

## LA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

Yuliet Franco Cardoza

*Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, c.e.: mstefanova@inisav.cu*

### INTRODUCCIÓN

La microscopía de fluorescencia se basa en los mismos principios de óptica de la microscopía común, con diferencias en el manejo y el diseño relacionadas con la generación y transmisión de longitudes de onda adecuadas a los fluorocromos que se quieren visualizar, ya sean propios de la muestra o de la coloración utilizada [Anónimo 1, 2003].

Los procesos de excitación generalmente requieren longitudes de onda cortas en el UV cercano (lámpara de halógeno-cuarzo, arcos de mercurio, etc.). El objetivo que suele utilizarse es el de inmersión en aceite, ya que produce una mayor ampliación. El aceite de inmersión proporciona un medio óptico homogéneo al paso de la luz entre la preparación y el lente frontal del objetivo [Anónimo 3, 2003].

La técnica serológica de fluorescencia fue introducida en 1947 por Coons con el empleo de beta-antraceno, un compuesto fluorescente, conjugado con antisuero antineumocócico. Poco después un grupo de científicos empleó un antisuero conjugado con fluoresceína que permitía la identificación de los complejos inmunes de forma más eficaz. Es una técnica muy utilizada en el campo de la medicina para el diagnóstico de una gran variedad de padecimientos, entre los que se encuentran influenza, toxoplasma, identificación de anticuerpos anti-DNA y rabia, entre otros [Anónimo 2, 2003].

En la década del ochenta del pasado siglo se demostró su aplicabilidad en el diagnóstico de las bacterias fitopatógenas, y hoy es una de las técnicas más utilizadas en este campo.

### FUNDAMENTO, VENTAJAS, VARIANTES Y USO DE LA TÉCNICA DE INMUNOFUORESCENCIA

El fundamento de la técnica radica en la capacidad que muestran algunos elementos o compuestos fluorescentes, denominados *fluorocromos*, en fijarse a los anticuerpos mediante un enlace químico estable que no puede romperse durante el curso de la reacción inmunológica. Se encuentran diversos ejemplos de fluorocromos naturales, como algunas vitaminas, esteroides, porfirinas, etc. Otros compuestos que fluorescen –rodamina, auramina, fluoresceína, colorantes de acridina– se utilizan en distintas técnicas de tinción, como la tinción de microorganismos ácido-resistentes con auramina-rodamina en muestras de tejido y esputo.

La inmunofluorescencia conjuga la observación de la morfología con la especificidad inmunológica, evidencia tanto los gérmenes vivos como los muertos y requiere solamente de pequeñas cantidades de antígeno (Ag), lo que permite evidenciar cantidades mínimas de Ag aun en un medio complejo de gérmenes no cultivables, así como investigar anticuerpos (Ac) con Ag difíciles de preparar. Además, empleando la técnica se pueden revelar Ac llamados *incompletos*, que no precipitan, no aglutinan y no fijan el complemento. La inmunofluorescencia permite identificar un Ag con la ayuda de un inmunosuero conocido e investigar y titular un Ac con la ayuda de un Ag conocido.

Existen dos formas principales de inmunofluorescencia: directa e indirecta. En la variante directa el Ag se fija directamente a un Ac homólogo conjugado previamente con un fitocromo. Por tanto, se requieren antisueros

marcados para cada bacteria [Klement *et al.*, 1990], lo que hace que el método, aunque es más específico, hoy sea menos utilizado.

Con la inmunofluorescencia indirecta (IFI) se logra poner en función un único antisuero marcado, común para cualquier Ag bacteriano que se logra mediante la inmunización de una cabra u oveja, con la inmunoglobulina de un conejo sano, de donde se obtiene un complejo inmunológico de Ac anti-inmunoglobulina de conejo. Este complejo se marca con fitocromo (FITC) y puede reaccionar por tanto con cualquier Ac de conejo como si se tratase de un Ag.

La observación al microscopio de fluorescencia puede efectuarse sobre un portaobjeto diseñado especialmente para esta técnica o bien sobre una membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  sobre la cual se ha fijado la bacteria y que se coloca en un portaobjeto común que sirve de soporte [Brlansky, 1990].

También se conoce el método de la inmunofluorescencia de tinción de colonias para la detección sensible y cuantitativa de bacterias cultivables. Está basado en una combinación de aislamiento en placas con serología para el reconocimiento de colonias específicas. Los antisueros empleados por esta técnica son marcados por lo general con fluorocromo, lo que permite la identificación de las colonias específicas a través de la observación en un microscopio de fluorescencia.

Mundialmente la inmunofluorescencia, en su variante indirecta, es la técnica serológica utilizada con más frecuencia para el diagnóstico de bacterias fitopatógenas debido a su rapidez y sensibilidad [Van Vuurde *et al.*, 1983; Van Vuurde, 1985; Klement *et al.*, 1990], y ha sido estandarizada para detectar diversas bacterias en semillas gámicas [Malin and Roth, 1983; Van Vuurde *et al.*, 1983; Trigalet and Bidaud, 1978; Van Vuurde *et al.*, 1983] y el diagnóstico de infecciones latentes y caracterización serológica de subespecies de *Erwinia carotovora* en tubérculos de papa [Gorris *et al.*, 1994; Alarcón *et al.*, 1995], entre otros. Igualmente constituye el método más fiable para el diagnóstico de infecciones de *Ralstonia solanacearum* y *Clavibacter michiganensis* pv. *sepedonicus* latentes en tubérculos de papa [De Boer y Copeman, 1980; Miller, 1984], con límites de detección de  $10^3$ - $10^4$  cél./mL de precipitado de extracto de papa [Janse, 1988; Caruso *et al.*, 1998; Seal, 1998].

## APLICACIÓN DE LA INMUNOFLUORESCENCIA EN EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS EN CUBA

La inmunofluorescencia ha adquirido una gran aceptación para el diagnóstico de un gran número de bacterias. Es el método serológico más utilizado por el servicio de cuarentena en Cuba para la detección de patógenos bacterianos cuarentenados. Está incluida en los esquemas de trabajo de la Comunidad Económica Europea para *Ralstonia solanacearum* [EPPO, 1997] y en el Protocolo del Servicio de Protección de Plantas de Canadá para el diagnóstico de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* [De Boer y Mc Kenzie, 1996], que forma parte del sistema diagnóstico de ambas bacterias en semillas de papa importadas en Cuba.

El estudio de la técnica aplicada a análisis de papa a gran escala confirma su sensibilidad para detectar alrededor de  $10^3$  a  $10^4$  ufc/mL de pellet resuspendido, con solamente 1,52% de reacciones falso positivas que no constituyen un obstáculo para el diagnóstico. La técnica permite el análisis de 20 muestras por día, estadía que se ajusta bastante a la exigencia de un análisis cuarentenario confiable y rápido [Albornoz *et al.*, 2004]. Con anterioridad, Stefanova (1998) había señalado que fue posible diagnosticar con la IFI las poblaciones de *R. solanacearum* de  $10^5$  ufc/mL en ciento por ciento de los tubérculos de papa contaminados.

En el caso de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, bacteria igualmente cuarentenada en Cuba, según los datos expuestos en la estandarización de la IFI para la detección del patógeno en semillas de tomate [Pérez *et al.*, 2004], es posible con la técnica diagnosticar la presencia de hasta 0,2% de infección en aproximadamente diez mil semillas en 5 g de muestra. Dicho de otra forma: la IFI permite la detección de *P.s. tomato* en lotes de semillas de tomate donde existe entre 0,2-0,1% de semillas infectadas para un nivel de detección de  $10^3$ - $10^4$  ufc/mL. El nivel bajo de contaminación por esta bacteria presente en los lotes de semillas es un problema para la detección por métodos tradicionales, como es el ensayo de crecimiento en cámara húmeda, por lo que la introducción de esta técnica bajo el procedimiento establecido sin duda beneficia el análisis en frontera. Con la introducción de la IFI se hace también posible el análisis de las muestras de semillas de tomate que contienen poca cantidad, y se ajustan los parámetros de acuerdo con el peso de la muestra [Pérez, 2004].

Amat y Larrinaga (1992) pusieron a punto la IFI para *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en semillas de tomate artificialmente infectadas, y a continuación demostraron su uso práctico en semillas de producción. Con la estandarización de la IFI para el diagnóstico de *Pseudomonas cichorii* [Amat y García, 1997] en semillas de tomate y pimiento se logró detectar el patógeno hasta concentraciones de  $10^3$  ufc/mL en semillas artificialmente infectadas y muestras de producción procedentes de campos de las provincias de Pinar del Río y La Habana. La eficacia de la técnica superó el recobrado de la bacteria en el medio de cultivo KB enmendado con 300 ppm de oxacilina sódica.

Los parámetros del método ajustados para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas de tomate [Miguel *et al.*, 2000] señalaron la capacidad de detección del patógeno hasta el nivel de 1% de infección en las muestras. La siembra en el medio semiselectivo KBT [Dhavantari, 1987; Chaveau, 1992] en este caso se hace necesaria como prueba complementaria del diagnóstico debido a la sensibilidad (0,1%) y el escaso crecimiento de saprófitos.

Con las estandarizaciones anteriores se completa, mediante un PNO implantado en el Laboratorio Central de Cuarentena Vegetal, un paquete tecnológico de diagnóstico de las bacterias que afectan al cultivo de tomate y que se transmiten por semilla. Para ello se emplea un método único de extracción [Pérez *et al.*, 2004].

La IFI se considera un método de diagnóstico adecuado para detectar *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, agente causal del raquitismo de los retoños de caña de azúcar [Pazos *et al.*, 1988]. Mediante centrifugación a 14 000 g durante 30 min los autores lograron detectar la presencia de ese patógeno en el jugo de plantas enfermas y estimar concentraciones de  $4 \times 10^8$  cél./mL.

Con resultados satisfactorios para detectar concentraciones entre  $10^3$  y  $10^4$  cél./g de semilla de col y cebolla se recomienda la IFI para la detección de *X. c.* pv. *campestris* y *X. c.* pv. *allicola* respectivamente [Amat *et al.*, 1994].

## AVANCES EN LA APLICACIÓN DE LA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

En el transcurso de la última década, la microscopía de fluorescencia convencional aprovechó el aumento de la memoria y la velocidad de procesamiento de las computadoras. Esto, junto al desarrollo de sistemas

de registro digital de imágenes de alta calidad, de fuentes de iluminación láser potentes y estables, de sistemas ópticos corregidos y de nuevas moléculas fluorescentes capaces de marcar procesos celulares específicos, ha dado lugar a novedosas técnicas como la Microscopía de Desconvolución Digital (MDD), la Microscopía Láser Confocal (MLC) y la Microscopía de Excitación Bifotónica (M-2F). Estos nuevos procedimientos permiten obtener imágenes tridimensionales de procesos y de la distribución de moléculas específicas en células vivas por medio de la utilización de técnicas no invasivas.

Otra aplicación importante de la microscopía de fluorescencia es la medición de la concentración intracelular y de los cambios que sufre como consecuencia de estímulos de algunos iones (moléculas con carga eléctrica), como el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), el ión hidrógeno ( $\text{H}^+$ ), el cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), el sodio ( $\text{Na}^+$ ) y el potasio ( $\text{K}^+$ ). Un ejemplo es el uso de sustancias que actúan como indicadores fluorescentes de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (el Quin-2 y el Fura-2). Ambas son capaces de unir fuertemente al ión  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando están libres de  $\text{Ca}^{2+}$  se excitan a longitudes de onda ligeramente más largas que cuando se hallan unidas al  $\text{Ca}^{2+}$ . Al medir la proporción de intensidad de la fluorescencia en las dos longitudes de onda de excitación, es posible determinar qué proporción de la concentración del indicador libre corresponde al indicador que se ha unido al  $\text{Ca}^{2+}$ . A partir de esto es posible medir con precisión la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular libre y de sus variaciones en función del tiempo [Shotton, 1993].

La observación de sustancias fluorescentes mediante el microscopio óptico, junto a los avances tecnológicos de los microscopios y de las computadoras, han dotado a los biólogos de procedimientos que permiten estudiar cada vez con más detalles y precisión la distribución en el espacio y en el tiempo de componentes celulares, lo que complementa y amplía de modo espectacular la información proporcionada por los métodos tradicionales de microscopía óptica y electrónica. Estos avances marcan la nueva era de la microscopía de fluorescencia [Adur *et al.*, 2001].

## REFERENCIAS

- Adur, J. F.; F. D. Balducci; J. C. García; J. F. Vilá; Ma. Fernanda Izaguirre; V. H. Casco: «Observación tridimensional. La nueva era en la microscopía de fluorescencia», *Ciencia Hoy*, 11 (64):22-31, 2001.
- Alarcón, B.; María Teresa Gorris; M. Cambra; María M. López: «Serological Characterization of Potato Isolates of *Erwinia carotovora*

- subsp. atroseptica* and *subsp. carotovora* Using Polyclonal and Monoclonal Antibodies», *Journal of Applied Bacteriology*, 79:592-602, 1995.
- Albornoz, Alicia; Marusia Stefanova; A. García; Irina Pérez: «Aplicación y evaluación de técnicas de diagnóstico para el análisis de patógenos bacterianos cuarentenados en semillas de papa». Informe técnico presentado para premio MINAGRI, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, La Habana, 2004.
- Amat, Zenaida; María L. Larrinaga: «Utilización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta en la detección de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en semillas de tomate y pimiento», Congreso Biotecnología Habana 92, La Habana, junio de 1992.
- Amat, Zenaida; Gloria González; Ana L. Echemendía; Caridad Font: «Diagnóstico de enfermedades bacterianas y virales en semillas de cultivos hortícolas», IX Forum de Ciencia y Técnica de Base, INISAV, La Habana, 1994.
- Amat, Zenaida; A. García: «Utilización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta en la detección de *Pseudomonas cichorii* (Swingle) Stapp en semillas de tomate y pimiento», *Fitosanidad*, 1(1-4):4-9, 1997.
- Anónimo1: «Citología y morfología de bacterias», <http://bilbo.edu.uy/~microbio/morfologia.html#cg> (consultado en octubre del 2003).
- Anónimo 2: «Inmunofluorescencia», <http://salud.edomexico.gob.mx/html/article.php?sid=205> (consultado en noviembre del 2003).
- Anónimo3: «Observación de los microorganismos: el microscopio, preparación y examen de muestras», <http://edicionmicro.usal.es/web/educativo/micro2/tema02.html#anchor69742> (consultado en noviembre del 2003).
- Bransky, R. H.; R. F. Lee; E. L. Civerolo: «Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* and *X. citrui* Using Membrane Entrapment Immunofluorescence», *Plant Disease*, 74: 836-868, 1990.
- Caruso, P.; P. Llop; J. L. Palomo; P. García; C. Morente; M. M. López: «Evaluation of Methods for Detection of Potato Seed Contamination by *Ralstonia solanacearum*», *Bacterial Wilt Disease Molecular and Ecological Aspects*, Springer-Verlag, Berlín, 1998.
- Chaveau, F. J.: «*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: Test Methods for Tomato Seeds», *Bulletin EPPO* 22(2): 219-224, 1992.
- De Boer, S. H.; R. J. Copeman: «Bacterial Ring Rot Testing with the Indirect Fluorescent Antibody Staining Procedure», *American Potato Journal*, 57:457-465, 1980.
- De Boer, S. H.; R. McKenzie: «Protocol for the Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, the Bacterial Ring Rot Pathogen in Potato», Version 1.0, Review *January Agriculture*, Canadá, 1996.
- Dhavantari, B. N.: «Comparison of Selective Media for Isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*», *Phytopathology*, 77:1694, E.U., 1987.
- EPPO: «Método provisional de pruebas para el diagnóstico, detección e identificación de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith en las patatas», *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, Decisión 97/647/CE. P:0001-0025, 1997.
- Gorris, María Teresa; B. Alarcón; María M. López; M. Cambra: «Characterization of Monoclonal Antibodies Specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and Comparison of Serological Methods for Its Sensitive Detection on Potato Tubers», *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6):2076-2085, 1994.
- Janse, J. D.: «A Detection Method for *Pseudomonas solanacearum* in Symptomless Potato Tubers and Some Data on Its Sensitivity and Specificity», *Bulletin OEPP/EPPO*, Bulletin 18:343-351, 1988.
- Klement, Z.; K. Rudolph; D. Sands: *Methods in Phytopathology*, Akademiai, Kiadó, Budapest, Hungría, 1990.
- Malin, E. M.; E. L. Roth: «Indirect Immunofluorescent Staining for Detection and Identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in Naturally Infected Bean Seed», *Plant Disease*, 67:645-647, 1983.
- Miguel, A.; A. García; Zenaida Amat; Irina Pérez: «Detección en semillas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente causal del cáncer bacteriano del tomate», *Fitosanidad*, 4(1-2):9-13, 2000.
- Miller, H. J.: «Cross-Reactions of *Corynebacterium sepedonicum* Antisera with Soil Bacteria Associated with Potato Tubers», *Netherlands Journal Plant Pathology*, 90:23-25, 1984.
- Pazos, Victoria; F. Fernández; I. Lagomasino: Detección de *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* por inmunofluorescencia indirecta», *Protección Vegetal*, 3(1):9-12, 1988.
- Pérez, Irina: «Caracterización de cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y estandarización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta para su diagnóstico en semillas de tomate». Tesis en opción al título de Máster en Ciencias, Universidad Agraria de La Habana, Centro Nacional de Cuarentena Vegetal, 2004.
- Pérez, Irina; Marusia Stefanova; A. García; Loreta Larrinaga: «Aportes al conocimiento y el diagnóstico de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, patógeno bacteriano cuarentenado en Cuba». Informe técnico presentado para premio MINAGRI, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, La Habana, 2004.
- Seal, S.: «Molecular Methods for Detection and Discrimination of *Ralstonia solanacearum*», *Bacterial Wilt Disease. Molecular and Ecological Aspects*, Springer-Verlag, Berlín, 1998.
- Shotton, D.: «Electronic Light Microscopy», *Techniques in Modern Biomedical Microscopy*, Chapter 9, 1993.
- Stefanova, Marusia: «Current Situation of Bacterial Kilt (*Ralstonia solanacearum* Smith) in Cuba», *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*, Springer, INRA editions, París, 1998.
- Trigalet, A.; P. Bidaud: «Some Aspects of Epidemiology of Bean Halo Blight». Proc. 4<sup>th</sup> Int. Plant. Pathol. Bact. Angers, Francia, vol. II, 895, 27 agosto-2 septiembre de 1978.
- Van Vuurde, J. W.; G. W. Van den Bovenkamp; Y. Birribaum: «Immunofluorescence Microscopy and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay As Potential Routine Tests for the Detection of *Pseudomonas syringae* phaseolicola and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in Bean Seed», *Seed Sci. and Technol.*, 11:547-559, 1983.
- Van Vuurde, J. W.: «Detecting Seeds Borne Bacteria by Immunofluorescence». Proceedings of the Sixth International Conference on Plant pathogen Bacteria, Maryland, Jun. 11-16, 1985.