



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 01329

(22) Data de depozit: 07.12.2011

(41) Data publicării cererii:  
30.12.2013 BOPI nr. 12/2013

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE  
DEZVOLTARE PENTRU CARTOF ȘI  
SFECLĂ DE ZAHĂR, STR. FUNDĂTURII  
NR. 2, BRAȘOV, BV, RO

(72) Inventatori:  
• BĂDĂRĂU CARMEN LILIANA, STR. ZIZIN  
NR. 31, BL.9, SC. D, AP. 6, BRAȘOV, BV,  
RO;  
• DAMSA FLORENTINA, STR. TIMIȘ  
NR. 44, SĂCELE, BV, RO

(54) **SUBSTITUIREA SOLUȚIILOR TAMPON  
EXTRACȚIE/OMOGENIZARE ȚESUT VEGETAL CU SOLUȚII  
TAMPON McIVAN ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚĂȚIRII  
SIGURANȚEI DE IDENTIFICARE A UNOR POTYVIRUSURI  
(VIRUSURILE Y ȘI A ALE CARTOFULUI)**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de testare a infecțiilor virotice ale cartofului. Metoda conform invenției constă din prelevarea probelor din frunze și colți, și tratarea cu o soluție tampon de extracție, conținând acid citric 0,18 M și fosfat monopotasice 0,18 M, în condițiile

aplicării tehnicii standard de identificare a infecțiilor virotice.

Revendicări: 1  
Figuri: 1



## DESCRIERE

### SUBSTITUIREA SOLUȚIILOR TAMPON EXTRAȚIE/OMOGENIZARE ȚESUT VEGETAL CU SOLUȚII TAMPON McIVAIN ÎN VEDEREA ÎMBUNĂȚĂȚIRII SIGURANȚEI DE IDENTIFICARE A UNOR POTYVIRUSURI (VIRUSURILE Y SI A ALE CARTOFULUI)

#### OBIECTIVELE ATINSE:

- Eficientizarea procesului de testare virotică a materialului de plantat la cartof din verigile superioare, prin adaptarea unei metode mai rentabile din punct de vedere economic comparativ cu cele folosite în prezent pe plan național.
- Soluții metodologice concretizate într-o metodă rentabilă și competitivă de testare a infecțiilor cu principalele virusuri ale cartofului pentru samanta (PLRV, PVY, PVM, PVA, PVX, PVS ) și utilizarea unor noi soluții tampon de omogenizare extract vegetal (soluții cu un preț de cost mai scăzut și cu o compoziție care asigură stabilitatea capsidei virale, mărind astfel siguranța și sensibilitatea de testare virotică prin tehnica ELISA)

#### INTRODUCERE

Virozele cartofului sunt foarte păgubitoare pentru cultura acestei plante, atât din cauza raspândirii rapide pe care o pot căpăta, cât și datorită faptului că acestea nu se pot trata decăt cu foarte mare dificultate. Utilizarea de tuberculi virozati la plantare poate determina pierderi de producție de 80% și chiar 90%, în funcție de soi, condiții climatice. Ponderea economica a pagubelor aduse de aceste boli virotice în producerea cartofului pentru samanta a determinat elaborarea și aplicarea unui sistem de producere a acestui material prin metode și tehnici specifice putandu-se astfel, identifica și elimina plantele bolnave. Deoarece la cartof înmulțirea se face pe cale vegetativa, o condiție esentială pentru obținerea unei producții bune este utilizarea cartofului pentru de samanta sanatos, fara boli virotice. Una din etapele hotarătoare în obținerea unui astfel de material este testarea în precultura a infecției cu virusuri. În acest scop se utilizează tehnica ELISA.

În cadrul complexului de măsuri fitotehnice și fitosanitare aplicate pentru obținerea unui material cu un grad cât mai redus de infecții virotice, un loc important în sistemele naționale de producere și certificare a cartofului pentru sămânță îl reprezintă testarea tuberculilor în precultura, utilizând tehnica ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Siguranța testului depinde de numeroși factori, unul dintre cei mai importanți fiind modul de prelevare a probei, respectiv partea din plantă care este utilizată pentru testare. Deși metoda este aplicată pe scară largă pentru testarea materialului clonal și în programele de certificare a cartofului pentru sămânță, ea are și dezavantaje legate în special de durata completă a testului și consumul de energie.

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) este unul dintre cele mai sensibile teste serologice. Dintre multiplele variante ale acestui test, noi utilizăm tehnica DAS ELISA (Double Antibody Sandwich ELISA), care se bazează pe interacțiunea anticorp -antigen (virus)- conjugat (anticorp cuplat cu o enzimă). Principiul tehnicii DAS-ELISA este următorul: Anticorpul (IgG) specifici adsorbiți în prima fază pe suprafața unei plăci de polistiren (care conține 96 de alveole), fixează eventualele particule de antigen (virus). Virusurile astfel imobilizate fixează la rândul lor anticorpii cuplați cu fosfataza alcalină (conjugatul). În final, hidroliza substratului duce la obținerea unei colorații galbene, a cărei intensitate poate fi măsurată fotometric, prin citirea densității optice la 405nm. O valoare prag discriminativă, calculată cu valorile obținute pentru probele sanatoase (lipsite de virus) permite determinarea prezentei sau absentei infecției virotice la materialul testat.

De la apariția primei lucrări privind utilizarea tehnicii ELISA în identificarea infecțiilor virotice la cartof și până în prezent s-au efectuat numeroase cercetări și au apărut zeci de publicații privind îmbunătățirea performanțelor acestei metode. Îmbunătățirea metodelor de identificare a infecției virotice a constituit una din direcțiile importante ale cercetărilor de virologie din cadrul INCDCSZ Brașov. Menționăm că pentru testarea materialului clonal în perioada 2007-2011, suc necesar pentru analiză a fost prelevat din tuberculi și din colții tuberculilor încolțiti pe cale naturală, metoda fiind aplicată pentru prima dată în țara noastră.

#### SOLUȚII METODOLOGICE PENTRU EFICIENTIZAREA TEHNICII

În vederea mării randamentului metodei și a reducerii consumului de reactivi s-au făcut cercetări privind modificarea metodei de diagnosticare a infecției cu PLRV, prin adăugarea concomitentă a sucului de

planta și a conjugatului și incubarea simultană a acestora la 4°C. Astfel, s-a eliminat una din etapele de spălare a plăcilor, s-a redus cantitatea de tampon de spălare utilizată. S-a constatat o marire semnificativă a sensibilității și siguranței testului

Comparativ cu metoda clasică (probe prelevate din frunze), modificările la testul ELISA din tuberculi și colți au fost următoarele:

- I. Modul de pregătire și prelevare a probelor: pregătirea tuberculilor, testarea tuberculilor imediat după recoltare (doar pentru PVM, PVX, PVS), modul de prelevare și distribuire a extractului
- II. Modul de incubare probe: tehnica Cocktail ELISA pentru identificare PLRV, durate diferite de preincubare probe pentru testarea tuberculilor imediat după recoltare (doar pentru PVM, PVX, PVS)
- III. Substituirea soluției tampon de extracție omogenizare probe cu soluție McIlvain (acid citric 0,18M, fosfat monopotasic 0,18M, pH=7) și înlocuirea unor aditivi din import (albumina serică bovină) folosiți la prepararea soluției tampon conjugat cu gelatină alimentară din comerț.
- IV. Utilizarea unor combinații de antiseruri

Pentru testul ELISA direct din tuberculi, suculele de plantă au fost extrase, diluate și distribuite direct în plăci utilizând un burghiu dentar modificat și un sistem automat de absorbție, diluție și repartizare a amestecului de soluție tampon de extracție și extract vegetal (figura 1). După cum se poate observa din această schemă, testul ELISA cu prelevarea probelor direct din tuberculi și colți a fost mai rapid, implicând o perioadă de realizare mai scurtă comparativ cu testul din frunze.

Testul ELISA din colți se poate face în timpul perioadei de depozitare, utilizând tuberculi încolțiți pe cale naturală. Colții prelevați în pungi de plastic sunt zdrobiți și omogenizați cu soluție de tampon de extracție, după care probele sunt pipetate manual în plăci.

Printre avantajele metodei din colți amintim:

- se reduc costurile necesare pentru creșterea plantelor în sere;
- se păstrează intact materialul testat deoarece starea fiziologică a tuberculilor nu este afectată nici în timpul și nici după prelevarea probelor.

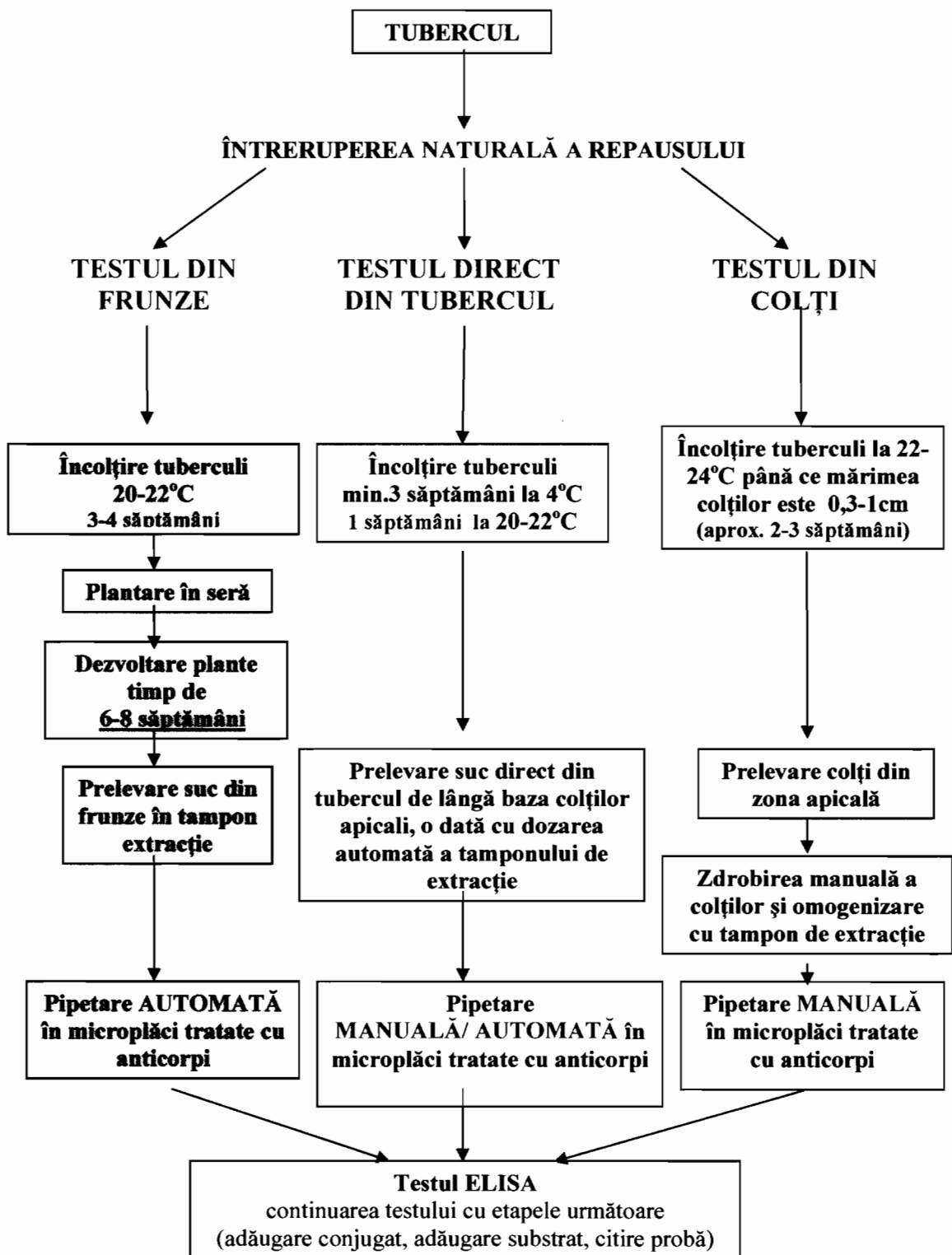
Prelevarea probelor din colți implică din păcate, următoarele dezavantaje:

- detectarea virusului răsucirii frunzelor (PLRV) este posibilă doar dacă mărunțirea țesutului vegetal este realizată corespunzător (având în vedere localizarea virusului în floem, prin sistemul de prelevare a probelor este posibil uneori ca membrana celulelor conducătoare să nu fie distrusă și în consecință, virusul să nu ajungă în extractul pentru testare);
- randament ceva mai redus, datorat în principal modulului de prelevare a probei.

Pentru a evita unele din dezavantajele prezentate mai sus, recomandăm ca înainte de întreruperea repausului germinativ a tuberculilor care vor fi testați prelevând extractul direct din tuberculi, aceștia să fie depozitați cel puțin 3 săptămâni într-o cameră frigorifică, la 4°C.

Pentru diagnosticarea virusului răsucirii frunzelor (PLRV) recomandăm în cazul tuturor variantelor de testare (probe prelevate din colți, tuberculi, frunze) tehnica COCTAIL ELISA (incubare simultană extract vegetal și IgG-conjugat)

La testarea extractului prelevat din tuberculi neîncolțiți, pentru diagnosticarea virusurilor X, S, M și virusul răducirii frunzelor (PLRV) se recomandă: tehnica cocktail ELISA cu o preincubare a suculei din tuberculi de 5 ore, tampon extracție cu adaos de sulfat de sodiu (0,4%), diluția extractului vegetal = 1/5. Utilizând această variantă, s-ar putea evita tratamentele necesare pentru a întrerupe repausul germinativ al tuberculilor, s-ar putea testa materialul din punct de vedere virotic imediat după recoltare (extractul vegetal prelevat direct din tuberculi).



**Schema 1.** Pregătirea tuberculilor și prelevarea probelor pentru testul ELISA.

În ceea ce privește utilizarea noilor soluții tampon, s-au făcut următoarele constatări, susținute statistic:

- dintre soluțiile tampon de omogenizare (extracție) experimentate, cele mai bune rezultate au fost înregistrate utilizând soluția tampon McIlvain (fosfat monopotasic 0,18M + acid citric 0,18M, pH=7) pentru diagnosticarea infecțiilor cu virusurile Y și A ale cartofului (probe prelevate din frunze). Propunem ca această variantă să fie testată și pentru probele prelevate direct din tuberculi.

- La diagnosticarea infecțiilor virale cu PVA, PVY gelatina alimentară a fost la fel de eficientă ca și albumina serică bovină p.a. din import (BSA). Identificarea virusului răsucirii frunzelor a fost favorizată de substituirea albuminei BSA cu gelatina alimentară (diferențe semnificative). Diagnosticarea virusurilor X și S nu a fost influențată semnificativ de modificarea compoziției soluțiilor tampon conjugat.

- Utilizarea noilor soluții tampon în campaniile de testare virotică ale cartofului pentru sămânță ar putea contribui la reducerea costurilor acestor analize (s-ar elimina importul de BSA)

În testarea virotică a cartofului pentru sămânță, utilizând extract din tuberculi sau colți, se pot utiliza antiseruri mixte pentru 2 virusuri, fără ca siguranța testului să fie afectată semnificativ.

Utilizarea amestecurilor de 2 antiseruri determină o reducere cu 50% a consumului de reactivi pentru soluțiile tampon, substrat și microplăci, precum și o creștere substanțială a numărului probelor ce pot fi analizate/ciclu de testare.

Printre avantajele metodei din colți amintim:

- este singura posibilitate de testare ELISA a tuberculilor cu întreruperea naturală a repausului germinativ;

- se reduc costurile necesare pentru întreruperea artificială a repausului și pentru creșterea plantelor în sere;

- se păstrează intact materialul testat deoarece starea fiziologică a tuberculilor nu este afectată nici în timpul și nici după prelevarea probelor.

Prelevarea probelor din colți implică din păcate, următoarele dezavantaje:

- detectarea virusului răsucirii frunzelor (PLRV) este posibilă doar dacă mărunțirea țesutului vegetal este realizată corespunzător (având în vedere localizarea virusului în floem, prin sistemul de prelevare a probelor este posibil uneori ca membrana celulelor conducătoare să nu fie distrusă și în consecință, virusul să nu ajungă în extractul pentru testare);

- randament ceva mai redus, datorat în principal modului de prelevare pentru testare.

Pentru a alege varianta optimă de testare în precultură a cartofului pentru sămânță, s-au realizat studii privind:

A. Influența modalității de incubare a probelor asupra siguranței de testare în cazul virusurilor PLRV, PVY, PVA, PVX, PVS, PVM urmărind:

- A1. Efectul variantei de testare COCKTAIL ELISA asupra siguranței de diagnosticare a virusului răsucirii frunzelor (PLRV), comparativ cu DAS ELISA
- A2. Influența unor durate diferite de preincubare a probelor la testarea tuberculilor neîncolțiți (la care nu s-a întrerupt repausul vegetativ)
- A3. Influența unor aditivi (substanțe reducătoare) utilizați pentru a se evita efectul background datorat proceselor oxidative care se desfășoară în timpul preincubării

B. Efectul unor soluții tampon cu compoziție modificată asupra siguranței și sensibilității de detectare prin testul ELISA a principalelor virusuri ale cartofului

- Soluții tampon de extracție (utilizate pentru omogenizarea extractului vegetal) Variante experimentate
  - martor soluție 2% polivinilpirolidona K25 în PBS-T (PBS-T reprezintă tampon fosfat salin + 0,05% Tween 20)
  - varianta1 tampon McIlvain(acid citric 0,18M, fosfat monopotasic 0,18M)
  - varianta2 dietilditiocarbamat de sodiu (Na DIECA)(0,1M) în PBS-T
  - varianta3 dietilditiocarbamat de sodiu (0,1M) + tioglicolat de sodiu (0,1M) în PBS-T

Rezultatele studiilor efectuate (aditivi, soluții tampon și posibilități de incubare a probelor utilizate în scopul îmbunătățirii performanțelor tehnicii ELISA) au fost prezentate la simpozioane internaționale și publicate în reviste cotate CNCSIS ISI și B+.

A. Influența modalității de incubare a probelor asupra siguranței de testare

A1. Efectul variantei de incubare utilizate în tehnica Cocktail ELISA

A1.1. *Probe prelevate din frunze.* La incubarea concomitentă a probei și conjugatului, proporția reacțiilor pozitive a fost de 100% chiar după 30 de minute de la adăugarea substratului și s-a menținut la același nivel până la ultima citire. Media valorilor extincțiilor obținute la probele incubate în amestec cu conjugatul a fost de 5,035 până la 6,6 ori mai mare comparativ cu cea înregistrată în cazul incubării separate (rezultatele sunt detaliate în raportul de experimentare)

A1.2. *Probe prelevate din tuberculi încolțiți.* În cazul variantei de incubare simultană a extractului și a soluției de IgG-AP, siguranța testelor a fost mai bună decât în cazul aplicării tehnicii DAS ELISA. Astfel, pentru diluții de 1/10 și 1/20 probele infectate au fost mai bine identificate. Virusul a fost imposibil de detectat prin varianta DAS ELISA în probele care au avut diluții mai mari de 1/20, în timp ce varianta Cocktail ELISA a condus la diferențieri nete între absorbanțele probelor pozitive și negative. După 2 ore de incubare a substratului valori semnificative ale OD la 405nm au fost înregistrate în cazul variantei Cocktail, diluția extractului 1/10.

*Pentru diagnosticarea virusului răsucirii frunzelor (PLRV) propunem în cazul tuturor variantelor de testare (probe prelevate din colți, tuberculi, frunze) tehnica COCTAIL ELISA (incubare simultană extract vegetal și IgG-conjugat)*

A2. Influenta unor durate diferite de preincubare a probelor la testarea tuberculilor neîncolțiți

Noutatea metodei constă în următoarele:

- în soluția tampon de omogenizare s-a adăugat sulfat de sodiu (0,4%) (agent reducător necesar pentru a împiedica reacțiile nespecifice, îngălbenirea placilor)
- probele diluate în tampon de extracție au fost distribuite în plăci și preincubate la temperatura laboratorului durate diferite (2, 4, 5, 24 ore), după care s-a efectuat distribuirea IgG-AP (conjugat, anticorpi marcați cu enzima) și plăcile au fost incubate la 4°C timp de 16 ore. Preincubarea timp de 5 ore a extractului din tuberculi la temperatura laboratorului înainte de a adăugarea conjugatului a condus la o îmbunătățire a sensibilității testului în cazul virusurilor M, Y și răsucirii frunzelor (diluția suc planta în tampon omogenizare=1/5). Prolungirea perioadei de preincubare mai mult de 4 ore a împiedicat diagnosticarea în bune condiții a virusului Y. În cazul virusurilor X și S modificarea perioadei de preincubare nu a influențat semnificativ valorile densitatilor optice (performanțele testului), în fiecare varianta testată valorile absorbantelor înregistrate la diagnosticarea probelor pozitive au fost mai mari de 2,000.

*Propunem pentru diagnosticarea virusurilor X, S, M și virusul răsucirii frunzelor (PLRV) în tuberculi neîncolțiți următoarea variantă de experimentare: tehnica cocktail ELISA cu o preincubare a sucului din tuberculi de 5 ore, utilizarea unei soluții tampon extracție cu adăugarea de sulfat de sodiu (0,4%), diluția extractului vegetal = 1/5, citirea probelor după adăugarea substratului să se facă după o oră. Celelalte etape ale testului vor fi parcurse conform protocolului stabilit de Clark și Adams (1987). Utilizând această variantă, s-ar putea evita tratamentele necesare pentru a întrerupe repausul germinativ al tuberculilor, s-ar putea testa materialul din punct de vedere virotic imediat după recoltare.*

A3. Influenta unor aditivi (substanțe reducătoare) utilizați pentru a se evita efectul background datorat proceselor oxidative care se desfășoară în timpul preincubării

Pentru a evita oxidarea unor componente ale extractului vegetal, s-au folosit ca agenți reducători: ditiotreit (DTT) (Sigma) (0,005%) și soluții de sulfat de sodiu (Flucka) cu următoarele concentrații 0,1%; 0,4%; 0,8%; 1%. Efectul acestor aditivi s-a testat numai pentru virusul răsucirii frunzelor, varianta Cocktail ELISA, extractul vegetal a provenit din tuberculi neîncolțiți, diluția probei în tampon de extracție a fost de 1/5. Experiența s-a realizat pe un esanțion de 30 probe, în trei repetiții. Materialul biologic a provenit din plante virozate (PLRV, infecție secundară) (izolate Lusewitz).

Dintre aditivii folosiți, sulfatul de sodiu în concentrație de 0,4% a condus la obținerea celor mai ridicate valori ale absorbantelor (media densităților optice la 405nm=1,571) față de mator la care media  $DO_{405nm}$  a fost 0,226, la o diferențiere netă a probelor infectate de cele sănătoase. Raportul dintre media extincțiilor probelor pozitive și media celor negative a fost cel mai ridicat (14,8) la varianta în care s-a folosit ca agent reducător sulfatul de sodiu 0,4% .

*Pentru testarea probelor prelevate din tuberculi neîncolțiți, în cazul variantelor de testare cu preincubarea extractelor vegetale propunem utilizarea soluției tampon de omogenizare cu un conținut suplimentar de sulfat de sodiu 0,4%.*

B Efectul unor soluții tampon cu compoziție modificată asupra siguranței și sensibilității de detectare prin testul ELISA a principalelor virusuri ale cartofului.

B1. Soluții tampon de extracție (omogenizare)

În cazul substituirii tamponului de extracție clasic cu soluție McIlvain ( acid citric 0,18M, fosfat monopotasice 0,18M, pH=7). la diagnosticarea virusurilor Y și A s-a remarcat o creștere a valorilor extincțiilor cu 63,5% la testarea virusului A și cu 32,46% la testarea virusului Y. Probabil compoziția soluției tampon McIlvain favorizează stabilizarea nucleocapsidei virale, ceea ce conduce la o îmbunătățire a reactivității sale serologice.

Și înlocuirea polivinilpirolidonei (utilizată la prepararea tamponului clasic) cu dietilditiocarbamat de sodiu (0,01M) a condus la o creștere a  $DO_{405nm}$  cu 38,4% la diagnosticarea virusului Y, dar această variantă nu a fost benefică pentru identificarea probelor infectate cu PLRV. Un efect asemănător l-a avut și utilizarea unui amestec de tioglicolat și dietilditiocarbamat de sodiu. Totodată, acești aditivi nu au influențat semnificativ sensibilitatea de diagnosticare pentru virusul A. Compoziția soluțiilor tampon de omogenizare nu a condus la o modificare semnificativă în cazul testării probelor infectate cu virusurile X și S.

*Propunem pentru testarea virusurilor Y și A (probe prelevate din frunze) substituirea tamponului de omogenizare clasic cu soluția McIlvain.*

## **MODIFICĂRI ÎN TEHNICA DE ANALIZĂ**

### **I. PRELEVAREA PROBELOR**

Comparativ cu metoda clasică (probe prelevate din frunze), modificările la testul ELISA din tuberculi și colți au constat în: pregătirea tuberculilor, modul de prelevare și distribuire a extractului.

Pentru prelevarea probelor, se poate utiliza orice organ al plantei de cartof, dar trebuie să se țină seama de faptul că

- distribuția virusului în planta depinde de:
  - vârsta (starea fiziologică a plantei)
  - virus -atacul virotic este diferit între diferitele parti ale aceleiasi plante
- atacul virotic este diferit și în interiorul aceluiași organ. Astfel, pot exista zone infectate și zone neinfectate în același tubercul
- intervalul de timp între momentul infecției și momentul determinării, deoarece duratele de timp pentru migrarea virusului diferă între diferitele organe ale plantei
- prelevarea extractului este hotărâtoare pentru siguranța de testare a infecțiilor virotice, mai ales în cazul unor virusuri care nu pot fi identificate decât dacă se realizează o distrugere mecanică avansată a țesutului (nu numai o simplă presare).

#### **1. Modalități de prelevare a extractului**

##### **1.1. Prelevarea extractului din frunze**

Materialul vegetal (în general câte 4 frunze recoltate de la 4 plante obținute din ochiurile apicale prelevate de pe tuberculi, tratate cu soluție de giberelină - 3mL/10L apă- și plantate în turbă) se presează într-o presă specială cu valțuri netede, suc se colectează într-o fiolă și se diluează în proporție de 1:3 cu soluție tampon de extracție. Din această fiolă, suc diluat este transferat automat (multipipeta SUMAL AD96) pe microplăcile de polistiren (Maxisorp Nunc) captușite în prealabil cu anticorpii specifici (fig 1A)

##### **1.2. Prelevarea extractului din colți**

Dacă tuberculii nu sunt încolțiți, aceștia se pastrează 1-2 săptămâni (în funcție de soi) într-o incintă în care temperatura este menținută la 22-24°C

Atunci când mărimea colților este de aproximativ 0,5-3cm se prelevează câte un colț din zona apicală sau ombilicală (în funcție de virus) de pe fiecare tubercul, se introduc în pungi sterile, se zdrobesc manual. În fiecare pungă se adaugă cu ajutorul unei pipete de dispersie câte 3 ml de tampon de extracție. Probele se omogenizează apoi cu ajutorul unui aparat MiniMax, după care suc diluat este transferat manual pe microplaci (figura 1C).

##### **1.3. Prelevarea extractului din tuberculi**

Aceasta este etapa care necesită cea mai parte din timpul alocat acestui test. Zona optimă pentru extracția sucului este baza ochiului apical pentru majoritatea virusurilor cu excepția virusului răsucirii frunzelor (PLRV). Burghiul aparatului pătrunde astfel, atât în stratul de periderm, în maduva cât și în țesuturile vaselor conducătoare (floem, xilem) ale tuberculului. De aceea, în acest fel se pot detecta toate virusurile (cu excepția virusului Y și A). Atenție însă la virusul PLRV care se determină cu siguranță doar în zona ombilicală a tuberculilor.

Extractul vegetal este diluat automat cu tampon de extracție (figura 1B), în funcție de programul de diluție ales și este pipetat direct în alveolele microplăcilor.

#### **2. Avantajele și dezavantajelor noilor tehnici de prelevare a probelor**

##### **2.1. Testul ELISA cu extract prelevat direct din tuberculi**

Pentru testul ELISA direct din tuberculi, suc de plantă a fost extras, diluat și distribuit direct în plăci utilizând un burghiu dentar modificat și un sistem automat de absorbție, diluție și repartizare a amestecului de soluție tampon de extracție și extract vegetal (figura 1).

Testarea ELISA cu prelevarea probelor direct din tuberculi a fost mai rapidă, implicând o perioadă mai scurtă comparativ cu testul din frunze, dar a avut și unele dezavantaje și anume:

- o detectare satisfăcătoare a virusurilor PVY și PVA se face numai dacă tuberculii s-au respectat condițiile de temperatură și umiditate necesare pentru o încolțire corespunzătoare și pentru evitarea deshidratării tuberculilor;
- randament mai redus datorită modului de extracție și de umplere a microplăcilor (extracția probei din tubercul necesită mai mult timp comparativ cu cea realizată din frunze, cu presa electrică);
- o detectabilitate ceva mai redusă a testului în cazul nerespectării condițiilor de pregătire a tuberculilor înainte de testare.

## 2.2. Testul ELISA cu extract prelevat din colți (întreruperea naturală a repausului vegetativ)

Testul ELISA din colți se poate face în timpul perioadei de depozitare, utilizând tuberculi încolțiți pe cale naturală. Colții prelevați în pungi de plastic sunt zdrobiți și omogenizați cu soluție de tampon de extracție, după care probele sunt pipetate manual în plăci (figura 1).

Printre avantajele metodei din colți amintim:

- se reduc costurile necesare pentru creșterea plantelor în sere;
- se păstrează intact materialul testat deoarece starea fiziologică a tuberculilor nu este afectată nici în timpul și nici după prelevarea probelor.

Prelevarea probelor din colți implică următoarele dezavantaje:

- detectarea virusului răsucirii frunzelor (PLRV) este posibilă doar dacă mărunțirea țesutului vegetal este realizată corespunzător (având în vedere localizarea virusului în floem, prin sistemul de prelevare a probelor este posibil uneori ca membrana celulelor conducătoare să nu fie distrusă și în consecință, virusul să nu ajungă în extractul pentru testare);
- randament ceva mai redus, datorat în principal modului de prelevare a probei.

## II. UTILIZAREA UNOR SOLUȚII TAMPON (COMPOZIȚIE MODIFICATĂ)

### 1. Soluții tampon de extracție (omogenizare). Soluția McIlvain (pentru virusurile PVY, PVA)

Propunem pentru testarea virusurilor Y și A (probe prelevate din frunze) substituirea tamponului de omogenizare clasic cu soluția tampon McIlvain McIlvain (acid citric 0,18M, fosfat monopotasic 0,18M, pH=7). Probabil compoziția soluției tampon McIlvain contribuie la stabilizarea nucleocapsidei virale, ceea ce conduce la o îmbunătățire a reactivității serologice. Menționăm că acest tampon se folosește și la obținerea suspensiei concentrate de virus din plantele inoculate de *Nicotiana tabacum*, necesare preparării de antiseruri pentru potyvirusuri.

## III. TESTAREA TUBERCULILOR NEÎNCOLȚIȚI IMEDIAT DUPĂ RECOLTARE (DOAR PENTRU VIRUSURILE PVM, PVX, PVS)

Propunem pentru diagnosticarea virusurilor X, S, M în tuberculi neîncolțiți următoarea variantă de analiză: tehnica cocktail ELISA cu o preincubare a sucului din tuberculi de 5 ore, utilizarea unei soluții tampon extracție cu adăugare de sulfat de sodiu (0,4%), diluția extractului vegetal = 1/5, citirea probelor după adăugarea substratului să se facă după o oră. Celelalte etape ale testului vor fi parcurse conform protocolului stabilit de Clark și Adams (1987).

Pentru testarea probelor prelevate din tuberculi neîncolțiți, în cazul variantelor de testare cu preincubarea extractelor vegetale propunem utilizare soluției tampon de omogenizare cu un conținut suplimentar de sulfat de sodiu 0,4%.

## IV. UTILIZAREA UNOR COMBINAȚII DE IMUNOGLOBULINE, RESPECTIV CONJUGATE

Pentru virusurile Y și A se poate folosi metoda cu probe prelevate din colți, iar pentru celelalte virusuri metoda cu extract prelevat direct din tuberculi (diluție 1/5). Pentru testarea virusurilor Y și A se folosește ca tampon de extracție tamponul McIlvain. Pentru toate testele, tamponul conjugat poate conține gelatină alimentară în loc de BSA (albumină bovină).

Toate testările se fac prin metoda ELISA standard (Clark și Adams, 1977), însă cu reducerea cantităților de reactivi / alveolă la 120 microlitri pentru IgG și 100 microlitri pentru extractul de plante, conjugat și substrat. Plăcile se incubează timp de 15-21 ore la 5-7°C, iar stabilirea valorii extincției se face la 405nm (E 405). Valoarea limită a extincției pentru probele cu reacție negativă poate fi de max. 0,100.

Se pot utiliza la testarea prin tehnica ELISA, amestecurile de 2 antiseruri, fără să fie afectată semnificativ siguranța de diagnosticare. Singurul dezavantaj al folosirii antiserurilor mixte constă în aceea că, în cazul reacțiilor pozitive nu se știe care din cele 2 sau 3 virusuri este prezent. Însă, în producerea cartofului pentru sămânță interesează în special dacă planta este sănătoasă sau infectată. În anumite situații, când se dorește a se ști exact ce virus este implicat, planta sau plantele cu reacție pozitivă se pot retesta cu seruri simple. Se pot utiliza următoarele amestecuri de antiseruri: PLRV+PVA; PVY+PVM; PVX+PVS.

Pentru stabilirea structurii combinațiilor de seruri, este necesar ca în prealabil să se testeze fiecare proveniență de antiseruri, privind sensibilitatea și tipul de apariție a reacțiilor după adăugarea substratului. Aceasta, pentru că între virusuri s-au constatat intervale de 2-20 minute până la evidențierea vizibilă a reacțiilor de colorare, diferențe ce depind atât de calitatea antiserurilor, cât și de concentrația virusurilor.

Utilizarea de seruri mixte pentru identificarea prin tehnica ELISA a infecțiilor virotice, prezintă unele avantaje economice atât privind consumurile de reactivi și materiale, cât și privind randamentul metodei. Astfel, prin folosirea amestecului de 2 antiseruri se reduce cu 50% necesarul de tampoane pentru



spălare, substrat și diluarea anticorpilor și conjugatului, precum și consumul de microplăci și de parantirofenilfosfat; de asemenea, comparativ cu utilizarea serurilor simple, se obține practic o dublare a numărului de probe ce pot fi analizate de o echipă/zi, fără să fie necesară o dotare suplimentară cu aparatură. În consecință, prin utilizarea de antiseruri mixte, pentru depistarea infecțiilor virotice la producerea cartofilor pentru sămânță, se realizează o reducere apreciabilă a costurilor testării prin tehnica ELISA, care în general sunt ridicate.

## **INFLUENȚA /TIPULUI DE INFECȚIE (PRIMARĂ, SECUNDARĂ) ASUPRA SIGURANȚEI DE TESTARE VIROTICĂ PRIN NOUA VARIANTA A TEHNICII ELISA**

### **1. Influența /tipului de infecție (primară, secundară) asupra siguranței de testare virotică prin noua variantă a tehnicii ELISA**

Au fost folosiți pentru testare tuberculi la care inocularea cu virus s-a realizat în diferite faze de vegetație. Tuberculi recoltați după infecțiile primare au fost numerotați și au fost împărțiți în două grupe. Tuberculi dintr-una din grupe au fost depozitați, apoi plantați în seră. Din frunzele acestor plante s-a prelevat suc care a fost testat prin varianta clasică. Materialul biologic din cealaltă grupă a fost depozitat și analizat după încolțire (testarea s-a făcut comparativ, la 6 intervale de timp de la recoltare cu probe prelevate direct din tuberculi sau din colți)

Variante experimentale (probele alese în funcție de momentul infecției virale)

Probele au fost alese în funcție de tipul infecției astfel:

- prima variantă – infecție primară în anul 2010 : inoculare imediat după răsărire, la începutul formării frunzelor;
- a 2 -a variantă – infecție primară din anul 2010: inoculare la 2 săptămâni înaintea recoltării seminței, mulți tuberculi au atins deja mărimea cartofilor de sămânță;
- a 3-a variantă: plante cu infecție secundară.

Identificarea infecțiilor virotice la cartoful pentru sămânță se poate realiza utilizând probe prelevate direct din tuberculi în cazul plantelor din varianta I (infecție primară timpurie) probe infectate secundar. În aceste condiții, siguranța de testare pentru probele din colți a fost de 100%, la toate soiurile testate și la toate virusurile, cu excepția virusului răsucirii frunzelor (PLRV). În cazul acestui virus siguranța testului a fost 100% dacă proba s-a prelevat direct din tuberculi. Nu s-au înregistrat diferențele semnificative privind comportarea diferitelor soiuri.

Influența tipului de infecție (primară, secundară) asupra diagnosticării infecțiilor virale, asupra siguranței de testare virotică a fost semnificativă, după cum s-a remarcat din rezultatele prezentate.

### **2. Influența modului de prelevare a probelor (tuberculi, colți) asupra siguranței de testare virotică prin noua variantă a tehnicii ELISA**

Variantele experimentate testate (modalitatea de prelevare a extractului vegetal) au fost:

- suc prelevat din frunze
- suc prelevat direct din tuberculi
- probe prelevate din colți

Din fiecare soi, s-au folosit câte 360 tuberculi. Numărul probelor infectate (infecție secundară) din fiecare grupă a fost diferit (de la 24,9 la 50% la PVY, de la 26,3 la 35,9% pentru PLRV, iar pentru celelate virusuri a fost 18%). Alături de modul de prelevare a probei, siguranța testului a fost influențată semnificativ și de tipul soiului, de virusul implicat. Comparativ cu testarea sucului prelevat din colți, extractul direct din tubercul (Sapex) a condus la o diagnosticare mai sigură a virusului răsucirii frunzelor. Astfel, pentru soiurile testate, în cazul virusului Y, siguranța de testare a fost de 75-80% .

Identificarea virusului răsucirii frunzelor (PLRV) în tuberculi încolțiți a fost mai sigură dacă sucul a fost prelevat direct din tubercul (86,7-100%, în funcție de soi). După cum se poate observa în figura 5, comparativ cu rezultatele obținute utilizând extractorul Sapex, siguranța testului din colți a fost foarte scăzută între 0 și 14,3%.

Identificarea virusurilor X, M, S s-a făcut cu rezultate foarte bune (siguranța 100%) atât cu suc extras din colți cât și cu probele prelevate direct din tuberculi.

## **RECOMANDĂRI PENTRU TESTAREA DE SERIE (PROBE PRELEVATE DIN TUBERCULI)**

### **1. Testarea tubercuilor imediat după recoltare (doar pentru PVM, PVX, PVS)**

- Propunem pentru diagnosticarea virusurilor X, S, M în tuberculi neîncolțiți următoarea soluție metodologică: tehnica cocktail ELISA cu o preincubare a sucului din tuberculi de 5 ore, utilizarea unei soluții tampon extracție cu adăug de sulfat de sodiu (0,4%), diluția extractului vegetal = 1/5, citirea probelor

după adăugarea substratului să se facă după o oră. Celelalte etape ale testului vor fi parcurse conform protocolului stabilit de Clark și Adams (1987).

- Utilizând această variantă, s-ar putea evita tratamentele necesare pentru a întrerupe repausul germinativ al tuberculilor, s-ar putea testa materialul din punct de vedere virotic imediat după recoltare, evitându-se transmiterea mecanică a acestor virusuri în timpul manipulării, depozitării.
- Pentru testarea probelor prelevate din tuberculi neîncolțiți, în cazul variantelor de testare cu preincubarea extractelor vegetale propunem utilizarea soluției tampon de omogenizare cu un conținut suplimentar de sulfat de sodiu 0,4%.

## 2. Testarea de serie tuberculi încolțiți

- Tuberculii destinați pentru testare trebuie să fie maturizați, suberizați, pentru a nu fi afectați ulterior de putrezire. Pentru întreruperea repausului germinativ tuberculii se pastrează cel puțin 3 săptămâni la 4°C, apoi 1 săptămână la 22°C numai respectarea strictă a acestei perioade de incubare garantează siguranța testului
- În cazul testului din tubercul și din colți pentru diagnosticarea infecțiilor cu virusurile PVM, PVX, PVS prelevarea sucului trebuie să se facă de la baza colților apicali respectiv din colții apicali ai tuberculilor (siguranța este maximă)
- Pentru identificarea PLRV se va utiliza doar tehnica Cocktail ELISA cu probe prelevate direct din tuberculi (de la baza colților ombilicali), iar pentru virusurile Y și A ale cartofului, probele vor fi obligatoriu prelevate din colții din zona apicală
- Evidențierea sigură a virusurilor cu ajutorul sucului prelevat direct din tuberculi nu se poate face oricând. Concentrația virusului depinde de momentul infecției și de starea fiziologică a tuberculului. Pentru că multiplicarea virusului are loc în țesuturi aflate în creștere, active asadar din punct de vedere metabolic, pentru executarea testului este necesară întreruperea repausului germinativ. Întreruperea naturală a repausului îmbunătățește în majoritatea cazurilor detectarea tuberculilor infectați cu PLRV, evidențierea PVY rămânând dificilă și nesigură dacă probele sunt prelevate direct din tuberculi.
- La prepararea soluției tampon necesare pentru diluarea conjugatului, albumina serică bovină (BSA-provenită din import) poate fi substituită cu gelatină alimentară din comerț
- Pentru identificarea virusurilor Y și A, pentru omogenizarea și extracția probelor se poate folosi soluția tampon Mellvain (fosfat monopotaseric 0,18M + acid citric 0,18M, pH=7), soluție care se folosește și la obținerea suspensiei concentrate de virus din plantele inoculate de *Nicotiana tabacum*, necesare preparării de antiserați specifici pentru potyvirusuri. Menționăm că această soluție nu conține polivinilpirolidonă (reactiv de import).

Tehnica ELISA aplicată direct pe tubercul ar putea reduce perioada de efectuare a analizelor, oferind posibilitatea de a efectua selecția materialului sănătos la scurt timp după recoltare, evitându-se întârzierile datorate eventualelor probleme care apar de obicei la creșterea plantelor în seră. Totodată, prin scurtarea perioadei de testare, certificarea cartofului pentru sămânță în cazul unor soiuri timpurii se poate face într-un interval mai scurt, ceea ce permite cultivatorilor să cunoască gradul de infecție al materialului de plantat chiar înainte de a-l însiloza. Devansarea certificării în precultură a cartofului pentru sămânță vine în sprijinul fermierilor, care ar putea valorifica în timp util producția obținută.

## Concluzii

- În cazul tuturor variantelor de testare (probe prelevate din tuberculi, frunze) pentru diagnosticarea virusului răscucirii frunzelor (PLRV) siguranța și sensibilitatea tehnicii COCTAIL ELISA (incubare simultană extract vegetal și IgG-conjugat) s-a dovedit a fi mai ridicată comparativ cu tehnica DAS ELISA
- Tuberculii destinați pentru testare trebuie să fie maturizați, suberizați, pentru a nu fi afectați ulterior de putrezire. Pentru întreruperea repausului germinativ tuberculii se pastrează cel puțin 3 săptămâni la 4°C, apoi 1 săptămână la 22°C numai respectarea strictă a acestei perioade de incubare garantează siguranța testului
- În cazul testului din tubercul și din colți pentru diagnosticarea infecțiilor cu virusurile PVM, PVX, PVS prelevarea sucului trebuie să se facă de la baza colților apicali respectiv din colții apicali ai tuberculilor (siguranța este maximă)
- Pentru identificarea PLRV se va utiliza doar tehnica Cocktail ELISA cu probe prelevate direct din tuberculi (de la baza colților ombilicali), iar pentru virusurile Y și A ale cartofului, probele vor fi obligatoriu prelevate din colții din zona apicală
- Evidențierea sigură a virusurilor cu ajutorul sucului prelevat direct din tuberculi nu se poate face oricând. Concentrația virusului depinde de momentul infecției și de starea fiziologică a tuberculului.

Pentru că multiplicarea virusului are loc în tesuturi aflate în creștere, active asadar din punct de vedere metabolic, pentru executarea testului este necesară întreruperea repausului germinativ. Întreruperea naturală a repausului îmbunătățește în majoritatea cazurilor detectarea tuberculilor infectați cu PLRV, evidențierea PVY rămânând dificilă și nesigură dacă probele sunt prelevate direct din tuberculi.

- Prelevarea sucului de frunză asigură cea mai bună evidențiere a infecțiilor, concentrația virusurilor fiind mai ridicată față de tuberculi și colți
- Testarea ELISA cu prelevarea probelor direct din tuberculi asigură o detectare satisfăcătoare a virusurilor Y și A numai cu condiția utilizării probelor prelevate din colții din zona apicală (tuberculi la care repausul vegetativ a fost întrerupt pe cale naturală)
- Pentru diagnosticarea infecțiilor cu virusurile Y și A ale cartofului soluția tampon de extracție poate fi înlocuită cu soluția tampon McIlvain (fosfat monopotasic 0,18M + acid citric 0,18M, pH=7) (compoziția soluției tampon McIlvain contribuie la stabilizarea nucleocapsidei virale, ceea ce conduce la o îmbunătățire a reactivității serologice)
- La toate soiurile analizate, testarea efectuată cu extract din colți a condus la evidențierea probelor infectate (excepție virusului răsucirii frunzelor - PLRV)
- În cazul tuturor variantelor de testare (probe prelevate din tuberculi, frunze) pentru diagnosticarea virusului răsucirii frunzelor (PLRV) siguranța și sensibilitatea tehnicii COCTAIL ELISA (incubare simultană extract vegetal și IgG-conjugat) s-a dovedit a fi mai ridicată față de tehnica DAS ELISA
- Cu excepția virusurilor Y, A toate celelalte virusuri se pot identifica cu siguranță imediat după recoltarea tuberculilor prelevarea probelor realizându-se cu ajutorul extractorului Sapex, tehnica de analiză fiind COCKTAIL ELISA cu o preincubare a sucului din tuberculi de 5 ore în tampon extracție cu adaos de sulfat de sodiu (0,4%), diluția extractului vegetal = 1/5 Utilizând această variantă, s-ar putea evita tratamentele necesare pentru a întrerupe repausul germinativ al tuberculilor, s-ar putea testa materialul din punct de vedere virotic imediat după recoltare (extractul vegetal prelevat direct din tuberculi).
- Pentru testarea cartofului pentru sămânță se pot utiliza antiseruri mixte pentru 2 virusuri, fără ca siguranța testului să fie afectată semnificativ. Utilizarea amestecurilor de 2 antiseruri determină o reducere cu 50% a consumului de reactivi pentru tamponare, substrat și microplăci, precum și o creștere substanțială a numărului probelor ce pot fi analizate/ciclu de testare.

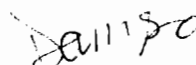
Dr. ing. BĂDĂRĂU CARMEN LILIANA

  
Ing. DAMSA FLORENTINA

Dr. ing. CHIRU SORIN CLAUDIAN

Director general ICDCSZ Brașov





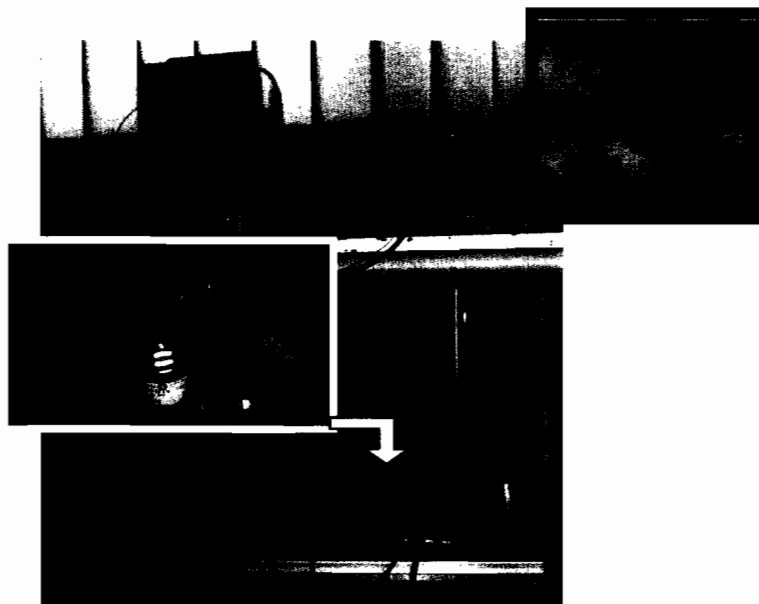
**REVENDICARE DE METODĂ**

**Metodă de testare a infecțiilor virotice ale cartofului (PVY și PVA) (*Potyvirusuri*, fam. *Potyviridae*) caracterizată prin înlocuirea soluției tampon extracție / omogenizare clasice (tampon standard fosfat salin -PBS- -cu adaos de 2% polivinilpirolidonă, pH=7,4) cu tampon McIlvain (acid citric 0,18M, fosfat monopotasic 0,18M, pH=7), metodă aplicabilă pentru probe prelevate din frunze și colți**

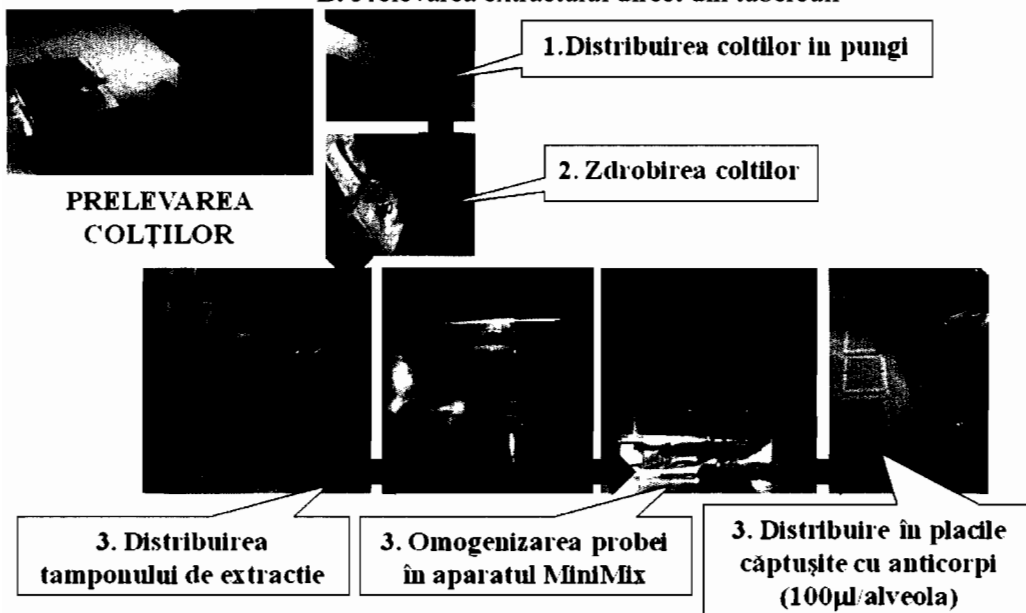
*Ștefan Ionescu, medic veterinar  
M. I. D. Ștefan, medic veterinar*



A. Prelevarea extractului din frunze



B. Prelevarea extractului direct din tuberculi



C. Prelevarea extractului din colții tuberculilor

Figura 1. Metodele de prelevare a extractului pentru testul ELISA (folosite în cadrul proiectului)