

## OPTIMIZACIJA LABORATORIJSKEGA TESTIRANJA GOSTITELJSKIH RASTLIN ZA DOLOČANJE BAKTERIJE *Xylella fastidiosa*

Manca PIRC<sup>1</sup>, Tjaša JAKOMIN<sup>2</sup>, Tanja DREO<sup>3</sup>

Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

### IZVLEČEK

Bakterija *Xylella fastidiosa* (Wells & Raju) je rastlinska patogena bakterija, ki povzroča nevarne bolezni velikega števila različnih rastlinskih vrst. V EU je bakterija uvrščena med karantenske škodljive organizme. Od prvih najdb v Italiji v letu 2013 se je predvsem zaradi resnosti okužb, neznačilnih bolezenskih znamenj in možnosti prikritih okužb močno povečalo število testiranj rastlin na to bolezen. Tudi v Sloveniji Uprava za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin s sodelujočimi institucijami že od leta 2014 izvaja program preiskav na to bakterijo. Prve laboratorijske analize smo sicer uvedli in izvajali testiranje rastlin vinske trte v obdobju 2006-2009, v okviru ciljnega raziskovalnega projekta CRP (V4-0313). Laboratoriji se z vidika zanesljivega testiranja in števila vzorcev soočamo z izzivom, kako oblikovati diagnostično shemo, ki omogoča hitro, zanesljivo in cenovno ugodno hkratno testiranje večjega števila vzorcev in različnih gostiteljskih rastlin z ali brez bolezenskih znamenj. V prispevku je predstavljena shema testiranja te bakterije, kakor jo izvajamo na Nacionalnem inštitutu za biologijo, ter evalvacija presejalnih testov, ki smo jih v letu 2018 tudi akreditirali (ISO 17025). Ob tem smo preverili, kako število reakcij v testu PCR v realnem času in število redčitev izolirane DNA vplivajo na zanesljivost določanja te bakterije. Prikazana je tudi primerjava uporabe različnih polavtomatiziranih aparatov za izolacijo DNA, ki smo jo izvedli v okviru CRP projekta XylVec (V4-1603). Na podlagi rezultatov smo oblikovali izboljšano diagnostično shemo laboratorijskega določanja bakterije *X. fastidiosa*.

**Ključne besede:** PCR v realnem času, optimizacija testiranja, avtomatizirana izolacija DNA

### ABSTRACT

#### OPTIMIZATION OF LABORATORY TESTING OF HOST PLANTS FOR DETECTION of *Xylella fastidiosa*

*Xylella fastidiosa* (Wells & Raju) is a plant pathogenic bacterium that can infect a large number of different host plants. In the EU, the bacterium is classified as quarantine pests. Since the first findings in Italy in 2013, the number of samples tested for this

---

<sup>1</sup> dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>2</sup> str. sod., prav tam

<sup>3</sup> dr., prav tam

disease has greatly increased, especially due to the severity of infections, unspecific disease symptoms and the possibility of asymptomatic infections. In Slovenia, the Administration of the Republic of Slovenia for Food Safety, Veterinary Sector and Plant Protection with participating institutions has been conducting a survey of *X. fastidiosa* since 2014. The first laboratory analyses were introduced and carried out in the period 2006–2009 within the targeted research project CRP (V4-0313) on grapevine plants. In terms of reliable testing and the number of samples, the laboratories face the challenge of designing a testing scheme that enables rapid, reliable and cost-effective simultaneous testing of a large number of samples and of different host plants with and without symptoms. In the presentation is presented a scheme for testing this bacterium, which is carried out at the National Institute of Biology, and the evaluation of molecular screening tests, which are accredited since 2018 (ISO 17025). We presented how the number of reactions in the real time PCR and the number of dilutions of isolated DNA affect the reliability of the determination of this bacterium. Results of comparisons of different half-automated devices for DNA extraction, done within the XylVec project (V4-1603) are shown. Based on the results, an improved diagnostic scheme is proposed for the laboratory determination of bacteria *X. fastidiosa*.

**Key words:** real time PCR, optimization of testing, automated DNA extraction

## 1 UVOD

379

Od leta 2014 do konca leta 2018 smo na Nacionalnem inštitutu za biologijo v okviru programa preiskav in inšpekcijskega nadzora testirali skupaj 1020 vzorcev. Od tega jih je imelo 839 (82 %) izražena bolezenska znamenja. V 181 (18 %) vzorcih smo preverjali prikrito prisotnost bakterije *Xylella fastidiosa*. V nobenem od testiranih vzorcev bakterije *Xylella fastidiosa* nismo potrdili.

Pripravo vzorcev ter shemo testiranja smo tekom let prilagajali novim smernicam testiranja, ki so bile rezultat različnih mednarodnih sodelovanj, delavnic in izkušenj drugih laboratorijev, kjer je bila ta bakterija potrjena. Tako smo tudi sodelovali pri oblikovanju zadnjih diagnostičnih protokolov PM 7/24 določanja *X. fastidiosa* regionalne organizacije za varstvo rastlin, EPPO (EPPO Bulletin 48(2), 2018; EPPO Bulletin 46(3), 2016)).

Zaradi velikega števila različnih gostiteljskih rastlin in velikega števila vzorcev, se laboratoriji z vidika zanesljivega testiranja in števila vzorcev soočamo z izzivom, kako oblikovati in optimizirati diagnostično shemo, ki omogoča hitro, zanesljivo in cenovno ugodno hkratno testiranje večjega števila vzorcev in različnih gostiteljskih rastlin z ali brez bolezenskih znamenj z enako učinkovitostjo.

Številne gostiteljske rastline bakterije *Xylella fastidiosa* vsebujejo snovi, ki delujejo inhibitorno na pomnoževanje DNA. Teh snovi nato v postopku izolacije DNA navadno ne moremo popolnoma odstraniti in lahko vplivajo na uspešnost metode PCR v realnem času (qPCR). Vpliv inhitornih snovi zmanjšamo, če testiramo več redčitev izolirane DNA posameznih vzorcev. Tako je naša prvotna shema testirana vključevala testiranje neredčene, 10x in 100x redčene DNA s testoma specifičnima za *X. fastidiosa* po Schaadu (Schaad in sod., 2002) in po Francisu (Francis in sod., 2006) ter kontrolnim

COX amplikonom, ki zaznava rastlinsko DNA (Weller in sod., 2000, Mumford in sod., 2004). Vse teste in redčitve DNA smo analizirali v treh ponovitvah (reakcijah). V prispevku je prikazano preverjanje vpliva števila redčitev DNA na zanesljivost testiranja in rezultati vpeljave visoko-zmogljivostnega sistema za izolacijo MagMax™ Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor, ki omogoča hkratno izolacijo DNA v 96 reakcijah. KingFisher mL sistem, ki ga v laboratoriju sedaj uporabljamo, omogoča hkratno izolacijo DNA le iz 15 vzorcev.

## 2 MATERIALI IN METODE

### 2.1. Vpliv redčitev DNA na zanesljivost testiranja

Ob testiranju rastlinskih ekstraktov smo v določen delež rastlinskih ekstraktov (preglednica 1) dodali suspenzijo bakterije *Xylella fastidiosa* (Xyf; t.i. PKIe kontrole z mejno koncentracijo bakterije Xyf). Tako smo 10 µL bakterijske suspenzije Xyf (LMG 17159 (NIB Z 1960)) s koncentracijo  $4 \times 10^4$  kopij na mL pri simptomatičnih vzorcih dodali k 90 µL rastlinskega ekstrakta ter pri latentnih vzorcih k 990 µL ekstrakta. Postopek izolacije DNA smo izvedli enako kakor pri vzorcih. S qPCR metodo po Schaad (Schaad in sod., 2002), Francis (Francis in sod., 2006) in COX amplikonom (Weller in sod., 2000, Mumford in sod., 2004) smo testirali neredčeno, 10x in 100x redčeno DNA v treh ponovitvah.

380

Pri analizi vpliva redčitev DNA na zanesljivost testiranja nas je zanimala predvsem pogostost primera, kjer samo 100x redčitev pokaže prisotnost bakterije, pri manj redčenih vzorcih pa je zaradi prisotnosti inhibitorjev pomnoževanja DNA ne zaznamo. Pri teh vzorcih bi dobili lažno negativen rezultat, če 100x redčitve ne bi analizirali. Če se takšni primeri pojavljajo, bi želeli ugotoviti kako pogosti so in ali so vezani na določene gostiteljske rastline. Poleg tega bi želeli tudi izvedeti, katera redčitev je najustreznejša za izvedbo in ali je možno uporabiti samo eno redčitev v analizi.

V analizo smo zajeli vzorce ter PKIe kontrole od začetka leta 2016 do aprila 2018. V tem obdobju smo analizirali 258 vzorcev z izraženimi bolezenskimi znamenji in 85 PKIe kontrol (33%) ter 126 vzorcev brez bolezenskih znamenj in 69 PKIe kontrol (55%; Preglednica 1).

Preglednica 1: Število vzorcev ter testiranih kontrol z dodano bakterijo *Xylella fastidiosa* (PKIe kontrole) glede na rod testirane rastline v obdobju od začetka leta 2016 do aprila 2018.

Rod testirane rastline	Vzorci brez izraženih bolezenskih znamenj		Vzorci z izraženimi bolezenskimi znamenji	
	Število vzorcev	Št. analiz PKIe (delež %)	Število vzorcev	Št. analiz PKIe (delež %)
<i>Acacia</i>	/	/	1	1 (100%)
<i>Acer</i>	2	2 (100%)	2	2 (100%)
<i>Asparagus</i>	/	/	1	1 (100%)
<i>Citrus</i>	4	4 (100%)	/	/
<i>Coffea</i>	7	4 (57,14%)	5	4 (80%)
<i>Ficus</i>	1	1 (100%)	1	1 (100%)
<i>Ginko</i>	1	1 (100%)	/	/
<i>Grevillea</i>	1	1 (100%)	1	1 (100%)
<i>Hebe</i>	2	2 (100%)	/	/

<i>Hedera</i>	2	2 (100%)	/	/
<i>Laurus</i>	1	0 (0%)	1	1 (100%)
<i>Lavandula</i>	12	8 (66,67%)	11	7 (63,64%)
<i>Liriodendron</i>	1	1 (100%)	/	/
<i>Lonicera</i>	/	/	1	1 (100%)
<i>Myrtus</i>	1	1 (100%)	/	/
<i>Morus</i>	/	/	1	1 (100%)
<i>Nerium</i>	31	7 (22,58%)	74	10 (13,51%)
<i>Olea</i>	24	11 (45,83%)	91	20 (21,98%)
<i>Origanum</i>	1	1 (100%)	/	/
<i>Polygala</i>	3	3 (100%)	4	4 (100%)
<i>Prunus</i>	3	3 (100%)	6	4 (66,67%)
<i>Quercus</i>	/	/	1	1 (100%)
<i>Rhamnus</i>	1	1 (100%)	/	/
<i>Rosa</i>	/	/	1	1 (100%)
<i>Rosmarinus</i>	22	11 (50%)	12	8 (66,67%)
<i>Rubus</i>	3	3 (100%)	/	/
<i>Spartium</i>	/	/	4	4 (100%)
<i>Vinca</i>	3	2 (66,67%)	2	2 (100%)
<i>Vitis</i>	/	/	38	11 (28,95%)
<b>SKUPAJ</b>	<b>126</b>	<b>69 (55%)</b>	<b>258</b>	<b>85 (33%)</b>

2.2.  
381

### Uvedba MagMax™ Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor (Applied Biosystems)

Za uvedbo MagMax™ aparature smo pripravili 14 PKIe kontrol z mejno koncentracijo bakterije Xyf. Vse PKIe kontrole so bile pripravljene iz rastlinskih ekstraktov vzorcev, ki so imeli bolezenska znamenja. Zajeli smo 13 različnih rodov. Poleg PKIe kontrol smo uporabili tudi 4 ekstrakte iz naravno okuženega oleandra in oljke. Iz vseh pripravljenih PKIe kontrol in naravno okuženih vzorcev, ki smo jih uporabili za uvedbo MagMax™ aparature, smo predhodno izolirali DNA z KingFisher mL aparaturo.

Postopek izolacije pri MagMax™ aparaturi (količina kemikalij in program izolacije) je bil enak kakor pri KingFisher mL. Po izolaciji DNA smo neredčeno in 10x redčeno DNA testirali s Schaad (Schaad in sod., 2002), Francis (Francis in sod., 2006) in COX amplikonom (Weller in sod., 2000, Mumford in sod., 2004) v treh ponovitvah.

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 3.1. Vpliv redčitev DNA na zanesljivost testiranja

Analiza 69 PKIe kontrol pri vzorcih brez izraženih bolezenskih znamenj kaže na to, da le pri enem vzorcu brez bolezenskih znamenj pri uporabi amplikona Francis brez 100x redčitve dobimo lažno negativen vzorec (preglednica 3). Gre za gostiteljsko rastlino rožmarina, ki vsebuje veliko inhibitornih snovi. Pri ostalih 10 rastlinah rožmarina je bila 10x redčena DNA pozitivna. Iz navedenih podatkov je diagnostična občutljivost qPCR pri upoštevanju neredčene in 10x redčene DNA za Schaad 100% in Francis amplikon 98,6%. Ker uporabljamo kombinacijo qPCR amplikonov smo zaključili, da za testiranje pri vzorcih brez izraženih bolezenskih znamenj 100x redčitev nepotrebna.

Preglednici 2 in 3: Diagnostična občutljivost qPCR pri PKIe kontrolah pri vzorcih brez bolezenskih znamenj – latentni vzorci (preglednica 2 (levo) – Schaad 100 %, preglednica 3 (desno) - Francis 98,6 %) pri upoštevanju neredčene in 10x redčene DNA.

PCR v realnem času		Xyf Schaad 0x,10x,100x		SKUPAJ
Latentni vzorci		poz	neg	
Xyf Schaad 0x,10x	poz	69	/	<b>69</b>
	neg	0	0	<b>0</b>
	<b>SKUPAJ</b>	<b>69</b>	<b>0</b>	<b>69</b>

PCR v realnem času		Xyf Francis 0x,10x,100x		SKUPAJ
Latentni vzorci		poz	neg	
Xyf Francis 0x,10x	poz	68	/	<b>68</b>
	neg	1	0	<b>1</b>
	<b>SKUPAJ</b>	<b>69</b>	<b>0</b>	<b>69</b>

Analiza 85 PKIe kontrol pri vzorcih z izraženimi bolezenskimi znamenji je pokazala da pri amplikonu Schaad in Francis (preglednici 4 in 5) ni bilo primera, kjer bi samo s 100x redčitvijo zaznali bakterijo, kar pomeni da pri ukinitvi te redčine ne bi imeli lažno negativnega rezultata zaradi inhibicije. Tako je diagnostična občutljivost qPCR pri upoštevanju neredčene in 10x redčene DNA za Schaad in Francis amplikon 100 %

382

Preglednici 4 in 5: Diagnostična občutljivost qPCR pri PKIe kontrolah pri vzorcih z bolezenskimi znamenji – simptomatični vzorci (preglednica 4 (levo) – Schaad 100 %, preglednica 5 (desno) - Francis 100 %) pri upoštevanju neredčene in 10x redčene DNA.

PCR v realnem času		Xyf Schaad 0x,10x,100x		SKUPAJ
Simptomatični vzorci		poz	neg	
Xyf Schaad 0x,10x	poz	85	/	<b>85</b>
	neg	0	0	<b>0</b>
	<b>SKUPAJ</b>	<b>85</b>	<b>0</b>	<b>85</b>

PCR v realnem času		Xyf Francis 0x,10x,100x		SKUPAJ
Simptomatični vzorci		poz	neg	
Xyf Francis 0x,10x	poz	85	/	<b>85</b>
	neg	0	0	<b>0</b>
	<b>SKUPAJ</b>	<b>85</b>	<b>0</b>	<b>85</b>

V nadaljnji analizi smo preverili delež vzorcev, kjer je neredčena DNA inhibirana in je zato potrebno testiranje 10x redčene DNA. Pri vzorcih testiranih na latentno okužbo je takih primerov 34,8 % (Francis) in 23,2 % (Schaad). Pri vzorcih z izraženimi bolezenskimi znamenji je delež manjši in sicer 9,4 % (Francis) in 5,9 % (Schaad). Iz navedenih podatkov smo zaključili, da je potrebno za zanesljivo testiranje uporabiti tako neredčeno in 10x redčeno DNA.

Oba presejalna testa (Schaad in Francis) smo v letu 2018 tudi akreditirali v skladu s standardom 17025.

### 3.2. Uvedba MagMax™ Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor (Applied Biosystems)

Da bi preverili uspešnost izolacije DNA bakterije Xyf z uporabo MagMax™ sistema, smo iz 14 PKIe kontrol ter 4 naravno okuženih vzorcev izolirali DNA z uporabo obeh sistemov za izolacijo DNA (MagMax™ in KingFisher mL). Iz preglednice 6 je razvidno, da je bila pri obeh sistemih izolacija DNA uspešna, saj smo dobili pozitiven rezultat pri vseh PKIe kontrolah in tudi pri naravno okuženih vzorcih. Tudi Cq vrednosti pri Schaad in Francis amplikonih pri obeh sistemih za izolacijo DNA so zelo primerljive.

Pri hkratni izolaciji DNA iz večjega števila vzorcev je možnost kontaminacije nekoliko večja, vendar so bile vse negativne kontrole, ki smo jih pri izolaciji DNA uporabili, negativne.

Preglednica 6: Primerjava qPCR rezultatov pri izolaciji s KingFisher 1mL in MagMax™ Express-96 Deep Well Magnetic Particle sistemom. Analizirali smo 14 PKIe kontrol ter 4 naravno okužene vzorce. V oklepaju so prikazane povprečne Cq vrednosti pri neredčeni DNA za Schaad / Francis amplikon.

PKIe kontrole (rodovi rastlin)	KingFisher mL	MagMax™
<i>Juglans</i>	poz (31,61 / 34,64)	poz (32,22 / 35,1)
<i>Prunus laurocerasus</i>	poz (31,81 / 35,52)	poz (33,37 / 37,42)
<i>Acer</i>	poz (31,62 / 35,59)	poz (32,13 / 36,81)
<i>Vinca</i>	poz (31,02 / 34,8)	poz (31,54 / 34,89)
<i>Prunus domestica</i>	poz (31,41 / 34,25)	poz (31,78 / 34,87)
<i>Laurus nobilis</i>	poz (32,88 / 35,82)	poz (32,65 / 36,65)
<i>Ficus carica</i>	poz (31,69 / 35,17)	poz (31,91 / 36,25)
<i>Olea europaea</i>	poz (33,08 / 37,18)	poz (33,78 / 36,91)
<i>Olea europaea</i>	poz (34,64 / 37,54)	poz (34,08 / 37,01)
<i>Nerium oleander</i>	poz (30,8 / 33,7)	poz (30,74 / 33,96)
<i>Rosa canina</i>	poz (32,1 / 36,31)	poz (32,9 / 35,92)
<i>Rosmarinus</i>	poz (31,14 / 34,43)	poz (31,81 / 35,07)
<i>Coffea</i>	poz (31,86 / 36,15)	poz (31,96 / 34,93)
<i>Lavandula</i>	poz (30,51 / 33,74)	poz (31,31 / 34,56)
<b>Naravni okuženi vzorci</b>		
Oleander D345/16-D	poz (33,49 / 40,34)	poz (32,88 / 40)
Oleander D345/16-E	poz (32,81 / 39,35)	poz (32,45 / 38,44)
Oleander D345/16-F	poz (29,79 / 36,96)	poz (29,59 / 36,46)
Oljka D346/16	poz (26,68 / 31,19)	poz (26,71 / 30,94)

383

#### 4 SKLEPI

Pri ugotavljanju vpliva redčitev DNA na zanesljivost testiranja smo ugotovili, da je uporaba 100x redčitve DNA nepotrebna in ne prispeva k večji zanesljivosti testiranja. Z namenom optimizacije testiranja smo jo opustili, kar nam omogoča analizo večjega števila vzorcev v enem testu PCR v realnem času.

Za hkratno testiranje večjega števila vzorcev, kadar bi bilo to potrebno, smo uspešno izvedli prenos izolacije DNA iz KingFisher mL na večjo napravo MagMax™ Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor, ki omogoča hkratno izolacijo DNA iz do 96 vzorcev.

#### 5 ZAHVALA

Zahvaljujemo se Upravi RS za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin za financiranje, koordinatorjema programa preiskav, mag Eriki Orešek in Matjažu Jančarju, vzorčevalcem *X. fastidiosa* ter Lidiji Matičič, Špeli Prijatelj Novak in Alešu Blatniku za izvajanje laboratorijskih testov. Projekt CRP, Sinergija znanj – Razvoj metod in postopkov za hitro odkrivanje in obvladovanje bolezni, ki jih povzroča *Xylella fastidiosa* in njenih prenašalcev (XylVec, V4-1603) financirata Javna agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije in Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.

#### 6 LITERATURA

- Francis, M., Lin, H., Rosa, J.C.-L., Doddapaneni, H., Civerolo, E.L., 2006. Genome-based PCR Primers for Specific and Sensitive Detection and Quantification of *Xylella fastidiosa*. *European Journal of Plant Pathology* 115, 203–213. doi:10.1007/s10658-006-9009-4
- Mumford, R.A., Skelton, A.L., Boonham, N., Posthuma, K.I., Kirby, M.J. and Adams, A.N. (2004). The Improved Detection Of Strawberry Crinkle Virus Using Real-Time Rt-Pcr (Taqman®). *Acta Hortic.* 656, 81-86, DOI:10.17660/ActaHortic.2004.656.11, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.656.11>
- Schaad, N.W., Opgenorth, D., Gauth, P., 2002. Real-Time Polymerase Chain Reaction for One-Hour On-Site Diagnosis of Pierce's Disease of Grape in Early Season Asymptomatic Vines. *Phytopathology* 92, 721–728. doi:10.1094/PHYTO.2002.92.7.721
- Scortichini, M., Saponari, M., Loconsole, G., Legendre, B., Olivier, V., Poliakov, F., Bergsma-Vlami, M., Gottsberger, R. A., Dreo, T., Loretto, S., Mueller, P., López, M. M. PM 7/24 (2) *Xylella fastidiosa*. *Bulletin OEPP*, ISSN 0250-8052, Dec. 2016, vol. 46, iss. 3, str. 463-500.
- Scortichini, M., Saponari, M., Loconsole, G., Legendre, B., Olivier, V., Poliakov, F., Bergsma-Vlami, M., Gottsberger, R. A., Dreo, T., Loretto, S., Mueller, P., López, M. M., C., S., Cuntly, A., Landa, B., Koenig, S., Vaerenbergh, J. van. PM 7/24 (3) *Xylella fastidiosa*. *Bulletin OEPP*, ISSN 0250-8052, 2018, vol. 48, iss. 2, str. 175-218.
- Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N.C., Boonham N., Stead D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with a Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7): 2853-2858.