter patogenih mikrobov (viroidi, virusi, bakterije, glive) iz različnih delov sveta in mnogokrat tudi njihovo naselitev v novem okolju. Za preprečitev potencialne gospodarske škode, ki jo lahko povzročijo rastlinski škodljivci, je njihova hitra in zanesljiva diagnostika izjemno pomembna. Za zgodnje ukrepanje so zaželeni diagnostične metode, ki se lahko uporabljajo na mestu vstopa rastlinskega materiala v državo, npr. na letališču, v pristanišču, na mejnih prehodih. Na terenu se izvaja vizualni pregled blaga, ki pa ni zanesljiv v primeru latentnih okužb, ko okužen material ne kaže bolezenskih znamenj. V tem primeru so potrebne molekularne metode, ki ugotavljajo dedni material (DNK ali RNK) povzročitelja bolezni v vzorcu. Najbolj zanesljivi in najpogosteje uporabljeni metodi za določanje tarče v vzorcu sta PCR (verižna reakcija s polimerazo) in LAMP v realnem času. Zaradi izjemne občutljivosti molekularne metode detekcije zahtevajo predhodno izolacijo dednine, kar pa je časovno zamuden postopek in zahteva uporabo večje laboratorijske opreme.

Povzročitelji bolezni so v rastlinskem materialu lahko zastopani v zelo različnih količinah in njihova količina se skozi sezono lahko spreminja, zaradi česar je potrebno rastlinski material primerno vzorčiti (čas vzorčenja, tip tkiva) in pripraviti (homogenizacija in po potrebi obogatitev dednine). Vendar pa s postopki priprave vzorca sprostimo iz rastlinskih celic tudi veliko ostalih celicnih snovi, ki inhibitorno vplivajo na nadaljnje postopke molekularne analize. Tako priprava vzorca za molekularno analizo predstavlja velik izziv, predvsem če jo želimo izvesti na terenu, kjer nimamo dostopa do laboratorijske opreme.

Za molekularno določanje rastlinskih škodljivcev je vedno bolj priljubljena izotermalna metoda pomnoževanja LAMP (loop mediated isothermal amplification) (Parida *et al.*, 2008). Prednost te metode pred ostalimi molekularnimi metodami je predvsem v tem, da ne zahteva dolgotrajnih postopkov vzorčenja in predpriprave vzorcev, saj je manj občutljiva na inhibitorje v vzorcu (škrob v gomoljih krompirja, taninske kisline v materialu vinske trte, ...) (Francois *et al.*, 2011). Poleg tega se metoda izvaja pri konstantni temperaturi (60°C - 65°C) in ne zahteva periodičnega menjavanja temperature, kot npr. PCR in posledično ni potreben drag aparat, ki to omogoča.

Ugotavljanje pomnoževanja dednine škodljivca v reakcijah LAMP je mogoče na več načinov. Preprostejši temeljijo na vizualni analizi nastanka oborine (Mori *et al.*, 2001), na spremembi barve zaradi dodatka posebnih barvil (Njiru *et al.*, 2008), ali s pomočjo hitrih testov (LFD-lateral flow device) (Tomlinson *et al.*, 2010). V zadnjem času pa je na trgu dostopnih več naprav, ki omogočajo tako izvedbo testa, kot tudi odčitavanje končnih rezultatov (npr. Genie II). Zato ne preseneča, da se razvija veliko število testov, ki so prilagojeni enostavni detekciji mikrobnih povzročiteljev bolezni in škodljivcev, tako karantenskih kot nekarantenskih (preglednica 1).

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Priprava vzorca

Priprava vzorca je odvisna od izhodnega materiala in od patogenega mikroorganizma, ki ga pri akucijemo v vzorcu. Kadar vzorec testiramo na mikroorganizme, ki se nahajajo na vzorcu v veliki količini (na primer bakterijski izcedek), jih s plastično zanko za nacepljanje (ezo) postrgamo z vzorca. Material iz zanke za nacepljanje prenesemo v tubico z destilirano vodo in vzorec inkubiramo na 95°C vsaj 2 minuti. S tem se razbijejo celične stene in sprosti se DNA. Insekte lahko zmaceriramo v primernem pufu.

V primeru testiranja rastlinskega materiala, kjer pri akujemo patogen mikroorganizem v notranjosti celic, vzorec homogeniziramo. Za homogenizacijo uporabimo tubice z dodanim abrazivnim sredstvom in pufrom. Tubice z vzorcem ro no stresamo 1 minuto ali pa uporabimo preprosto napravo, ki omogo a stresanje. Zanko za nacepljanje potopimo v homogeniziran vzorec in jo prenesemo v tubico z vodo.

Tako pripravljene vzorce testiramo z metodo LAMP.

2.2 Izvedba LAMP testa

Z zanko za nacepljanje prenesemo 1-5 µl homogeniziranega/toplotno tretiranega vzorca v predpripravljeno reakcijsko mešanico, ki vsebuje pufer, potrebne encime za pomnoževanje DNK/RNK, oligonukleotidne za etnike in fluorescentno barvilo. Reakcijska mešanica z dodanim vzorcem je tako pripravljena za inkubacijo na temperaturi, ki omogo a pomnoževanje tar ne DNK/RNK (60°C – 65°C). Za ta postopek lahko uporabimo enostaven termoblok ali aparature, ki zagotavljajo konstantno temperaturo in obenem od itavajo fluorescenco. Primer take aparature je Genie II (Optigene Ltd., Horsham, UK), ki skozi potek testa od itava koli ino fluorescence in rezultat sproti izrisuje na grafu. Po kon ani 30-minutni inkubaciji naprava omogo a še izvedbo analize taliine temperature.

2.3 Interpretacija rezultatov

Pozitivna reakcija, ki pomeni prisotnost patogenega mikroorganizma, je vidna kot nastanek barvila ali oborine v tubici. V primeru uporabe fluorescen nih barvil in od itavanja rezultatov z aparaturo, pa kon ni rezultat od itamo iz tabele, kjer je naveden as, ki je bil potreben za pozitivno reakcijo, to je as pozitivnosti, in taliina temperatura kon nega produkta. Obenem lahko s pregledom krivulj analiziramo in ocenimo sam potek reakcije.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Zaradi enostavnosti izvedbe so testi LAMP primerni za laboratorijsko, predvsem pa za terensko diagnostiko. Razvili smo hitre in enostavne metode priprave vzorca, ki ne zahtevajo dolgotrajne izolacije dednine, temve le homogenizacijo vzorca. Ne isto e namre predstavljajo znatno manjši problem pri poteku reakcije LAMP kakor to velja za PCR oz. PCR v realnem asu. Velika prednost metode LAMP je tudi izvedba testa pri konstantni temperaturi, brez periodi nega spreminjanja temperature, kar je zna ilno za PCR ali PCR v realnem asu. Zahvaljujo izotermalnosti za izvajanje testov LAMP ne potrebujemo drage laboratorijske opreme, temve je dovolj le termoblok za vzdrževanje konstantne temperature 60°C - 65°C. Metoda LAMP zagotavlja zanesljivo analizo vzorcev v zelo kratkem asu. To je predvsem pomembno pri uvozu rastlinskega materiala, katerega zdravstveni status mora biti nedvoumno potrjen v najkrajšem možnem asu.

Enostavnost metode LAMP je tudi razlog za razvoj testov, ki specifi no zaznavajo razli ne karantenske mikroorganizme in insekte. Razvitih je že ve testov LAMP za dolo anje karantenskih in ostalih škodljivcev rastlin (preglednica 1). Prakti na uporabnost metode LAMP je bila že preizkušena na terenu in na letališ ih v Londonu in v Zürichu.

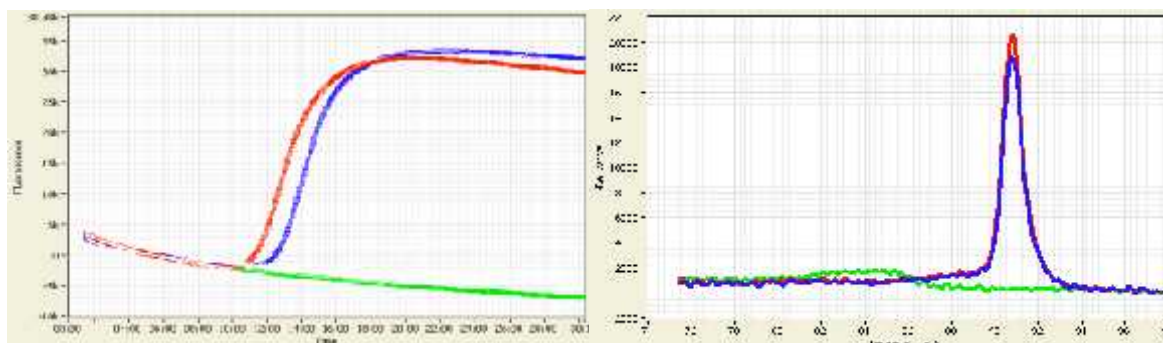
V okviru evropskega projekta Q-detect je bila izdelana prenosna naprava Genie II, ki omogo a izvedbo testa LAMP na terenu ali v laboratoriju. Naprava omogo a izvedbo testa pri potrebni reakcijski temperaturi, dodatno pa ima vgrajen opti ni sistem, ki skozi potek testa od itava koli ino pomnoženega tar nega gena. Spremljanje koli ine pomnoževanja omogo a v reakcijski mešanici prisotno fluorescentno barvilo, ki se veže le na pomnoženo dvovija no DNK, ta pa nastane le v pozitivnih reakcijah. Barvilo oddaja fluorescenco le,

ko je vezano na dvojnovija no DNK. V negativnih reakcijah, kjer tar nega patogena ni, pomnoževanje DNK ne poteka in posledi no naraš anja intenzitete fluorescence ne zaznamo (slika 3).

Preglednica 1: Primeri dostopnih testov LAMP za dolo anje rastlinskih škodljivcev

Škodljivi organizem	Avtor in publikacija
Virusi in viroidi	
<i>Potato spindle tuber viroid</i>	Lenar i in sod., 2013, Plant Pathol
<i>Cassava brown streak virus</i>	Tomlinson in sod., 2012, J Virol Meth,
<i>Potato virus Y</i>	Nie, 2005, Plant Disease
Bakterije in fitoplazme	
<i>Erwinia amylovora</i>	Buhlman in sod., 2013, J Microbiol Meth
<i>Xanhtomonas arboricola</i>	Buhlman in sod., 2012, Plant Pathol
Fitoplazme	Hodgetts in sod., 2011, Bull Insect
Glive	
<i>Botrytis cinerea</i>	Tomlinson in sod., 2010, Lett Appl Microbiol
<i>Phytophthora kernoviae</i>	Tomlinson in sod., 2010, Phytopathol
<i>Phytophthora ramorum</i>	Tomlinson in sod., 2010, Phytopathol
Škodljiviec	
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	Kikuchi in sod., 2009, Nematology

V zadnji stopnji testiranja naprava omogo a tudi potrditev dobljenega rezultata preko analize talilne krivulje. To dobimo tako, da se vzorec segreje na 95°C, pri tej temperaturi pomnožena dvovija na DNK razpade, nato pa naprava postopoma ohlaja testiran vzorec. Med postopnim ohlajanjem se enovija na DNK ponovno sestavi v dvovija no, pri emer je ponovno zaznana fluorescence. Temperatura, pri kateri se to zgodi (talilna temperatura), se zapiše kot del rezultata in jo uporabimo za dodatno potrditev analize (slika 3).



Slika 3: Prikaz rezultatov testa LAMP. Pozitiven vzorec (modra krivulja) kaže naraš anje fluorescence med testom, kar je primerljivo s pozitivno kontrolo (rde a krivulja) (levo). Fluorescenca naraš a zaradi vse ve pomnožene DNK v vzorcu. Nasprotno pa v negativnem vzorcu oziroma negativni kontroli (zelena krivulja) naraš anja fluorescence ni zaznati, saj ni tar ne DNK, ki bi se pomnoževala. Potrditev pozitivnih rezultatov s pomo jo talilne krivulje (desno).

Eksperimentalni podatki kažejo, da je za vsak tar ni gen zna ilna to no dolo ena in ob vsakem testu enaka temperatura taljenja DNK, kar omogo a potrditev dobljenih rezultatov. Kadar se talilna krivulja ujema s pri akovano, je rezultat nedvoumno pozitiven. e pa se talilna krivulja ne ujema s pri akovano, potem je rezultat lažno pozitiven in je potrebno opraviti dodatne analize.

3.1 Specifičnost testov LAMP

Specifičnost metode LAMP je ob dobro pripravljenem in validiranem testu enaka drugim molekularnim metodam. Dobro specifičnost zagotavlja uporaba ve parov oligonukleotidnih za etnikov.

3.2 Ob utljivost testov LAMP

V ve ini primerov so testi LAMP 10x bolj ob utljivi od navadne verižne reakcije s polimerazo (PCR) in 10x manj ob utljivi od primerljivih PCR testov v realnem asu.

4 SKLEPI

- Metoda LAMP ustreza za detekcijo in identifikacijo različnih rastlinskih škodljivcev in patogenih mikrobov.
- Metoda LAMP je še posebno ustrezna za analizo simptomatičnega rastlinskega materiala ali škodljivcev.
- Zapleteni postopki izolacije dednine pred izvedbo analize z metodo LAMP niso potrebni, saj metoda ni občutljiva na inhibitorje reakcije pomnoževanja dednine
- Zaradi hitrosti in enostavnosti izvedbe analize in odčitavanja rezultatov je metoda LAMP uporabna na terenu.
- Na voljo so že prenosne naprave, ki so zaradi majhnosti in možnosti baterijskega napajanja primerne tako za terensko kot tudi za laboratorijsko testiranje.

5 ZAHVALA

Razvoj LAMP metode je bil financiran preko Sedmega okvirnega programa Evropske unije, projektov Q-Detect in VITISENS.

6 LITERATURA

- Francois, P., Tangomo, M., Hibbs, J., Bonetti, E.J., Boehme, C.C., Notomi, T., Perkins, M.D., & Schrenzel, J. 2011. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 62, (1) 41-48 available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x>
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., & Notomi, T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, (1) 150-154
- Njiru, Z.K., Mikosza, A.S.J., Armstrong, T., Enyaru, J.C., Ndung'u, J.M., & Thompson, A.R.C. 2008. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Rapid Detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2, (2)
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P.K., Rao, P.V.L., & Morita, K. 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 18, (6) 407-421
- Tomlinson, J.A., Dickinson, M.J., & Boonham, N. 2010. Rapid Detection of *Phytophthora ramorum* and *P. kernoviae* by Two-Minute DNA Extraction Followed by Isothermal Amplification and Amplicon Detection by Generic Lateral Flow Device. *Phytopathology*, 100, (2) 143-149