

Serologie en diagnostiek: een oud verbond in een nieuw jasje

José van Beckhoven, Paul Piron, Jan Vink en René van der Vlugt

Plant Research International, Postbus 16, 6700 AA Wageningen; Jose.vanBeckhoven@wur.nl

Inleiding

Diagnostiek van plant pathogenen met behulp van serologische diagnostica is in Nederland al vele tientallen jaren een standaard technologie. Het is een van de pijlers onder ons intensieve en hoogstaande keurings- en kwaliteitssysteem en heeft als zodanig duidelijk bijgedragen aan de voor- aanstaande positie die Nederland op agrarisch gebied inneemt. Ondanks de toenemende belangstelling voor moleculair biologische detectiemethoden in de laatste tien jaar, vindt het merendeel van de keuringen bij de Nederlandse Keuringsdiensten en bedrijven nog steeds plaats met behulp van detectiemethoden gebaseerd op antisera. Prime Diagnostics®, onderdeel van Plant Research International BV, is binnen Nederland een van de grootste leveranciers van deze serologische reagentia. Het producten pakket bestaat op dit moment voornamelijk uit polyclonale antisera gericht tegen plantenvirussen (58) en plantpathogene bacteriën (32). Voor meer informatie zie ook de website op www.primediagnosics.nl.

De handel in planten en plantmateriaal is sterk geïnternationaliseerd waardoor ook de dynamiek van plantenziekten is veranderd. De wensen van

klanten op het gebied van diagnostiek veranderen daarin mee. Voor Prime Diagnostics staan een goede aansluiting op wat de klant nodig heeft en een verbreding van het productenpakket centraal. In dit artikel wordt de huidige stand van zaken met betrekking tot toetsing, productontwikkeling en nieuwe technologieën binnen Prime Diagnostics toegelicht.

Serologie zoals het was en nog is

De vroegtijdige en betrouwbare detectie van plant pathogenen in diverse gewassen en uitgangsmaterialen is een van de voorwaarden voor de productie van gezond uitgangsmateriaal in Nederland en het waarborgen van de kwaliteit van exportmateriaal. Sinds jaar en dag worden hiervoor serologische methoden (met name ELISA) gebruikt. Deze methoden zijn simpel uit te voeren, kunnen gemakkelijk geautomatiseerd worden (zodat ook daadwerkelijk enige honderdduizenden monsters in een korte tijd getoetst kunnen worden), zijn relatief erg goedkoop en hebben bovendien een hoge specificiteit voor het doel pathogeen. Nieuwere moleculair biologische methoden bieden meestal wel een hogere gevoeligheid maar tegen een duide-

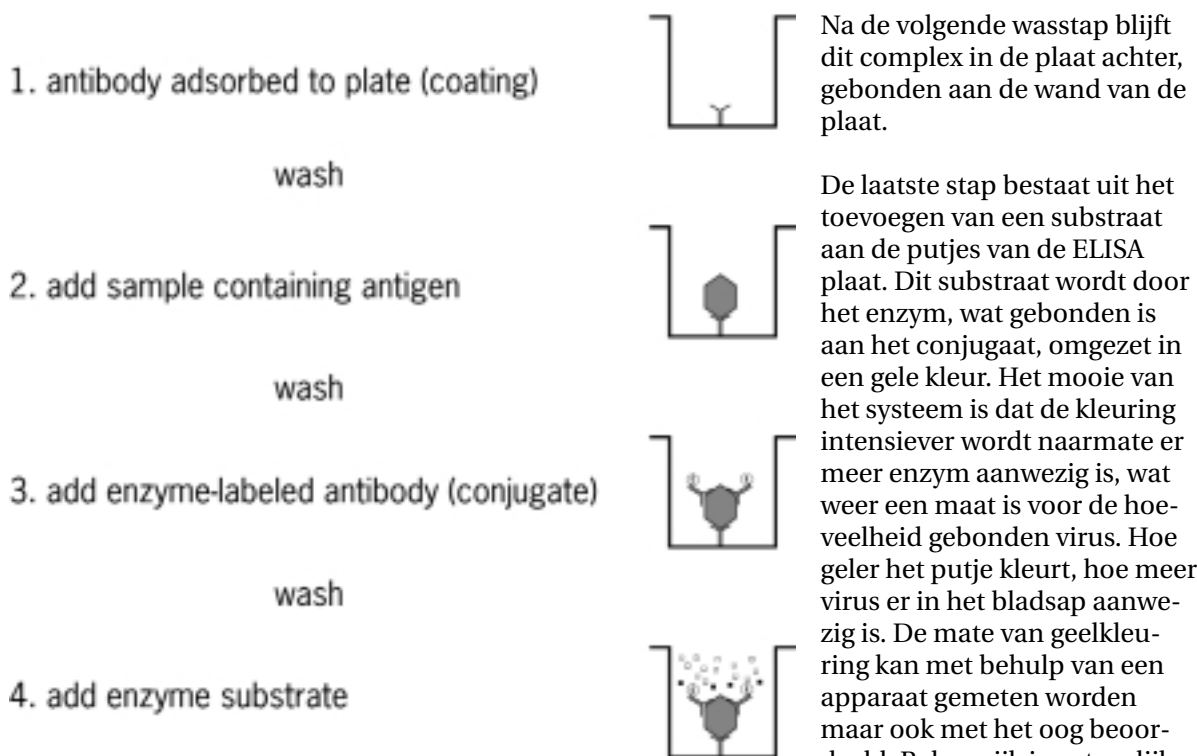
lijk hogere prijs. Monstervoorbereiding kost veel meer tijd waardoor niet alleen de prijs van de test aanzienlijk toeneemt maar de test ook veel minder geschikt wordt om grote aantallen te testen. Het 'scoren' van de uitslag is meestal een stuk bewerklijker dan voor ELISA en de robuustheid laat soms nog te wensen over. In de praktijk is een hogere gevoeligheid niet altijd noodzakelijk of een pré en hebben en een lage kostprijs en een grote toetscapaciteit vaak een doorslaggevende betekenis. Serologische detectiemethoden en m.n. ELISA worden daarom nog steeds veel toegepast binnen de agrarische sector.

Een van de eerste vereisten voor de ontwikkeling van een optimale serologische detectiemethode is de beschikbaarheid van een zuiver en specifiek antiserum. Dit kan alleen gemaakt worden al je in staat bent om het plantpathogeen waartegen je het antiserum wilt opwekken (in dit geval meestal een plantenvirus of plantpathogene bacterie) zuiver in handen te krijgen. Met name voor plantenvirussen geldt dat daar de nodige kennis en kunde voor nodig is. Kennis die in Nederland helaas niet meer breed voorhanden is.

Alleen met behulp van zuivere antigenen kunnen antisera

ARTIKEL

ELISA



Figuur 1. Schematische weergave van het principe van ELISA.

ontwikkeld worden die voldoende specifiek en gevoelig zijn. Met behulp van deze antigenen worden momenteel met name polyclonale en monoclonale antisera geproduceerd. Deze antisera worden vervolgens vooral gebruikt voor detectie van virus en bacterie met behulp van Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA). In figuur 1 wordt deze techniek schematisch toegelicht.

In een eerste stap worden het zogenaamde coating antilichaam aan een well in een 96-wels ELISA-plaat geplakt ('gecoat'). Dit antilichaam herkent specifiek een pathogeen (bijvoorbeeld aardappel virus Y). Na het wegwassen van niet gebonden antilichaam, wordt de plaat gevuld met sap van de te toetsen plant. Meestal wordt dit gemaakt door een of meerdere blaadjes fijn te malen samen met wat buffer en het sap

op te vangen. Door in elk putje van de ELISA plaat sap van een andere plant te brengen kunnen er meerdere planten tegelijk op een ELISA plaat getest worden. Het sap wordt dan enige tijd (meestal overnacht) in de putjes gelaten waarbij het eventueel aanwezige virus de tijd krijgt om aan het coating antilichaam te binden.

De putjes in de plaat worden weer gewassen waarna het virus gebonden aan het coating antilichaam aan de plaat gebonden overblijft.

De volgende stap bestaat dan uit het toevoegen van zgn. conjugaat. Dit is het antilichaam tegen aardappelvirus Y maar dan middels een chemische reactie gekoppeld aan een enzym; alkalisch fosfatase (AP). Weer herkent het antilichaam het virus en er vormt zich een "sand-

wich' van virus ingeklemd tussen twee antilichaam moleculen.

Na de volgende wasstap blijft dit complex in de plaat achter, gebonden aan de wand van de plaat.

De laatste stap bestaat uit het toevoegen van een substraat aan de putjes van de ELISA plaat. Dit substraat wordt door het enzym, wat gebonden is aan het conjugaat, omgezet in een gele kleur. Het mooie van het systeem is dat de kleuring intensiever wordt naarmate er meer enzym aanwezig is, wat weer een maat is voor de hoeveelheid gebonden virus. Hoe geler het putje kleurt, hoe meer virus er in het bladsap aanwezig is. De mate van geelkleuring kan met behulp van een apparaat gemeten worden maar ook met het oog beoordeeld. Belangrijk is natuurlijk wel het meenemen van positieve en negatieve controles in de test.

DAS-ELISA is zeer geschikt voor het toetsen op virusinfecties in een veelheid van gewassen maar wordt minder toegepast voor het aantonen van bacterie-infecties in plantmateriaal. Bij de detectie van bacterieziekten speelt de immunofluorescentie koloniekleuring (IF) een belangrijke rol. Bij IF worden antilichamen gelabeld met een fluorescent label in plaats van met alkalisch fosfatase zoals bij ELISA. Deze fluorescent gelabelde antilichamen worden gebruikt om hele bacteriën te kleuren door ze te incuberen met plantmateriaal of bacteriën op een voedingsbodem. Op deze manier kan een monster zowel morfologisch als serologisch beoordeeld worden op de aanwezigheid van specifieke bacteriën. Bovendien is het bij IF mogelijk om verschillende

antilichamen met verschillende fluorescente labels te conjugeren waardoor verschillende target antigenen in een mengsel gedetecteerd kunnen worden.

Serologische innovaties

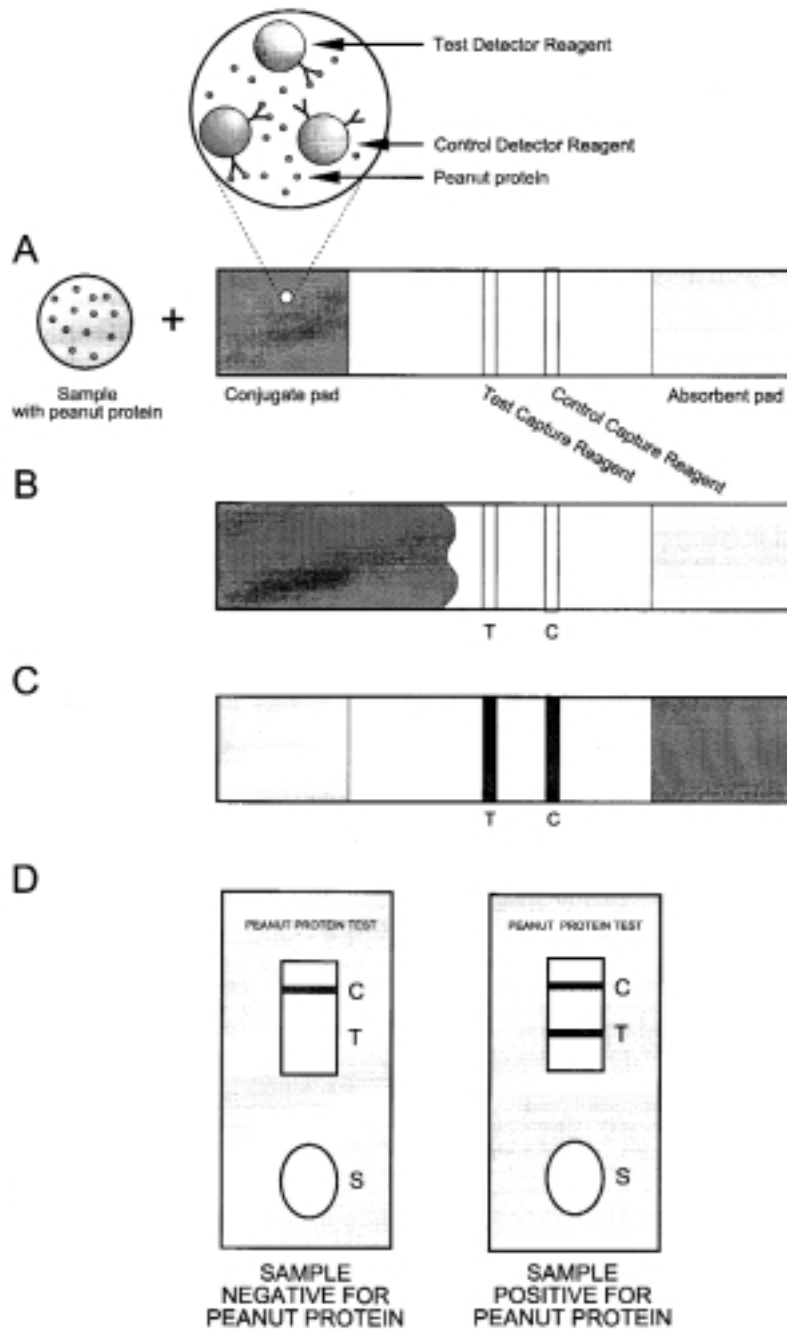
Een nadeel van de conventionele methodes voor de ontwikkeling van reagentia zoals hierboven is weergegeven is dat niet tegen alle gewenste pathogenen een antilichaam ontwikkeld kan worden. Een aantal virussen kan niet in voldoende hoeveelheden gezuiverd worden, bacteriën zijn niet altijd kweekbaar of het blijkt onmogelijk een antilichaam te produceren dat voldoende specifiek of reactief is. Nieuwe methoden kunnen dan wellicht een oplossing bieden.

Van steeds meer virussen en bacteriën komen gegevens over hun RNA of DNA en hun eiwitten beschikbaar. Wanneer zulke eiwit sequenties bekend zijn van delen van een virus of bacterie is het mogelijk deze gegevens te gebruiken voor de productie van een antigeen eiwit of peptide. Het gaat hier dan vaak om delen van de buitenkant van een virusdeeltje ('manteleiwit') of buitenmembraan van een bacterie. Een gedegen analyse van de beschikbare informatie van zoveel mogelijk stammen of isolaten van een virus of een bacterie geeft dan inzicht in welk stuk met best bruikbaar zou kunnen zijn. Een peptide wordt gesynthetiseerd aan de hand van de meest optimale sequentie en kan na koppeling aan een dragereiwit gebruikt worden als antigeen voor het antiserum productie. Voorwaarde hiervoor is dat het peptide vol-

doende immunogeen en bereikbaar moet zijn voor eventuele binding aan het specifieke antilichaam. Het antilichaam wat op deze ma-

nier geproduceerd wordt lijkt een beetje op een monoclonaal. Het is immers gericht tegen een heel specifiek eiwitmotief. Kleine veranderingen

PRINCIPLE OF THE LATERAL FLOW TEST



Figuur 2. Het principe van de lateral flow test uitgelegd a.d.h.v. de detectie van een allergie opwekkend eiwit uit pinda. A: De test strip met daarop het aan het goudbolletje gekoppelde antilichaam tegen het pinda-eiwit ('test detector reagent') en de twee detecterende antilichaamlijntjes. B: het te testen sap trekt over de test strip. C: Het antilichaamcomplex met de goudbolletjes is blijven plakken op het detectielijntje en wordt zichtbaar als een donker gekleurde lijn. D: makkelijk af te lezen testuitslag.

ARTIKEL

in het motief op de buitenkant van het virus of bacterie kunnen dan al snel leiden tot het niet meer herkennen door het antilichaam. Vals-negatieve toetsuitslagen zijn dan het gevolg.

De keuze van de sequentie die gebruikt wordt voor het synthetisch peptide bepaald uiteindelijk hoe specifiek of hoe algemeen het antiserum kan worden. Op dit moment onderzoekt Prime Diagnostics of het op deze manier mogelijk is een antiserum te maken dat (vrijwel) alle potyvirusen herkent. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een viruseiwit dat alleen gemaakt wordt in geïnfecteerde cellen. Dit eiwit blijkt bepaalde motieven te bezitten die gelijk zijn voor alle potyvirusen waarvan die eiwitsequentie op dit moment bekend is. Theoretisch moet het dus mogelijk zijn om tegen deze geconserveerde motieven antiserum te maken die dan alle potyvirusen zullen herkennen. Het onderzoek is nog niet zo

lang geleden gestart en de eerste antisera zijn beschikbaar. De eerste testresultaten zijn bemoedigend maar het zal nog wel enige tijd duren voordat het duidelijk is of ze ook in de praktijk toegepast kunnen worden.

Een andere strategie voor de productie van antilichamen gericht tegen antigenen die moeilijk te zuiveren zijn is de Phage Display (PhD). Met behulp van deze methode kan via moleculair biologische technieken vrijwel elk gewenst antilichaam in *E. coli* (een bacterie) of gist tot expressie worden gebracht. Ook een antilichaam is een eiwit en wordt uiteindelijk gecodeerd door een gen. Op dit moment zijn er verschillende zogenaamde PhD banken ('libraries') beschikbaar. Dit zijn verzamelingen van genen die coderen voor antilichamen) Via slimme technieken is het mogelijk om precies dat gen op te sporen in de bank wat codeert voor het antilichaam dat reageert met jouw

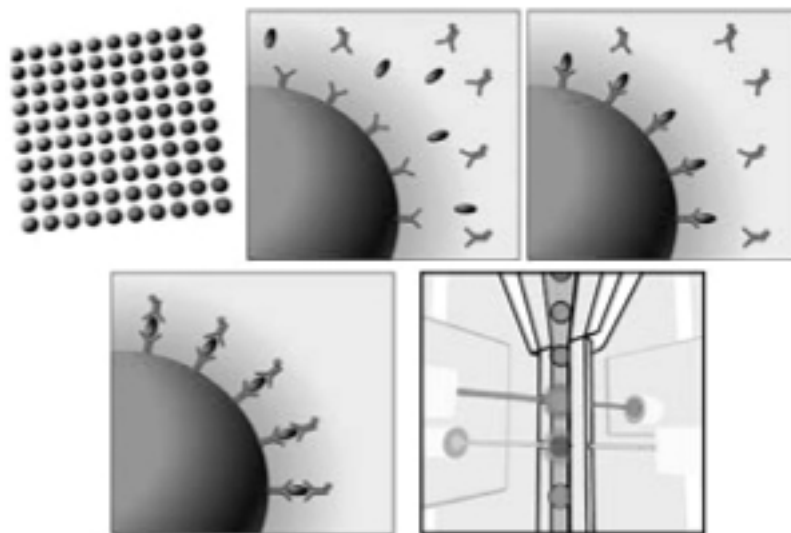
pathogeen. Dat gen wordt dan tot expressie gebracht en kan na zuivering voor toetsing gebruikt worden.

De Phage Display technologie is echter nog sterk in ontwikkeling. Er zijn diverse problemen en met name de reactiviteit en stabiliteit van de antilichamen verdient nog de nodige aandacht. De techniek wordt momenteel vooral gebruikt om de productie van antilichamen gericht tegen schimmels van de grond te krijgen. Met conventionele technieken is het onmogelijk gebleken om goede antisera tegen schimmels te maken. Omdat veel schimmels ongeveer dezelfde oppervlaktegroepen en -structuren hebben, leidt dit tot onaanvaardbare kruisreacties. Uit eerder door LNV gefinancierd onderzoek zijn inmiddels wel al een aantal Phage Display antilichamen beschikbaar gekomen, die gericht zijn tegen virus en bacterie. Hoe bruikbaar deze antilichamen in de praktijk zullen zijn is momenteel nog niet bekend.

Nieuwe technieken

DAS-ELISA en Immunofluorescentie zijn goed ingeburgerde serologische technieken. Met name hun robuustheid en lage prijs maakt ze onverminderd populair. Toch zijn beide technieken redelijk bewerkelijk ondanks het feit dat door robotisering wel enige snelheidswinst te behalen valt. Daarvoor moeten er echter wel voldoende tests op jaarbasis uitgevoerd worden. Voor grote bedrijven en keuringsdiensten meestal niet zo'n probleem maar voor veel kleine bedrijven niet realiseerbaar.

Een van de beschikbare snelle alternatieve testmethoden is



Figuur 3. Schematische weergave van het principe van de Luminex®. Een uniek gekleurd nanobolletje fungeert als drager voor een antilichaam. Na specifieke binding van een pathogeen aan het antilichaam gevolgd door binding van het conjugaat met een fluorescent label wordt het mengsel langs twee lasers geleid. Die kijken welk bolletje voorbijkomt en of er op dat bolletje een fluorescent signaal van het conjugaat aanwezig is; een maat voor de aanwezigheid van het pathogeen.

de zgn. dipstick test. Deze test lijkt sprekend op de welbekende zwangerschapstest waarbij het verschijnen van een gekleurde lijn of stip uitsluitend geeft over goed of slecht nieuws. Beide testen zijn dan ook gebaseerd op hetzelfde, gepatenteerde principe, de zogenaamde 'lateral flow' (zie figuur 2). Een vloeistof met daarin de aan te tonen stof (zwangerschapshormoon of virus) wordt op een papieren strip gebracht. Op de plaats waar de vloeistof op de strip gebracht wordt komt het in aanraking met een voor de stof specifiek antilichaam, gekoppeld aan goudbolletjes. Het virus bindt aan het antilichaam en vormt een complex. Door capillaire werking zal het vocht met daarin het complex zich door de strip verplaatsten. Hierbij passeert het een lijn van antilichamen ook gericht tegen het virus. Het complex van virus met antilichaam en goudbolletjes blijft dan als het ware hangen op de lijn. Hierbij neemt de plaatselijke concentratie van goudbolletjes zodanig toe dat ze uiteindelijk als een lijn zichtbaar worden. Een positieve controlelijn (die altijd moet verschijnen) is in de test ingebouwd. Uitvoering van een dergelijke test duurt in de praktijk niet langer dan vijftien minuten zonder dat er ingewikkelde apparatuur nodig is. Terecht dat dit type test ook wel snelle veldtest genoemd wordt.

Een groot nadeel is echter hun prijs. Met vijf tot zeven euro per test zijn ze vele malen duurder dan een standaard DAS-ELISA test. De hoge prijs, vooral veroorzaakt door hoge productiekosten, staat grootschaliger toepassing in de weg. De afzet blijft daarom beperkt en rechtvaardigt geen investeringen in goedkopere productiemethoden.

Simplex vs. multiplex detectie

Een van de kenmerken van bovenstaande technieken is dat steeds een enkel pathogeen per test wordt gedetecteerd. Een multiplex detectie waarbij verschillende pathogenen in een en dezelfde test worden aangetoond wordt binnen het ELISA-format wel toegepast maar heeft nog de nodige haken en ogen. Met name de gevoeligheid neemt af in vergelijking met de standaard ELISA. De introductie van een nieuwe techniek, de Luminex[®] biedt echter nieuwe perspectieven op het gebied van serologische multiplex detectie. De basis van de Luminex[®] technologie vormen speciale nanobolletjes. Door toevoeging van heel speciale kleurstoffen tijdens de productie van de nanobolletjes worden tot wel honderd verschillende typen bolletjes gemaakt. Deze kunnen door een speciale laser van elkaar onderscheiden worden. Voor Luminex[®] worden bestaande antilichamen gekoppeld aan deze nanobolletjes, één bepaald antiserum aan één bepaald type (=kleur) nanobolletje. De bolletjes met daaraan gekoppeld de antilichamen, worden gemengd met bijvoorbeeld plantsap waarin het te detecteren pathogeen voorkomt. Het pathogeen bindt dan aan het antilichaam. (zie figuur 3). Vervolgens worden specifieke antilichamen met een fluorescent label (het conjugaat) aan het mengsel toegevoegd die weer aan het pathogeen binden. Het principe van de Luminex[®] is daarmee gelijk aan DAS-ELISA, alleen fungeert hier het nanobolletje als vaste drager en niet een plastic putje van een ELISA plaat. Een bijkomend voordeel is ook dat de bolletjes zo klein zijn dat ze in oplossing blijven. Daarmee

wordt het oppervlak waarop het pathogeen kan binden enorm vergroot.

Detectie van het pathogeen vindt uiteindelijk plaats door de vloeistofstroom via een dunne buis langs twee lasers te leiden. Een laser kijkt naar de kleur van het bolletje dat langskomt. Uit de kleur van het nanobolletje volgt welk pathogeen aan dat bolletje gebonden kan worden. De tweede laser bekijkt of er een fluorescent signaal van het conjugaat op het bolletje aanwezig is. Zo ja dan is daarmee de aanwezigheid van het pathogeen aangetoond. Tenslotte kan uit het aantal bolletjes met een positief fluorescentie signaal ook nog eens de hoeveelheid pathogeen afgeleid worden.

De antilichamen die voor Luminex[®] worden gebruikt zijn dezelfde als degenen die in ELISA gebruikt worden. Dit maakt niet alleen dat er geen nieuwe antilichamen voor deze techniek nodig zijn maar ook dat de specificiteit van beide methoden vergelijkbaar is. De meeste voordelen die voor ELISA gelden, gelden ook voor Luminex[®]. De monsterbereiding voor de Luminex[®] is identiek aan die voor ELISA en ook de logistiek van beide detectiemethoden is vrijwel gelijk. De Luminex[®] is eveneens gemakkelijk te automatiseren en de gegevensverwerking kan individueel aangepast worden. Het grootste voordeel van de Luminex[®] ten opzichte van ELISA is dat de techniek vele malen sneller is (binnen een uur zijn de resultaten bekend) en dat er op de aanwezigheid van meerdere pathogenen tegelijk in hetzelfde plantsap getoetst kan worden. Een echte multiplex test dus. De kosten van een Luminex[®] test zijn weliswaar op dit moment nog iets hoger dan die van ELISA maar nog steeds

ARTIKEL

aanzienlijk lager dan die van een moleculair biologische test.

De Luminex® wordt binnen de plantaardige sector momenteel vooral nog op onderzoeksniveau toegepast. Op laboratoriumschaal is het inmiddels mogelijk gebleken om vijf verschillende pathogenen van aardappel, zowel virus als bacterie, tegelijkertijd aan te tonen (zie figuur 3).

In deze test werden dus vijf verschillende nanobolletjes, elk gecoat met een eigen specifiek antiserum gelijktijdig met de vijf verschillende

conjugaten geïncubeerd in zieksap van aardappelschillextracten. Na een incubatie van een uur en een korte wasstap werd het sap doorgemeten op de Luminex machine.

Momenteel wordt er hard gewerkt aan de ontwikkeling van een Luminex® kit die voor de praktijk bruikbaar zal zijn. Diverse partijen hebben al serieus belangstelling getoond. Deze kit zal vooral gericht zijn op de gelijktijdige detectie van verschillende aardappelvirussen in plantextracten.

Ter afsluiting

Serologische detectie van virussen en bacteriën heeft zich de afgelopen decennia bewezen als goedkoop, robuust en betrouwbaar. Door de zeer snelle ontwikkelingen de afgelopen jaren op het gebied van moleculaire detectietechnologieën, waarbij vooral veel aandacht uitging naar vergroting van de gevoeligheid, was volgens sommigen de serologische detectie eigenlijk afgeschreven. Het bovenstaande heeft wel duidelijk gemaakt dat er ook voor de serologische detectie van virussen en bacteriën nog volop nieuwe mogelijkheden en kansen liggen.