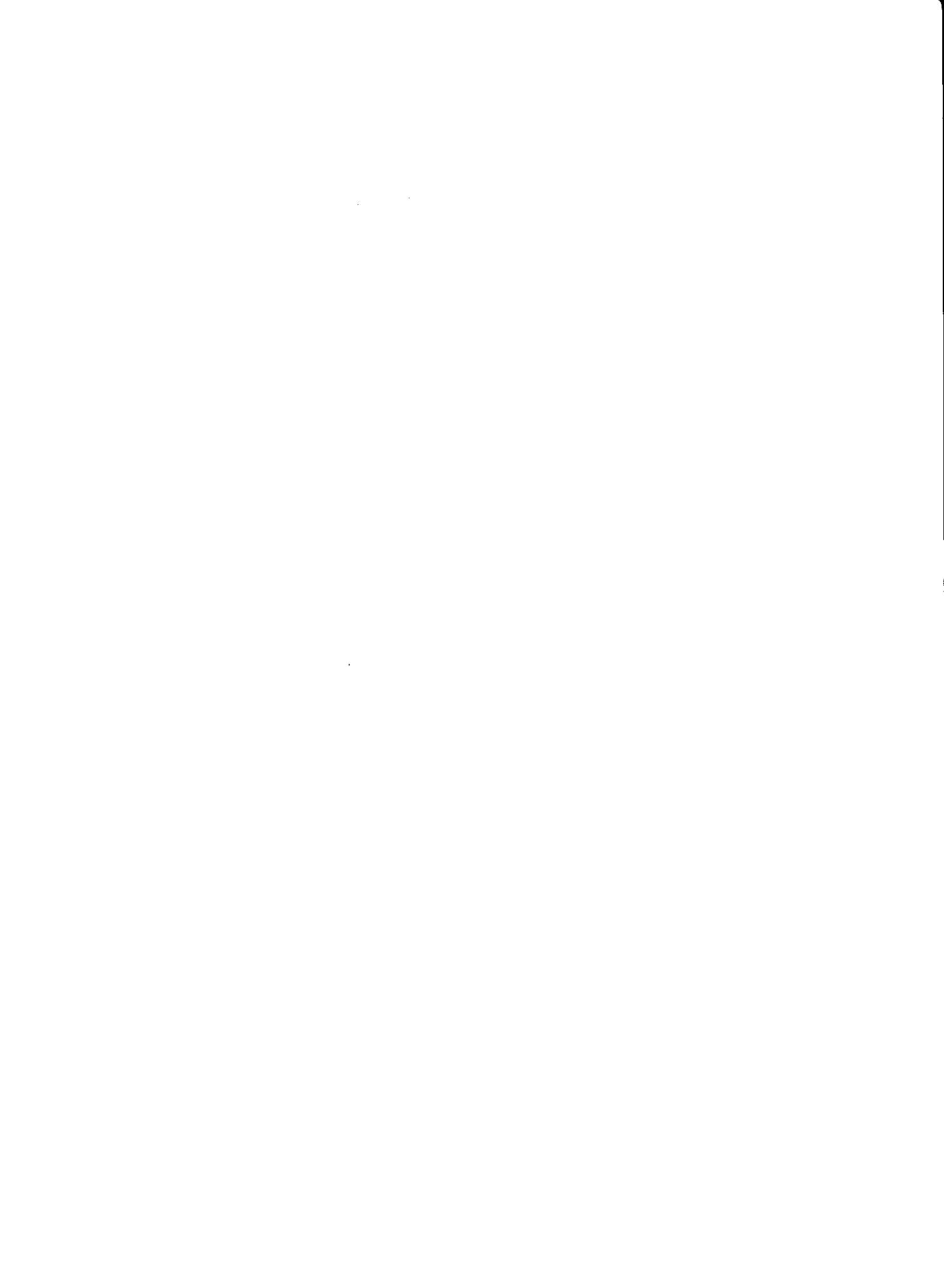




000699

IDENTIFICACION DE STREPTOMYCES SCABIES Y  
STREPTOMYCES ACIDISCABIES POR MEDIO DE ELISA



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades  
Departamento de Biología

IDENTIFICACION DE STREPTOMYCES SCABIES Y  
STREPTOMYCES ACIDISCABIES POR MEDIO DE ELISA

ISABEL ARIAS AZURDIA

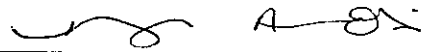
Trabajo de graduación presentado para optar al  
grado académico de Licenciatura en Biología




Guatemala

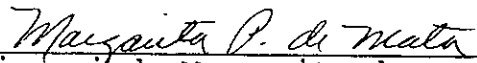
1995

Vo. Bo. :

(f)   
\_\_\_\_\_  
Doctora Margaret Dix  
Asesor

Tribunal:

f)   
\_\_\_\_\_  
Doctora Margaret Dix

(f)   
\_\_\_\_\_  
Licenciada Margarita de Mata

(f)   
\_\_\_\_\_  
Licenciada Ana María de Mérida

Fecha de aprobación: 31 de octubre de 1995

## AGRADECIMIENTOS

Aprovecho esta oportunidad para agradecer las contribuciones de las siguientes personas para la realización de este trabajo. Agradezco el apoyo de la doctora Rosemary Loria del departamento de Patología Vegetal de la Universidad de Cornell, no sólo por el tiempo y esfuerzo invertido en este proyecto sino también por su apoyo moral y financiero. Por parte de la Universidad del Valle de Guatemala, deseo reconocer a la doctora Margareth Dix, Licenciada Margarita de Mata y Licenciada Ana María de Mérida por formar parte del comité asesor del trabajo de graduación. Finalmente deseo agradecer la constante presencia de mi esposo Marco.

## RESUMEN

Los anticuerpos policlonales para la identificación de Streptomyces scabies y Streptomyces acidiscabies fueron producidos por medio de la inmunización de gallinas y posterior extracción de dichos anticuerpos presentes en la yema de los huevos. Los anticuerpos policlonales producidos contra S. acidiscabies fueron específicos y reaccionaron positivamente identificando las cepas de este patógeno. No se detectó reacción cruzada (falso-positiva) contra otras especies de Streptomyces evaluadas. Los anticuerpos policlonales producidos contra S. scabies no fueron específicos y presentaron reacciones cruzadas al evaluarlos contra S. acidiscabies y contra especies genéticamente distantes como Pseudomonas syringae y Erwinia carotovora.

Debido a la falta de especificidad de los anticuerpos policlonales para identificar S. scabies, se prosiguió con la preparación de anticuerpos monoclonales en ratones. Estos anticuerpos producidos contra S. scabies reaccionaron diagnosticando positivamente 14 de 16 cepas de S. scabies evaluados, incluyendo cepas que no se habían identificado correctamente con los métodos tradicionales. Se mostró posteriormente que dos cepas falso-negativas habían mutado en cultivo perdiendo patogenicidad. El procedimiento con el

anticuerpo monoclonal pudo diferenciar 32 cepas diferentes de Streptomyces patogénicas y no patogénicas, de 34 evaluadas, pudo diferenciar S. scabies de S. acidiscabies, además, P. syringae y E. carotovora.

Los anticuerpos monoclonales y policlonales desarrollados contra S. scabies y S. acidiscabies son útiles porque facilitan los estudios sobre la ecología y epidemiología de estos patógenos, causantes de la roña de la papa. Además, los resultados de esta investigación comprueban que las especies S. scabies y S. acidiscabies no son genéticamente cercanas, a pesar de las similitudes en plantas hospederas, tipos de lesiones y en la habilidad de producir el compuesto taxtomina.

## CONTENIDO

	Páginas
AGRADECIMIENTOS	VI
RESUMEN	VII
I. INTRODUCCION	1
II. METODOS	9
A. Selección de cepas de <u>Streptomyces</u> sp.	9
B. Evaluación de cepas	10
1. Morfología	10
2. Fisiología	10
3. Patogenicidad	11
C. Preparación de antígeno	12
D. Producción de anticuerpos policlonales en gallinas	13
E. Producción de anticuerpos policlonales y monoclonales en ratones	16
F. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos	20
III. RESULTADOS	21
IV. DISCUSION	39
V. CONCLUSIONES	46
VI. LITERATURA CITADA	48
APÉNDICES	
A. Estandarización de ELISA utilizando los anticuerpos policlonales de gallina	53

B. Purificación de anticuerpos policlonales crudos extraídos de huevos de gallina	55
C. Estandarización de ELISA utilizando los anticuerpos policlonales y monoclonales de ratón	58

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla	Página
3.1 Comparación de cepas por morfología y fisiología utilizando medios selectivos	22
3.2 Comparación de pruebas de diagnóstico para la detección de cepas patogénicas	23
3.3 Caracterización de cepas a partir de fisiología, morfología y patogenicidad	24
3.4 Absorbancias de los streptomycetos en presencia del anticuerpo monoclonal producido contra <u>S. scabie</u>	31
3.5 Evaluación de cepas con reacciones cruzadas en ELISA	34
Figuras	
1.1 Ciclo de la enfermedad de la roña común de la papa causada por <u>S. scabies</u>	3
2.1 Diagrama de flujo de la producción de anticuerpos policlonales de gallina	14
2.2 Diagrama de flujo de la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales de ratón	17
3.1 Especificidad de anticuerpos monoclonales hacia <u>S.scabies</u>	30

## I. INTRODUCCION

El género Streptomyces contiene un amplio número de especies. Según el manual de Bergey ( Williams et al., 1989), existen por lo menos 290 especies de estas bacterias que comunmente habitan el suelo. Los miembros de este género se clasifican basándose en los criterios establecidos por el Proyecto Internacional de Streptomicetos (ISP) que se encuentran descritos por Shirling y Gottlieb (1966). Las características utilizadas para la identificación a nivel de especie incluyen; forma de las cadenas de esporas, tipo de superficie de la espora, el color de la masa de micelio de la colonia, el color en el inverso de la colonia, utilización de azúcares, producción de melanina y otros pigmentos. Además, otras características secundarias han sido utilizadas para la identificación de especies de Streptomyces (Williams et al., 1983).

Streptomyces scabies es el agente causal más importante y de mayor distribución de la enfermedad denominada roña de la papa (Lambert y Loria, 1989) . Esta especie se tipifica por masa de micelio de color gris, esporas lisas con cadenas en forma de espiral, producción de melanina y utilización "in vitro" de los azúcares: glucosa, arabinosa, fructosa, manosa,

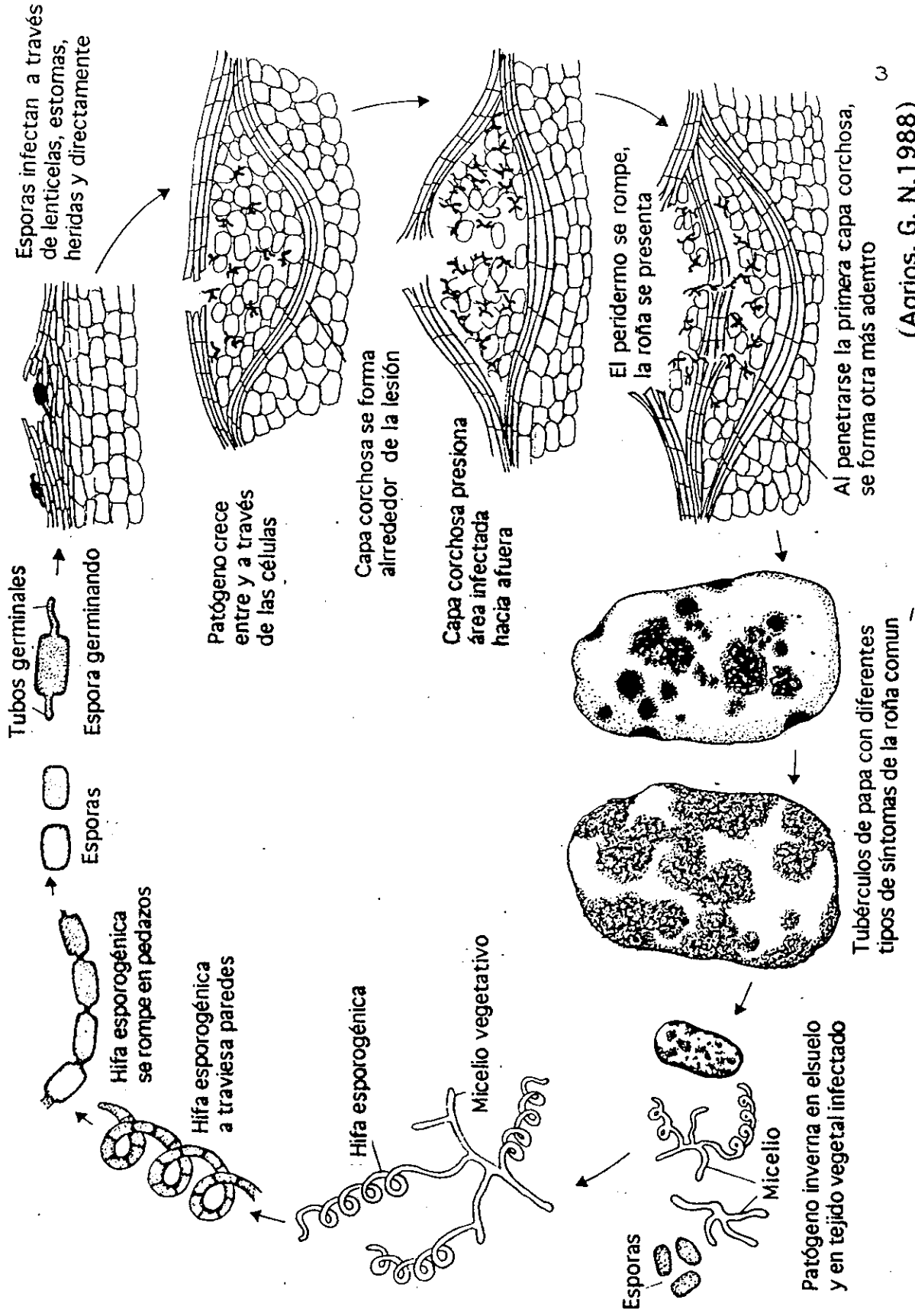
rafinosa, rhamnosa, sacarosa y xilosa. La enfermedad (ver el ciclo en figura 1.1) se presenta en todas las regiones donde se cultiva papa y puede causar serias pérdidas económicas debido a que no sólo reduce el valor estético del tubérculo, sino también el rendimiento. Lo anterior repercute en el mercadeo del producto fresco, procesado y el utilizado como semilla en la propagación. Los síntomas de esta enfermedad, que se muestran sobre los tubérculos de la papa, incluyen lesiones superficiales, elevadas o hundidas, usualmente conteniendo tejido corchoso (Hooker, 1981). La cepa S. scabies también infecta y causa síntomas semejantes en otros cultivos que producen tubérculos, tales como: rábano, nabo, rutabago y zanahoria.

Otras especies de Streptomyces han sido reportadas como productoras de síntomas similares a los de la roña de la papa (Corbaz, 1964; Kutzner, 1981; Manzer et al., 1977). Estas especies pueden ser diferenciadas de S. scabies basándose en una combinación de las características morfológicas y fisiológicas descritas anteriormente.

La otra especie probablemente más estudiada e importante, es Streptomyces acidiscabies (Lambert, y Loria, 1989) y provoca la enfermedad denominada "roña ácida" porque causa roña únicamente en suelos ácidos (Manzer, et al., 1977). La especie S. acidiscabies se caracteriza por tener una masa de

Figura 1.1

Ciclo de la enfermedad de la roña común de la papa causada por *Streptomyces scabies*.



micelio de color blanco o gris claro, esporas lisas en cadenas de forma flexada, no produce melanina pero produce un pigmento rojo bajo condiciones de pH ácido. Este patógeno utiliza todos los azúcares a excepción de rafinosa y crece a un pH tan ácido como 4.0 (Lambert y Loria, 1989); en contraste, S. scabies sólo puede crecer arriba de pH 5.0 (Lambert y Loria, 1989).

El tratamiento tradicional para el control de la enfermedad ha sido variar las condiciones de pH en el suelo. Sin embargo, las condiciones de pH para la sobrevivencia de S. scabies son diferentes respecto de S. acidiscabies, de ahí, la importancia de determinar cuál de los dos streptomicetos se encuentra afectando los campos de cultivo de papa.

Los streptomicetos son muy comunes en el suelo, existiendo de forma no parasítica, además, numerosas especies se encuentran como patógenos asociados a tejidos vegetales. Para la identificación de las especies es necesario utilizar una combinación de características morfológicas y fisiológicas que permitan distinguir a los patógenos, como S. scabies y S. acidiscabies de las especies no patogénicas que se encuentran comúnmente en el suelo e incluso colonizando lesiones causadas por la roña de la papa (Keinath, D. y Loria, 1989; Elesawy y Szabo, 1979; Vrugink, 1976). El procedimiento de identificación inicia con la extracción de la

bacteria patógena del tejido vegetal o de muestras de suelo, posteriormente, por medio de diluciones secuenciales en cajas petri se aíslan colonias individuales a partir de medios selectivos que estimulan la producción de melanina. La presencia de melanina permite identificar las colonias de streptomicetos melanoideos, dentro de los cuales se encuentra S. scabies. El siguiente paso es transferir las colonias hacia una serie de medios diferentes para poder caracterizar aspectos como: el tipo de cadenas de esporas, coloración de la colonia y los azúcares (glucosa, arabinosa, fructosa, manosa, rafinosa, sacarosa o xilosa) utilizados. Esta caracterización se debe realizar individualmente para cada colonia aislada de la caja petri inicial. La identificación definitiva se verifica usualmente comprobando su patogenicidad en papa en una prueba de invernadero o laboratorio.

Desafortunadamente, S. scabies no puede ser diferenciado de los otros streptomicetos utilizando una sola característica morfológica o fisiológica. Por lo tanto, es extremadamente difícil y toma mucho tiempo completar los procedimientos para la detección del patógeno y el diagnóstico de la enfermedad. La naturaleza de estas evaluaciones ha hecho prolongado e impráctico el estudio de la ecología y epidemiología de la enfermedad, donde se necesita desarrollar un monitoreo de la densidad de poblaciones de S. scabies o S. acidiscabies presentes en el campo durante un período de siembra. En

consecuencia, los métodos de diagnóstico actuales han dificultado el control de la enfermedad y poder desarrollar estrategias de manejo más eficientes. Por lo anterior, es necesario buscar nuevos métodos de diagnóstico que sean rápidos, seguros y de costo razonable.

Las técnicas serológicas son otra alternativa para la evaluación de streptomicetos. Estas técnicas han sido evaluadas para la identificación de especies de streptomicetos (Kirby y Rybicki, 1986; Moyer y Echandi, 1986; Bowman y Weinold, 1963). Los resultados de los estudios indicaron que los anticuerpos policlonales no fueron suficientemente específicos para diferenciar entre S. scabies de otros Streptomyces spp. (Bowman y Weinhold, 1963). Sin embargo, S. scabies y S. acidiscabies fueron encontrados serológicamente distintos, basado en la técnica de Ochterlony de difusión doble, aunque presentaron variedad de reacciones cruzadas con otros streptomicetos no patógenos, fue más lenta, subjetiva y no cuantitativa, por lo que se recomendó utilizar la técnica de ELISA en estudios taxonómicos (Kirby y Rybicki, 1986). ELISA es una técnica que permite evaluar rápidamente un número grande de muestras y detectar de forma cuantitativa.

Según Hu et al., 1985 y Hassl y Aspöck, 1988, el uso de anticuerpos policlonales de gallina, después de inyectar con una cantidad relativamente pequeña de inmunógeno, provee la

ventaja de una alta producción de anticuerpos concentrados en la yema de los huevos. En conejos se dificulta obtener una concentración adecuada de inmunógeno para lograr producción de anticuerpos, en especial en aplicaciones con virus. Otras ventajas son: bajo costo, fácil cosecha diaria de huevos inmunizados, aplicables en immuno-ensayos enzimáticos de doble sandwich (EIA) donde son combinados con anticuerpos de conejo y por último, al no ser de origen mamífero, se eliminan problemas de reacciones cruzadas en la presencia del factor reumatoideo.

En el caso de que los anticuerpos policlonales no sean suficientemente específicos, los anticuerpos monoclonales (McAbs) pueden ofrecer una mejor respuesta de especificidad debido a la presencia de un único determinante antigénico. Otras ventajas son: pueden aplicarse de forma más selectiva en técnicas inmunofluorescentes "in vitro" e "in situ" (McLaughlin, et al. 1989) y las líneas celulares que los producen pueden ser almacenadas y recultivadas, manteniendo una fuente permanente del anticuerpo seleccionado. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales no han sido utilizados para la identificación de S. scabies.

El objetivo general de este estudio es producir anticuerpos que tengan especificidad para S. scabies y S. acidiscabies, haciendo uso de anticuerpos policlonales

producidos en gallinas y anticuerpos monoclonales producidos en ratones, para su identificación por medio de ELISA indirecto. Los objetivos específicos son: 1) preparar una colección de streptomicetos, 2) producir anticuerpos con afinidad hacia S. scabies y S. acidiscabies, 3) determinar la especificidad de los anticuerpos a las dos especies anteriores evaluándolos en la presencia de otras especies patogénicas y no patogénicas de Streptomyces y 4) comparar y correlacionar las características morfológicas y fisiológicas respecto de la afinidad inmunológica como métodos de diagnóstico. De esta forma se espera facilitar el diagnóstico de la enfermedad de la roña de la papa.

## II. METODOS

### A. Selección de cepas de Streptomyces sp.

La cepa 84-01-34 de S. scabies y la cepa 84-01-110 de S. acidiscabies se seleccionaron para utilizar como inmunógenos, en la inoculación de gallinas para la producción de anticuerpos policlonales y la primera cepa, también en la inoculación de ratones para la producción de anticuerpos monoclonales. Además, se seleccionó un grupo de 49 cepas de otras especies de Streptomyces que representaban un rango variado de características morfológicas, fisiológicas (ver tabla 4.1) y de grado patogénico (ver tabla 4.2) para evaluar la especificidad de los anticuerpos desarrollados para la detección de S. scabies y S. acidiscabies.

Las cepas 84-01-34 y 84-01-110 fueron seleccionadas debido a que son las incluidas en la colección americana de cepas "tipo". Los tres números por cepa significan: el primero, el año del aislamiento; el segundo, es la clave internacional para streptomicetos y el tercero, número consecutivo de aislamientos durante ese año. Las cepas seleccionadas de streptomicetos fueron originalmente aisladas de lesiones de papa y posteriormente almacenadas en una

colección en el laboratorio en alícuotas de 1 ml y a 4° C, -20° C y -80° C. Para este estudio se extrajeron de la colección existente los aislamientos indicados en la tabla 4.3, de los años 84 al 87 y se prepararon aislamientos adicionales indicados en la misma tabla, del año 88 en adelante.

## B. Evaluación de cepas

1. Morfología. Se describieron las cepas a partir del tipo de cadena de esporas, color del micelio y color del sustrato, presentes sobre los siguientes medios: triptona-extracto de levadura (ISP2), agar inorgánico-almidón (ISP4) y agar glicerol-asparagina (ISP5).

2. Fisiología. a) Se evaluó la utilización de diferentes fuentes de carbono (glucosa, arabinosa, fructosa, manosa, rafinosa, ramnosa, sacarosa y xilosa) en medio sólido basal ISP2 (International Streptomyces Project)(DIFCO). b) Se evaluó la producción de melanina sobre medio líquido de extracto triptona-levadura (ISP1), agar peptona-hierro (ISP6) y agar-tirosina (ISP7). c) Se anotó la producción de otros pigmentos, aparte de melanina sobre los medios anteriores. d) Se investigó la sensibilidad al pH para su crecimiento.

3. Patogenicidad. Se determinó ésta en el invernadero inoculando una suspensión de cultivos de 48 hrs en medio líquido ISP1 o de 2 semanas en medio ISP2. La variedad de papa utilizada fue Chippewa, que es una variedad especialmente sensitiva a la roña. Se inocularon 10 ml en macetas conteniendo un tubérculo como semilla, tres réplicas por cepa y tres controles de agua estéril. Al crecer las plantas se cosecharon los tubérculos producidos después de 10-12 semanas y se anotó la presencia de lesiones.

Las cepas seleccionadas, con la información obtenida en los tres incisos anteriores, fueron evaluadas patogénicamente por medio de la prueba inmunológica desarrollada en esta investigación. Finalmente, se reevaluaron las características morfológicas, fisiológicas y de patogenicidad (en una prueba rápida "in vitro") para las cepas que obtuvieron reacciones cruzadas en la prueba de ELISA utilizando anticuerpos monoclonales. El objetivo de la reevaluación fue determinar las posibles causas de la reacción falso-postiva o falso-negativa, por ejemplo: error en la clasificación patógeno-no patógeno, error en la clasificación no-Streptomyces scabies, contaminación del cultivo con otra cepa o similitudes en morfología-fisiología-patogenicidad relacionadas con una verdadera reacción cruzada.

El procedimiento de identificación de patogenicidad "in vitro" fue el siguiente: papas previamente esterilizadas con clorox 10% se colocaron en rodajas, en condiciones estériles, sobre papel cromatográfico húmedo en una caja petri. Se inocularon las papas con las diferentes cepas, preparadas como se indicó anteriormente. Las cepas patogénicas se desarrollan sobre la papa produciendo una colonia debajo de la cual se presenta una lesión café, al producir el compuesto oxidante taxtomina. Las cepas no patogénicas, si crecen sobre la papa, mantienen la superficie clara y sin hundimientos o lesiones cafés.

### C. Preparación de antígeno

Las cepas de Streptomyces se desarrollaron sobre medio ISP2 (Difco) durante 12-14 días a 28° C. El micelio aéreo se raspó del agar para removerlo agregando agua esterilizada y vertiendo el producto sobre medio líquido ISP1. Los cultivos se incubaron a 28° C por 48 h en un agitador. El crecimiento de micelio se colectó por medio de centrifugación, se lavaron 3 veces con solución amortiguadora de fosfatos 10 mM conteniendo KCL 3mM, NaCl 140 mM, NaN3 0.01% y Tween 20 (0.05%), ajustado a un pH 7.4 (PBS-Tween). El concentrado obtenido de la centrifugación se resuspendió en 5 ml de PBS-Tween, se maceró y sonicó durante 2 min en intervalos de 30

segundos. La suspensión obtenida se almacenó en alícuotas de 1ml a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

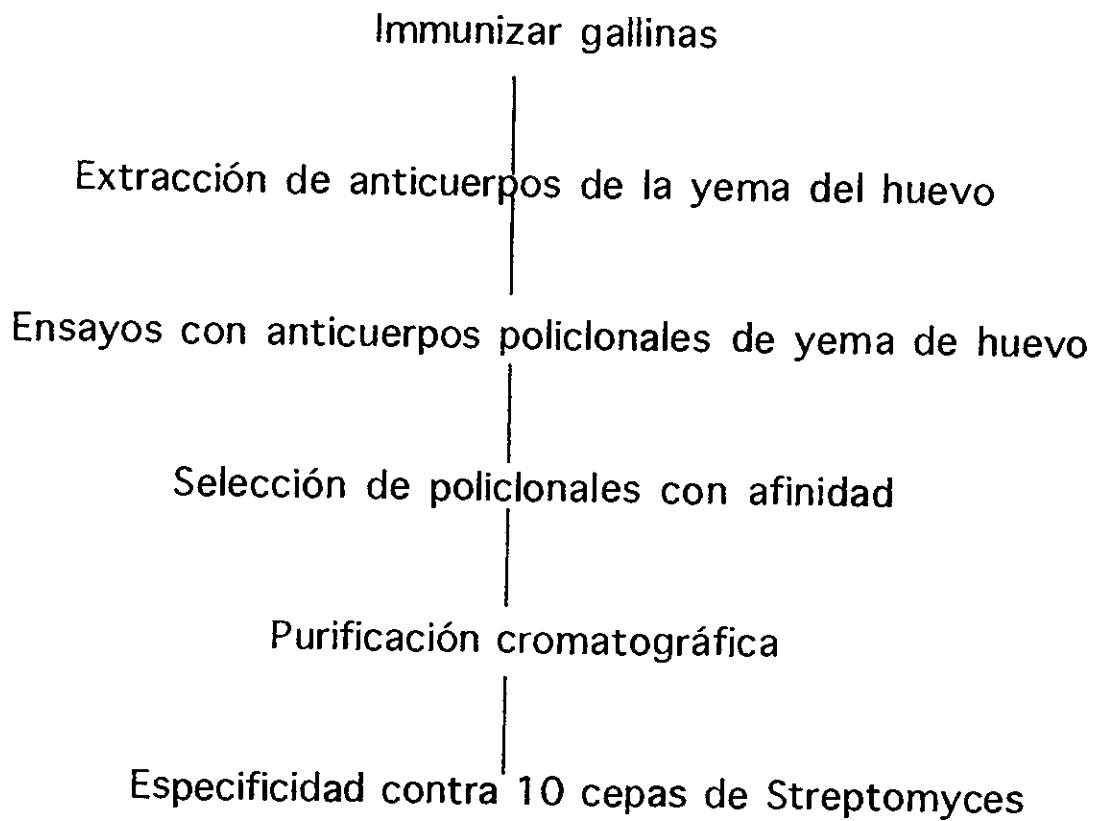
La concentración proteínica se determinó por el método de la reacción colorimétrica de Bradford (1976), (reactivo: Bradford, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif.). Se utilizaron una serie de 10 diluciones dobles iniciando a una razón inicial 1:20 (v/v), de la suspensión producida y una réplica de diluciones utilizando albúmina bovina como estándares de concentración de proteína, leyendo absorbancia espectrofotométricamente a 405 nm.

D. Producción de anticuerpos policlonales en gallinas (ver diagrama de flujo, figura 2.1)

Las cepas 84-01-34 y 84-01-110 seleccionadas para utilizarlas como inmunógeno se cultivaron como fue descrito anteriormente, excepto que las suspensiones de micelio raspado de la superficie se fijaron en glutaraldehído 2% antes de ser utilizado para inmunizar las gallinas (Allan y Kelman, 1977). Fueron inyectadas dos gallinas con preparación antigénica de cada cepa de Streptomyces. Se aplicaron 4 inyecciones intramusculares a intervalos semanales utilizando una suspensión de 1 mg de proteína. La suspensión de la primera inyección se emulsificó con adjuvante de Freund completo y las siguientes se emulsificaron con adjuvante de Freund

Figura 2.1

Diagrama de flujo de la producción de anticuerpos policlonales de gallina



incompleto. A continuación, se colectaron diariamente los huevos producidos por las gallinas inmunizadas iniciando el primer día de inyección (día 0) y continuando durante los siguientes 56 días posteriores a la inoculación. Las yemas de 4 huevos (4 días) fueron lavadas con agua estéril para remover clara adherida, agrupadas y almacenadas a  $-80^{\circ}$  C, para posteriormente extraer el antígeno presente en la parte protéica. El anticuerpo crudo se extrajo de la yema de los huevos utilizando el método de clarificación con cloroformo (Hu et al., 1985). Según este procedimiento, cada grupo de yemas de huevo es combinado con una solución amortiguadora equivolumétrica de 0.01 M PBS y mezclado con un volumen de cloroformo igual al de la mezcla. La emulsión formada se separa por medio de centrifugación a una velocidad baja y el sobrenadante con las proteínas solubles se almacena en glicerol (50%) a  $-20^{\circ}$  C. La inmunoglobulina principal presente en las yemas es IgG, por lo que esta preparación puede llamársele IgG crudo.

Los títulos de los anticuerpos crudos agrupados se determinaron por medio de ELISA indirecto (Voller, et al., 1970), estandarizando las condiciones óptimas para la prueba (ver apéndice A). Se seleccionaron los anticuerpos producidos para cada una de las dos especies de Streptomyces en estudio, con los títulos más altos y se prosiguió con su purificación. El método utilizado fue la precipitación de proteína en

solución sobresaturada de sulfato de amonio en PBS/Tween y luego dializando en Tris 10mM, pH 8.0 durante 48 h a 4° C. Posteriormente, se purificaron los anticuerpos IgG de las otras proteínas presentes separándolos por medio de una columna cromatográfica de celulosa a un gradiente de NaCl en 10 mM Tris (pH 8.0) (Hu et al., 1985) y fraccionando en 40 volúmenes de 5 ml (ver apéndice B). Se identificó la fracción con mayor valor proteico determinando la concentración a 280 nm de absorbancia y, luego, se comprobó si tenía apropiada actividad inmunológica por medio de ELISA indirecto.

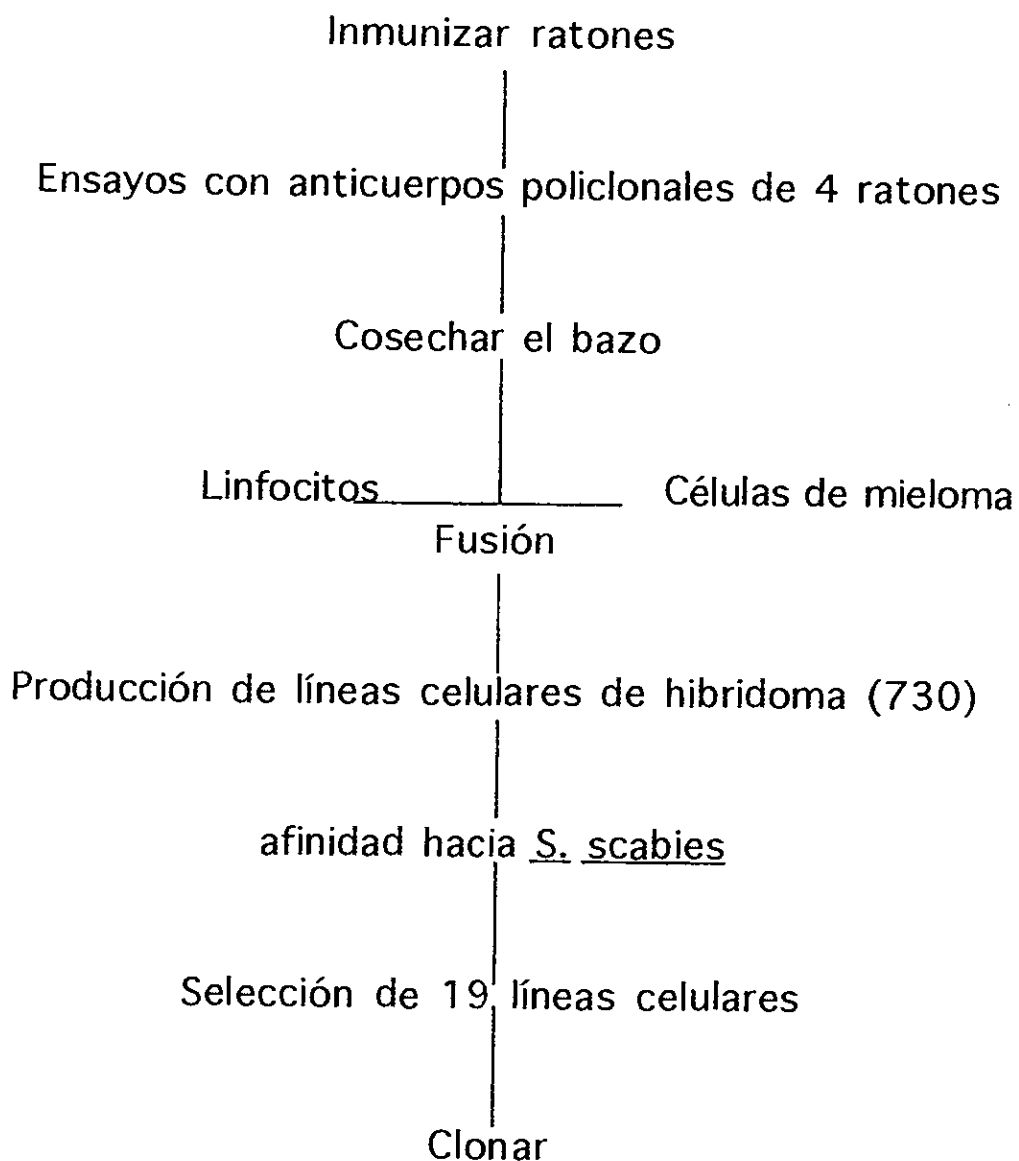
Los anticuerpos fueron aplicados para el análisis de especificidad en la presencia de otras especies de streptomicetos utilizando antígeno filtrado a .02  $\mu$ m.

E. Producción de anticuerpos policlonales y monoclonales en ratones (ver diagrama de flujo, figura 2.2)

La preparación antigénica de Streptomyces scabies, cepa 84-01-34, fue utilizada a una concentración de 1 $\mu$ g/ml para inmunizar 4 ratones Balb/c. Las inyecciones de inmunización continuaron a intervalos de 2 semanas durante 6 semanas. Cuatro ratones fueron utilizados para la inoculación, pero uno de los ratones murió al inicio de las inoculaciones y se continuó el proceso con los tres restantes. El desarrollo de la producción de anticuerpos policlonales en los ratones se

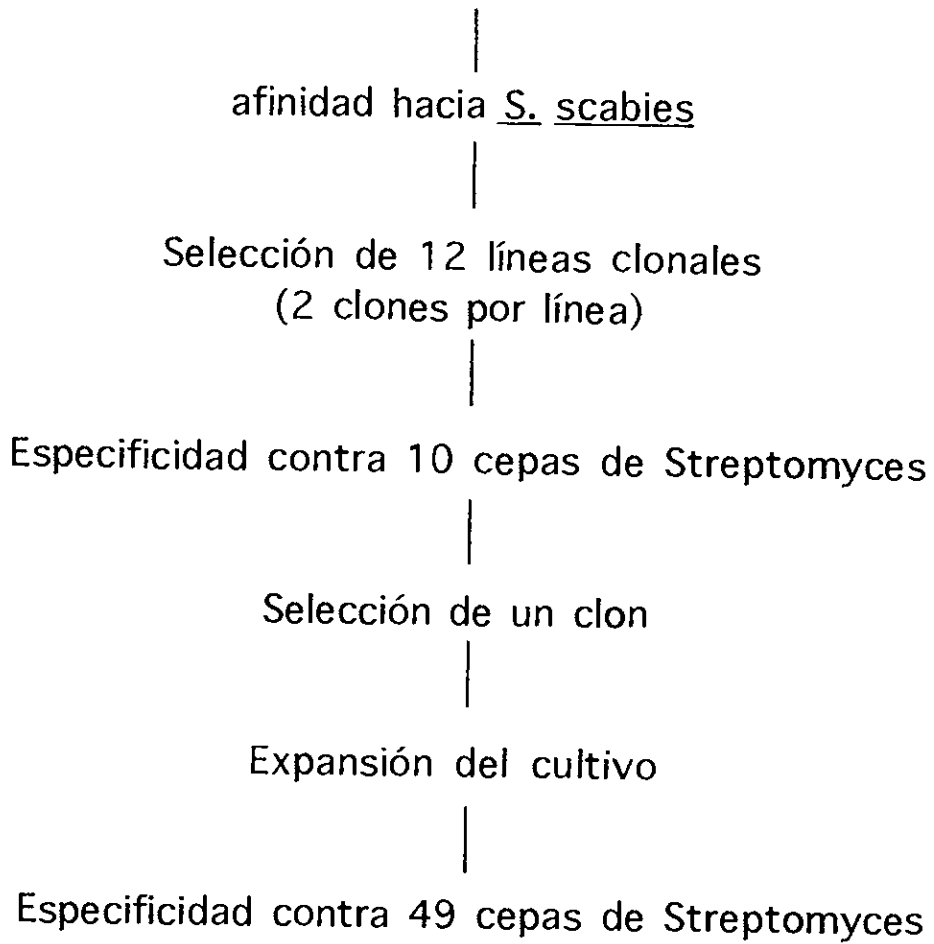
Figura 2.2

Diagrama de flujo de la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales de ratón



(cont.)

Figura 2.2 (cont.)



monitoreó periódicamente por medio de muestreos sanguíneos extraídos de la oreja o cola del animal y utilizando pruebas de ELISA (ver metodología en apéndice C). Los anticuerpos policlonales de gallina, producidos previamente en esta investigación, para detectar esta cepa de Streptomyces spp., se utilizaron como controles positivos y el suero normal de ratón como control negativo. Los títulos de ELISA obtenidos mostraron valores altos después de la tercera a cuarta semana de inyecciones de refuerzo. El ratón que tenía los valores más altos de anticuerpos policlonales fue sacrificado 3 días después de la última inyección, las células linfocíticas presentes en el bazo fueron extraídas y seguidamente fusionadas con células de mieloma. Las líneas celulares primarias de hibridoma fueron diluidas aproximadamente a una célula/pozo, se transfirieron a placas de cultivo de poliestireno de fondo plano para su crecimiento en una cámara con 10% de dióxido de carbono, 100% de humedad y 37° C. Los sobrenadantes de los cultivos celulares (100 µl) se cosecharon al obtener un buen crecimiento, aproximadamente 10-20 días después, y se evaluaron por medio de ELISA (ver apéndice B).

Las líneas celulares parentales de hibridomas que reaccionaron positivamente con la cepa S. scabies 84-01-34 fueron almacenadas en nitrógeno líquido, extrayendo alícuotas de 100µl del medio de cultivo. Los 100µl restantes en la placa de cultivo se utilizaron para clonar de nuevo por medio

de diluciones limitadas para obtener cultivos unicelulares puros. Por medio de ELISA se seleccionaron dos clones por cada línea celular y se repitió la clonación por tercera vez, para asegurar la estabilidad de la línea celular, antes de almacenar en nitrógeno líquido.

F. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos

La especificidad de los anticuerpos policlonales a las bacterias S. scabies y S. acidiscabies se determinó inicialmente por medio de pruebas de ELISA utilizando un grupo de diez cepas bacterianas, que incluyó: las 2 cepas (84-01-34 y 84-01-110) utilizadas para la producción de los anticuerpos, 1 cepa adicional por especie, 4 cepas de Streptomyces sp., 2 no patogénicas y 2 patogénicas y 2 bacterias gram negativas (Erwinia carotovora y Pseudomonas syringae). Por este método, se seleccionó una línea celular monoclonal con afinidad a la inmunoglobulina IgG para la detección de S. scabies (de 19 líneas celulares previamente aisladas). Para luego evaluar más ampliamente su especificidad, se utilizaron 49 cepas de Streptomyces spp. (ver figura 3.1) y se compararon con los resultados de la caracterización morfológica, fisiológica y patogénica previamente recopilada.

### III. RESULTADOS

Los aislamientos de cepas fueron caracterizados utilizando medios selectivos, los resultados se indican en la tabla 3.1 y se determinó su patogenicidad (ver tabla 3.2). Las pruebas de patogenicidad se condujeron en invernadero de acuerdo a métodos descritos por Loria y Kempter (1986). De esta forma, los medios selectivos permitieron identificar 7 cepas patogénicas de S. scabies, 5 cepas patogénicas de S. acidiscabies, 8 cepas patogénicas con características distintas a las dos anteriores y 29 cepas no patogénicas (ver tabla 3.3).

Mientras tanto, en el procedimiento de ELISA-indirecto durante la producción de anticuerpos policlonales en gallinas (ver diagrama de flujo, figura 2.1), los títulos con los valores más altos de absorbancia fueron durante la séptima semana posterior a la inoculación, para S. acidiscabies y durante la octava semana, para S. scabies. Por lo tanto, se seleccionó el grupo de yemas de huevo colectadas durante ese período para continuar la investigación. Sin embargo, se notó que los títulos de ELISA para S. acidiscabies fueron siempre más altos que los títulos de S. scabies.

Tabla 3.1.  
Comparación de cepas utilizando medios selectivos  
para la caracterización por morfología  
y fisiología

Cepas de <u>Streptomyces</u> spp.	Producción de melanina	Asimilación de carbono	Cadena de esporas
<u>S. scabies</u>	+	todos	espiral
<u>S. acidiscabies</u>	-	no rafinosa	flexada
Otras cepas* patogénicas	variable	variable	variable
Otras cepas* no patogénicas	variable	variable	variable

\* El conjunto de las tres características indicadas no puede ser igual al presente en S. scabies ó S. acidiscabies.

Tabla 3.2.

Comparación de pruebas de diagnóstico  
para la identificación de cepas patógenicas

Cepa	Prueba de invernadero	Prueba de ELISA	reevaluación "in vitro" y medios selectivos
<u>S. scabies</u>	7/7	5/7	5/7
<u>S. acidiscabies</u>	5/5	0/5	5/5
otras cepas patogénicas	8/8	2/8	8/8
otras cepas no patogénicas	0/29	7/29	5/23

\* Fracción: número superior = cepas identificadas como patogénicas

número inferior = total de cepas analizadas para patogenicidad

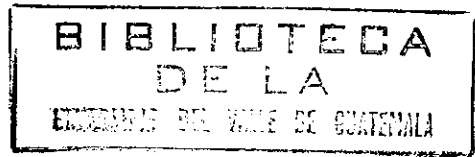
\* Reevaluación de características morfológicas, fisiológicas y de patogenicidad

Tabla 3.3  
 Caracterización de cepas a partir de morfología, fisiología  
 y patogenicidad en invernadero

Tipo de streptomiceto	Número	Cepa	Cadena de esporas	Melanina	no c	glu	arab	fruc	man	raf	ram	suc	xil	Patogenicidad en invernadero
<u>Streptomyces scabies</u> CONTROL	1	83-01-05	espiral	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	84-01-34	espiral	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	84-01-131	espiral	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	87-01-19	espiral	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	87-01-24	espiral	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	88-01-10	espiral	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	89-01-07	espiral	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<u>Streptomyces acidiscabies</u>	8	84-01-104	flexada	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	9	84-01-110	flexada	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	10	84-01-182	flexada	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	11	85-01-14	flexada	-	-	+	+	+	+	-	+	1	+	+
	12	84-01-45	flexada	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
streptomicetos patogénicos	13	83-01-10	espiral	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	14	84-01-08	espiral	-	-	+	+	+	+	+	+	1	+	+
	15	84-01-190	espiral	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	16	85-01-36	flexada/S*	-	-	+	+	+	+	-	+	1	+	+
	17	86-01-03	RA/S*	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	18	86-01-25	RA/S*	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	19	87-01-53	RA*	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20	88-01-06	flexada	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
streptomicetos no patogénicos	21	83-01-32	flexada	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	22	83-01-40	flexada	+	-	+	+	1	+	+	+	+	+	-

Continuación de la tabla 3.3

Tipo de streptomiceto	Número	Cepa	Cadena de esporas	Melanina	no c	Asimilación de carbono*					suc	xil	Patogenicidad
						glu	arab	fruc	man	raf			
	23	83-01-41	espiral	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	24	84-01-05	espiral	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	25	84-01-07	flexada	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
	26	84-01-14	flexada	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
	27	84-01-144	flexada	-	-	+	+	+	+	1	+	+	-
	28	84-01-222	flexada	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	29	84-01-29	flexada	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	30	84-01-71	espiral	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	31	84-01-95	espiral	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	32	85-01-12	flexada	-	-	+	+	+	+	1	+	+	-
	33	85-01-29	espiral	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	34	86-01-31	espiral	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	35	86-01-34	flexada	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
	36	87-01-06	espiral	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	37	87-01-34	espiral	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	38	87-01-47	espiral	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	39	87-01-55	espiral	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
	40	87-01-59	flexada	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	41	87-01-61	flexada	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
	42	87-01-62	flexada	-	-	+	+	+	+	1	+	+	-
	43	87-01-70	espiral	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
	44	87-01-80	espiral	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	45	88-01-26	flexada	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	46	88-01-27	espiral	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
	47	89-01-03	flexada	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-



Continuación de la tabla 3.3

Tipo de streptomiceto	Número	Cepa	Cadena de esporas	Melanina	no c	Asimilación de carbono*				Patogenicidad			
						glu	arab	fruc	man	raf	ram	suc	xil
	48	89-01-05	espiral	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
	49	89-01-08	espiral	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-

\* Número "1" : crecimiento en menor grado que el control de glucosa.

Abreviaciones: A) de fuentes de carbono: c = control neg., glu = glucosa, arab = arabinosa, fruc = fructosa, man = manosa, raf = rafinosa, ram = ramnosa, suc = sucrosa y xil = xilosa, B) cadenas de esporas: S= espiral, RA= Retinaculum-apertum (espirales abiertas)

Los anticuerpos policlonales no purificados presentan lecturas con falta de especificidad y con reacciones cruzadas, cuando se utiliza el antígeno no filtrado, inclusive en la presencia de bacterias como P. syringae y E. carotovora, las cuales, aunque son gram negativas, no pertenecen al género Streptomyces y están distantemente relacionadas. La utilización de los anticuerpos policlonales solubles en una preparación antigénica filtrada, reduce la reacción no específica y los anticuerpos producidos contra S. acidiscabies no tuvieron reacción de forma cruzada en la presencia de otras cepas de Streptomyces, Erwinia spp. o Pseudomonas spp.

Los anticuerpos policlonales con los títulos más altos para S. scabies y S. acidiscabies fueron purificados cromatográficamente, siguiendo el procedimiento indicado. Los anticuerpos purificados fueron evaluados a una dilución de 1:200 v/v. y a una concentración de 10 mg/ml de proteína antigénica en diluciones dobles y utilizando suero de gallina sana como control negativo. Al evaluar los anticuerpos contra un grupo de nueve cepas; las 2 cepas (84-01-34 y 84-01-110) utilizadas para la producción de los anticuerpos, 1 cepa adicional por especie, 3 cepas de Streptomyces sp. no patogénicas y las 2 bacterias gram negativas (Erwinia carotovora y Pseudomonas syringae), el anticuerpo policlonal preparado para la identificación de S. acidiscabies fue apropiado para ser utilizado en técnicas de detección. Los

valores de absorbancia fueron cercanos a (0.000 OD) para las bacterias no S. acidiscabies y todas las cepas de S. acidiscabies dieron valores de absorbancia de aproximadamente (.800 OD). Sin embargo, el anticuerpo policlonal preparado para la detección de S. scabies no fue específico, incluso en la presencia de otros géneros como Erwinia spp. y Pseudomonas spp, presentando reacciones cruzadas y no permitiendo su aplicación posterior.

Debido a la falta de especificidad de los anticuerpos policlonales de gallina para la detección de S. scabies, se procedió con la producción de anticuerpos monoclonales en ratones, lo cual se llevó a cabo como se describió anteriormente.

Las líneas monoclonales resultantes fueron un total de 752, representando 75% de las líneas inicialmente cultivadas, lo cual muestra un alto porcentaje de producción. Estas líneas fueron evaluadas utilizando únicamente S. scabies como antígeno, debido a que fue la cepa utilizada para la producción de estos anticuerpos. La evaluación mostró 19 líneas parentales primarias con algún nivel de afinidad para la cepa, y fueron clonadas de nuevo para asegurar su estabilidad en líneas celulares puras debido a que es posible que permanezca más de un célula por pocillo al utilizar el método de dilución para dividir las. Se evaluaron de nuevo y

se confirmaron 12 líneas clonales secundarias con afinidad hacia S. scabies. Las 12 líneas fueron evaluadas más detalladamente respecto de las 9 cepas patógenas y no patógenas descritas con anterioridad. Se obtuvo dos líneas clonales con altos títulos y especificidad, ya que no presentaron reacciones cruzadas en la presencia de P. syringae, E. carotovora o S. acidiscabies (ver diagrama de flujo, figura 2.2).

Se seleccionó una línea monoclonal con máxima actividad para evaluar posteriormente su especificidad contra las 49 cepas diferentes caracterizadas del género Streptomyces spp. (ver tabla 3.3). Los resultados espectrofotométricos mostraron ciertas reacciones cruzadas con otros streptomicetos (83-01-10, 84-01-190, 83-01-40, 83-01-41, 86-01-31, 87-01-06, 87-01-70, 87-01-80 y 89-01-08) y dos S. scabies no detectados (84-01-131 y 87-01-19) (ver figura 3.1 y tabla 3.4). El anticuerpo monoclonal mostró especificidad para S. scabies al no reaccionar en la presencia de las cinco cepas de S. acidiscabies evaluadas. Sumadas a las cepas patogénicas y no patogénicas, no presentó reacciones cruzadas en la presencia de 47 de las 49 cepas de streptomicetos estudiadas. Todas estas cepas presentaban también características morfológicas y/o fisiológicas que las distinguían de S. scabies y de S. acidiscabies (ver tabla 3.3).



Tabla 3.4

Absorbancias de los streptomicetos en presencia del anticuerpo monoclonal producido contra S. scabies

Tipo de Streptomiceto	Número*	Cepa	Absorbancia promedio (405 nm)
<u>S. scabies</u>	1	83-01-05	3.333
control	2	84-01-34	4.000
	3	84-01-131	0.083
	4	87-01-19	0.042
	5	87-01-24	2.208
	6	88-01-10	2.333
	7	89-01-07	4.000
<u>S. acidiscabies</u>	8	84-01-104	0.042
	9	84-01-110	0.042
	10	84-01-182	0.042
	11	84-01-45	0.000
	12	85-01-14	0.000
otros streptomicetos patogénicos	13	83-01-10	4.000
	14	84-01-08	0.083
	15	84-01-190	0.708
	16	85-01-36	0.167
	17	86-01-03	0.167
	18	86-01-25	0.042
	19	87-01-53	0.083
	20	88-01-06	0.200
otros streptomicetos no patogénicos	21	83-01-32	0.000
	22	83-01-40	2.167
	23	83-01-41	2.417
	24	84-01-05	0.021
	25	84-01-07	0.021
	26	84-01-14	0.021

Continuación de la Tabla 3.4

Tipo de Streptomiceto	Número*	Cepa	Absorbancia promedio (405 nm)
	27	84-01-144	0.021
	28	84-01-222	0.021
	29	84-01-29	0.021
	30	84-01-71	0.042
	31	84-01-95	0.000
	32	85-01-12	0.000
	33	85-01-29	0.000
	34	86-01-31	4.000
	35	86-01-34	0.250
	36	87-01-06	4.000
	37	87-01-34	0.250
	38	87-01-47	0.000
	39	87-01-55	0.000
	40	87-01-59	0.000
	41	87-01-61	0.000
	42	87-01-62	0.000
	43	87-01-70	2.200
	44	87-01-80	4.000
	45	88-01-26	0.083
	46	88-01-27	0.042
	47	89-01-03	0.125
	48	89-01-05	0.042
	49	89-01-08	4.000

\* números correspondientes en la gráfica 3.1

Hubo necesidad de caracterizar de nuevo y de reclasificar taxonómicamente las 11 cepas con reacciones falso-negativas o falso positivas. El análisis de la reevaluación de las dos cepas 84-01-131 y 87-01-19 falso-negativas y las 9 cepas (83-01-10, 84-01-190, 83-01-40, 83-01-41, 86-01-31, 87-01-06, 87-01-70, 87-01-80 y 89-01-08) falso-positivas, o sea con reacciones cruzadas, se observa en la tabla 3.5.

Se realizó una comparación de la información recopilada por medio de las diferentes pruebas de diagnóstico (tabla 3.5). Se evaluaron las pruebas de patogenicidad en invernadero, ELISA e "in vitro" (tabla 3.2), respecto de las reacciones cruzadas y las falso negativas obtenidas en la prueba de ELISA (figura 3.1 y tabla 3.4), además, respecto de las características morfológicas y fisiológicas de las cepas (tabla 3.3).

Las 7 cepas previamente caracterizada como no patogénicas (tabla 3.3) que se presentaron en la prueba de ELISA como "falso positivas" fueron: (83-01-40, 83-01-41, 86-01-31, 87-01-06, 87-01-70, 87-01-80, y 89-01-08,) (figura 3.1 y tabla 3.4). Al reevaluarlas se comprobó que 5 cepas (83-01-40, 83-01-41, 87-01-70, 87-01-80 y 89-01-08) eran en realidad patogénicas en la prueba "in vitro", al presentar el compuesto taxtomina que causa un color café sobre la rodaja de papa.

Tabla 3.5

Evaluación de cepas con reacciones cruzadas en ELISA

Tipo de streptomiceto	#	Cepa	Melanina	Asimilación de carbono*						Patogenicidad ELISA in vitro	Observaciones			
				no	c	glu	arab	fruc	man			raf	ram	sac
<u>Streptomyces scabies</u>	2	84-01-131	+	-	+	+	+	+	+	+	+	leve	Pérdida de patogenicidad, mutación comprobada	
	3	87-01-19	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	Pérdida de patogenicidad, mutación comprobada	
	13	83-01-10	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S. scabies, con pérdida de melanina
Streptomicetos patogénicos	15	84-01-190	-	-	+	+	-	+	1	+	+	leve	Falta de dilución de monoclonales	
	21	83-01-40	+	-	+	1	+	+	+	+	+	+	+	Reacción cruzada, patógeno no S. scabies
Streptomicetos no patogénicos	22	83-01-41	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S. scabies
	33	86-01-31	-	-	+	1	+	+	+	+	+	+	-	Pérdida de patogenicidad y melanina, mutación?
	35	87-01-06	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	S. scabies. Pérdida de patogenicidad, mutación?
	42	87-01-70	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S. scabies
	43	87-01-80	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S. scabies
	48	89-01-08	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S. scabies

\* números bajo columna "#" indican las cepas correspondientes en tabla 4.3 y 4.4  
 Número "1": crecimiento en menor grado que le control de glucosa.

Abreviaciones: A) de fuentes de carbono: c = control neg., glu = glucosa, arab = arabinosa, fruc = fructosa, man = manosa, raf = rafinosa, ram = ramnosa, sac = sacarosa y xil = xilosa, B) cadenas de esporas: S= espiral, RA= Retinaculum-apertum (espirales abiertas)

Se concluyó que 4 de ellas (a excepción de 83-01-40) eran S. scabies, ya que fueron consistentes con los otros caracteres morfológicos y fisiológicos de la especie.

El uso de la técnica de ELISA aplicando el anticuerpo monoclonal (ver figura 3.1 y tabla 3.4) y la prueba "in vitro" utilizando rodajas de papa (ver tabla 3.2) permitió detectar las cepas patogénicas anteriores, de S. scabies con baja virulencia (83-01-41, 86-01-31, 87-01-06, 87-01-70, 87-01-80 y 89-01-08), que no habían indicado anteriormente patogenicidad en el invernadero y por ello, no habían sido clasificadas como patogénicas.

Las 2 cepas restantes (86-01-31 y 87-01-06), listadas originalmente como no patógenas y aparentemente falso-positivas, podrían considerarse en realidad como S. scabies. Estas contienen las características morfológicas y fisiológicas de la especie. Aunque en la reevaluación se determinaron con falta de patogenicidad y la cepa 86-01-31 con falta de producción de melanina, la falta de patogenicidad y melanina las coloca en una situación comparable a las dos cepas de S. scabies (84-01-131 y 87-01-19), originalmente patogénicas, que no dieron reacción inmunológica. Se comprobó que las dos cepas originalmente patogénicas, presentaban posterior pérdida de virulencia y de producción de melanina. La cepa patogénica 83-01-10, que dio reacción positiva, estaba

clasificada erróneamente como otro patógeno únicamente por la falta de melanina. Aún con la falta de patogenicidad y melanina se pueden clasificar las cepas como S. scabies, ya que la falta de patogenicidad no excluye que sean de la misma especie (este caracter no se utiliza para aislar taxonómicamente una especie) y junto con melanina, ya se han comprobado la pérdida de estas habilidades en cultivo dentro de la misma especie. La pérdida de melanina y patogenicidad indican una posible mutación causada durante el repetido cultivo en almacenamiento. Se puede observar una relación entre la habilidad de patogenicidad, la producción de melanina y la presencia del determinante antigénico detectado por el anticuerpo monoclonal.

El análisis resultante deja 2 únicas cepas mostrando reacción cruzada (84-01-190 y 84-01-40). Una de las cuales, 84-01-190, probablemente fue causado por la utilización del sobrenadante del cultivo monoclonal sin dilución como fuente de anticuerpos durante el análisis de las 49 cepas. Al optimizar la prueba realizando diluciones de anticuerpo, como se realizó en apéndice A y B para las pruebas de ELISA policlonales, se eliminaría probablemente la lectura falso-positiva. El anticuerpo monoclonal se utilizó sin dilución ya que se recomienda un análisis preliminar con la solución concentrada para asegurar la detección de todas las cepas positivas y posteriormente optimizar la reacción. Esto

implica tiempo adicional de preparación de nuevos cultivos de cepas para utilizar como antígenos y producir más anticuerpos monoclonales provenientes de las líneas clonales en almacenamiento. También puede ser posible que la concentración de proteína determinada para esa cepa no hubiera estado comparable a la dilución calculada para las demás cepas. Sin embargo, otra posibilidad es escoger un umbral con la línea divisoria de identificación positiva arriba de la lectura obtenida por la cepa 84-01-190.

Como resultado final se obtuvo una reacción cruzada definitiva con la segunda cepa, 83-01-40, del total de 49 streptomicetos evaluados. El análisis inmunológico la detectó como patógeno, cuando anteriormente se encontraba como no patogénico. Sin embargo, en la reevaluación de sus características, se determinó que era otro patógeno, no S. scabies, con el mismo comportamiento de asimilación de fuentes de carbono, pero con otras características morfológicas y fisiológicas diferentes.

Por lo tanto se pueden reducir el número de pruebas de identificación de S. scabies con un rápido diagnóstico inmunológico reevaluando únicamente las cepas que presenten valores positivos en ELISA. Se elimina la evaluación tediosa de un gran número de otros streptomicetos por medio de seleccionar la cepa que presente una reacción inmunológica

positiva y evaluarla por un medio selectivo adicional, como un medio para identificar la coloración del cultivo esporulando o un medio que estimule producción de pigmentos específicos sensitivos al pH.

#### IV. DISCUSION

Los resultados obtenidos en esta investigación con los anticuerpos policlonales producidos en gallinas, concuerdan con estudios realizados anteriormente (Hu et al., 1985 y Hassl y Aspöck, 1988). Los anticuerpos policlonales elaborados para la detección de S. scabies no fueron suficientemente específicos para identificar la especie y se comportaron en una forma semejante a los anticuerpos policlonales producidos en el estudio realizado por Bowman y Weinhold (1963). Por el contrario, los anticuerpos policlonales para la detección de S. acidiscabies mostraron ser específicos, consistentemente con los resultados obtenidos por Moyer y Echandi (1986) donde presentaron la producción de anticuerpos policlonales específicos contra S. ipomea (especie afin a S. acidiscabies). Las especies S. acidiscabies y S. ipomea son consideradas comparables, siendo patógenos que causan enfermedad en la papa, basado en los análisis de homología de ADN entre las dos especies (Lambert, et al. 1991), e incluyendo, su mejor respuesta diferenciable a nivel inmunológico. Por lo anterior, no es sorprendente que se comporten con mayor semejanza entre ellas que respecto de S. scabies, cuya homología comparada con S. acidiscabies es de un 20%.

El anticuerpo monoclonal producido para la identificación de S. scabies y el anticuerpo policlonal de gallina producido contra los dos streptomicetos, se comportaron corroborando los hallazgos de McIntyre (1971). Con las pruebas de Ochterlony de doble difusión, S. scabies y S. acidiscabies fueron serológicamente distintos al no reaccionar de forma cruzada. En la presente investigación se obtuvo que el anticuerpo monoclonal elaborado versus S. scabies no presenta reacciones cruzadas al evaluarse contra las cepas de S. acidiscabies presentes, comprobando así, su especificidad. Por lo tanto, se asume que estas especies deben tener varios sitios antigénicos distintivos.

La investigación presentó resultados consistentes con los datos obtenidos en estudios de homología genética (King y Lawrence, 1991). En ellos se indica que S. scabies es una especie relativamente diversa y que se encuentra más cercanamente relacionada con especies de Streptomyces incluso, no patogénicas, que con la especie S. acidiscabies. Lo anterior explica la reacción cruzada que hubo con los dos aislamientos que no eran S. scabies. A pesar de que estas dos especies de Streptomyces causan síntomas semejantes y en tejidos vegetales similares (al infectar tubérculos de papa) son genéticamente distintas.

Las dos cepas de S. scabies que presentaron una reacción falso-negativa en la prueba de ELISA utilizando el anticuerpo monoclonal, fueron reevaluadas respecto de sus características morfológicas, fisiológicas y patogénicas y se mostró falta de producción de melanina y pérdida de patogenicidad. Lo anterior indica que posiblemente mutaron en cultivo, perdiendo estas dos habilidades. Las mutaciones de este tipo son comunes en Streptomyces (Lawrence et al., 1990) y pueden haberse perdido en las dos cepas, los genes que codifican el epítotope con afinidad al anticuerpo monoclonal producido. Se comprobó aquí y en el estudio de Lawrence et al. (1990) que las cepas son capaces de perder su patogenicidad y producción de melanina, además, las cepas que mutaron perdieron la capacidad de ser detectadas por la técnica de ELISA.

La patogenicidad en los steptomycetos está probablemente relacionada con la producción de la fitotoxina taxtomina, la cual se ha extraído y purificado de lesiones de roña de la papa, proveniente de diferentes especies y se ha comprobado que induce de nuevo los síntomas sin la presencia del patógeno, al aplicarla a rodajas de papa (Lawrence, et al. 1990). Lo anterior tiene implicaciones taxonómicas de la relación existente entre los genes biosintéticos responsables de patogenicidad, como los relacionados en la producción de taxtomina, que han sido intercambiados entre especies de Streptomyces patogénicas no relacionadas, como en el caso de

la especie patogénica (cepa 84-01-40) con reacción cruzada. Si se comprueba que la producción de taxtomina se presenta comúnmente entre todas las diferentes especies de Streptomyces patogénicos, el gen que codifica su biosíntesis podría ser utilizado en la técnica de sonda hibridizada de ADN. La transferencia de ADN ha sido comprobada en el caso de streptomicetos no parasíticos de suelo (Williams et al., 1983). La molécula de taxtomina es muy pequeña para permitir una adecuada respuesta inmunológica en la producción de anticuerpos específicos, lo que haría poco eficiente la elaboración de técnicas inmunológicas como ELISA.

La producción de melanina es utilizada frecuentemente como característica principal en el diagnóstico de Streptomyces extraídos del suelo y de material vegetal (Keinath y Loria, 1989; Elesay y Szabo, 1979). Sin embargo, la habilidad de producir melanina es altamente inestable en especies de Streptomyces, apareciendo frecuentemente mutaciones espontáneas (Lawrence, et al. 1990). Este comportamiento inestable convierte a la presencia de melanina en un parámetro poco confiable para ser utilizado como método de identificación, sin embargo, se continúa utilizando en la caracterización de S. scabies (Kutzner, 1979).

En conclusión, los anticuerpos producidos son adecuados en especificidad para su utilización en pruebas inmunológicas

de diagnóstico. De esta forma, se puede acelerar la investigación en el área de la dinámica de poblaciones de S. scabies y S. acidiscabies. Además, pueden ser aplicados cuantitativamente por medio de la técnica de blot de colonias (Hockenhull, 1979). Estos anticuerpos pueden ser útiles para el diagnóstico de la enfermedad de la roña de la papa común y para la roña de la papa en suelos ácidos, al permitir evaluar rápidamente, por medio de ELISA, las áreas de cultivo afectadas por las enfermedades causadas por cada patógeno. Los estudios de este tipo facilitarían la elaboración de recomendaciones para el manejo y control de las enfermedades monitoreando cada campo de cultivo, además facilitarían el control dependiendo de cada especie de streptomiceto presente. El tratamiento tradicional para S. scabies ha sido variar las condiciones de pH en el suelo, pero las condiciones de pH para Streptomyces acidiscabies son diferentes, de ahí la importancia de determinar cuál de los dos streptomicetos se encuentra afectando los campos de cultivo de papa.

La falta de buenos métodos de diagnóstico ha sido un factor determinante en el limitado manejo de la enfermedad. Como consecuencia, ha implicado el uso de aplicaciones químicas preventivas que pueden ser innecesarias, aumentando el costo de la producción, dañando el ambiente y paralizando el desarrollo de estrategias de manejo más eficientes. Es importante indicar que la técnica desarrollada aquí puede

permitir detectar el patógeno en el suelo antes de la cosecha, previo al desarrollo de la enfermedad, de esta forma podrían reducirse los problemas indicados anteriormente.

Es importante considerar que Guatemala posee extensas áreas con clima y suelo adecuados que potencialmente pueden ser sembradas con este cultivo, por ello el país es en la actualidad el mayor productor y exportador de papa en el área centroamericana. En Guatemala, la mayor parte de papa es producida por pequeños agricultores, los cuales, la cultivan asociados en cooperativas. Desde el punto de vista de interés nacional, es importante elevar la producción de papa, ya que es una fuente importante de carbohidratos en la alimentación (nutrición) de la población y es también una buena fuente de vitamina C (Dr. F. Figueroa, Universidad de Cornell, Ithaca, NY., Comunicación personal). Es importante que los pequeños agricultores tengan acceso a tecnologías que les permitan detectar e identificar patógenos que puedan causar pérdidas en sus cosechas tanto en cantidad como en calidad. Instituciones gubernamentales como el ICTA, podrían proveer este servicio de diagnóstico.

Además, últimamente se ha presentado un interés de parte del sector privado de Guatemala en importar y adaptar nuevas variedades de papa que provean la calidad necesaria para la elaboración de papas fritas. Muchos de estos materiales

vegetales no están adaptados a las condiciones climáticas de Guatemala y por lo tanto, también se desconoce su potencial susceptibilidad a fitopatógenos nativos en el país. Debido a que la roña de la papa causa pérdidas en Guatemala (Ing. R. Arias, ICTA, Comunicación personal), es importante contar con un sistema de diagnóstico rápido y seguro que permita detectar la presencia de Streptomyces spp. al evaluar esta variedad de papa y estimar las pérdidas potenciales en su producción.

Finalmente, otra aplicación importante de la técnica ELISA aplicada para la detección de Streptomyces spp. es que permitiría investigar la distribución del patógeno a nivel nacional. Al realizar muestreos en las regiones productoras de papa se tendría como objeto identificar las especies presentes de Streptomyces spp. en Guatemala.

## V. CONCLUSIONES

Los anticuerpos policlonales de gallina producidos para la detección de S. scabies y S. acidiscabies permitieron identificar con especificidad a S. acidiscabies de otras especies patogénicas y no patogénicas del mismo género, sin embargo, no fue posible identificar con especificidad a S. scabies.

El anticuerpo monoclonal producido en ratones BALB/c para la detección de S. scabies fue específico con la excepción de 2 cepas, patogénicas del género Streptomcyes spp. que presentaron reacción cruzada de 49 cepas evaluadas y que se asemejan morfológica y fisiológicamente en el patrón de azúcares utilizables.

La rápida identificación de las dos especies por medio del método inmunológico de ELISA facilita el diagnóstico del patógeno causal en la presencia de la enfermedad de la roña de la papa, permitiendo estudios de su ecología, epidemiología y manejo de la enfermedad en el campo.

Las especies S. scabies y S. acidiscabies no son genéticamente cercanas, a pesar de las similitudes en plantas

hospederas, tipos de lesiones y la habilidad de producir el compuesto taxtomina.

Las especies S. scabies y S. acidiscabies presentan diferencias específicas de tipo morfológico; siendo la forma de la cadena de esporas para la primera de tipo espiral y para la segunda, de tipo flexada; presentan diferencias de tipo fisiológico, la primera utilizando todas las fuentes de carbono, y la segunda no pudiendo hacer uso de rafinosa; y presentan diferencias inmunológicas, la detección utilizando anticuerpos policlonales fue inespecífica para la primera y específica para S. acidiscabies.

## VI. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. Plant Pathology. 3era ed. Academic Press, Inc. San Diego, California. 803 pp.
- Allan, E. y A. Kelman. 1977. Immunofluorescent stain procedures for detection and identification of Erwinia caratovora var. atroseptica. Phytopathology 67:1305-1312.
- Bowman, T. y A. R. Weinhold. 1963. Serological relationships of the potato scab organisms and other species of Streptomyces. Nature 200:599-600.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:244-248.
- Corbaz, R. 1964. Étude des streptomycètes provoquant la gale commune de la pomme de terre. Phytopathologie 51:351-360.
- Elesaway, A. A. y J. M. Szabó. 1979. Isolation and characterization of Streptomyces scabies strains from scab lesions of potato tubers. Designation of the neotype strain of Streptomyces scabies. Acta

- Microbiologica Academy of Science, Hungría 26:311-320.
- Hassl, A. y H. Aspöck. 1988. Purification of egg yolk immunoglobulins. A two step procedure using hydrophobic interaction chromatography and gel filtration. *Journal of Immunological Methods* 110:225-228.
- Hockenhuil, J. 1979. The adaptation of the fluorescent antibody technique for in situ detection of bacterial antigens in serial section of plant tissue. Páginas 333-336 En: *Procarientes International Conference of Plant Pathology Bacteriology*. 4th. Angers, France.
- Hooker, W. J. 1981. Common scab. En: *Compendium of Potato Diseases*. Hooker, W. J. (ed.). American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. Pp 33-34.
- Hu, J. S., W. F. Rochow y R. R. Dietert. 1985. Production and use of antibodies from hen eggs for the SGV isolate of barley yellow dwarf virus. *Phytopathology* 75:914-919.
- Keinath, A. P. y R. Loria. 1989. Population dynamics of Streptomyces scabies and other Actinomycetes as related to common scab of potato. *Phytopathology* 79:681-687.
- Kirby, R. y E. P. Rybicki. 1986. Enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA) as a mean of taxonomic analysis of Streptomyces and related organisms. *Journal of General Microbiology* 132:1891-1894.

Kutzner, H. J. 1979. The family Streptomycetaceae. En: M. P. Star, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows y H. J. Schlegel (eds.). *The prokaryote: a handbook of habitats, isolation and identification of bacteria*. Springer-Verlag, Berlin. 2028-2090 pp.

Lambert, D. H. y R. Loria. 1989A. Streptomyces scabies sp. nov. nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39:387-392.

Lambert, D. H. y R. Loria. 1989B. Streptomyces acidiscabies sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39:393-396.

Lawrence, C. H., M. C. Clark y R. R. King. 1990. Induction of common scab symptoms in aseptically cultured potato tubers by the vivotoxin, thaxtomin. *Phytopathology* 80:606-608.

Loria, R., B. A. Kempter y A. A. Jamieson. 1986. Characterization of Streptomyces-like isolates from potato tubers with symptoms of common scab. *Phytopathology* 76:1078-1079.

Manzer, F. E., G. A. McIntyre y D. C. Merriam. 1977. A

new potato scab problem in Maine. Maine Life Sciences Agricultural Experimental Station Technical Bulletin 85:1-24.

McIntyre, R. 1971. A method for in situ observation of sporophores of Streptomyces. Research in Life Sciences 19:1517.

McLaughlin, R. J., T. A. Chen y J. M. Wells. 1989. Monoclonal antibodies against Erwinia amylovora: characterization and evaluation of a mixture for detection by enzyme-linked immunosorbent assay. Phytopathology 79:610-613.

Moyer, J. y E. Echandi. 1986. Serological detection and identification of Streptomyces ipomoea. Plant Disease 70:516-518.

Shirling, E. B. y D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of Streptomyces species. International Journal of Systematic Bacteriology 16:313-340.

Voller, A., D. E. Bidweell y A. Bartlett. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Dynatech Laboratories Incorporated. Alexandria, Virginia. 188 pp.

Vruggink, L. 1976. Influence of agricultural crops on

the actinomycetes in soil. Plant Soil 3:639-654.

Williams, S. T., M. Goodfellow, G. Alderson, E. M. H. Wellington, P. H. A. Sneath y M. J. Sachin. 1983. Numerical classification of Streptomyces and related genera.

Williams, S. T., M. Goodfellow y J. G. Holden. 1989. En: Williams, S. T. y Wilkins, C. E. (eds.) Section 29. Streptomyces and related genera. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore. Pg. 2451-2508.

## APENDICE A

### Estandarización de ELISA utilizando los anticuerpos policlonales de gallina

Los pozos de las placas de poliestireno fueron cubiertas con 50 ml de 10  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno sonificado en solución amortiguadora de carbonato-bicarbonato (pH 9.6) e incubadas durante la noche a 4° C. Las placas fueron lavadas tres veces con solución amortiguadora PBS-Tween (pH 7.4) y bloqueadas con 200  $\mu\text{l}$  de albúmina de suero bovino 2% (BSA, fracción V) en PBS-Tween durante 2 hrs a 37° C. Las placas fueron lavadas de nuevo y diluciones de anticuerpos fueron agregadas en razón de 1:20 a 1:40960 (v/v) e incubadas 1 hr a 37° C. Las placas fueron lavadas de nuevo y se agregó dilución del conjugado de conejo anti-IgG de pollo, molécula entera, (1:1000, v/v) (Sigma A-9171), incubando durante 1 hr a 37° C. Posteriormente a los lavados, se detectó el complejo formado de antígeno-anticuerpo agregando 50  $\mu\text{l}$ /pozo de sustrato consistiendo de p-nitrofenil fosfato, 1 mg/ml, en solución amortiguadora de dietanolamina, pH 9.8 ( 9.7% dietanolamina, 0.02%  $\text{NaN}_3$  y 0.1 mg/ml de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) e incubado durante 30 min a 22° C. Se determinó la densidad óptica (OD) a 405 nm utilizando un lector de microplacas (serie EL311, Bio-tek Instruments, Inc.).

Las condiciones óptimas determinadas para ELISA fueron: concentración de antígeno a 10  $\mu\text{g/ml}$ , 4 h de incubación a 37°C, bloqueo con 2% BSA durante 2 hrs, 1 h de incubación con las diluciones de anticuerpo (1:800, v/v), 1 h de incubación con el conjugado policlonal de pollo (1:800, v/v) en 2% BSA por 2 hrs, y 1 h de incubación con fosfatasa alcalina (5 ml). Los pasos de lavado entre cada incubación fueron realizados como se indicó anteriormente en el procedimiento. El control utilizado fue una preparación de anticuerpos policlonales crudos, sin purificación cromatográfica, obtenidos de yema de huevo de gallina sana no inoculada (día 0).

## APENDICE B

Purificación de anticuerpos policlonales crudos extraídos de huevos de gallina.

1. Precipitación de IgG con sulfato de amonio. Diluir 1 ml de anticuerpo crudo con 9 ml de agua destilada y mezclar bien. Agregar 10 ml de sulfato de amonio gota a gota con agitación hasta que precipite. Dejar a temperatura ambiente durante 2 hrs y posteriormente, centrifugar el IgG a 10,000 rpm durante 30 min. Por último, resuspender el precipitado en 1 ml de solución amortiguadora de .01 mM Tris pH 8.0.

2. Preparación de DEAE-celulosa

a) Se necesita lavar inicialmente la columna conteniendo DEAE-celulosa para eliminar las impurezas. Para ello, se debe agitar el intercambiador dentro de 15 volúmenes de 0.5 N HCl y dejar reposar por lo menos 30 min pero no más de 2 hrs. Luego, lavar el intercambiador hasta que el efluente esté a pH 4.0. Agregar 15 volúmenes de 0.5 N NaOH agitando el intercambiador y dejar durante 30-120 minutos. Repetir el paso anterior y lavar el intercambiador hasta que el pH del efluente esté cerca de neutro.

b) Se debe eliminar presencia de gas en la solución. Para ello, colocar el intercambiador en 0.1 M Tris-HCl, aplicar vacío con agitación lenta hasta que no se observen burbujas, pero sin llegar a ebullición y titular a pH 8.0 con 0.1 M base Tris.

c) Para equilibrar el sistema se debe agitar el intercambiador dentro de 0.1 M Tris pH 8.0, utilizando 15-30 ml de solución amortiguador por cada gramo de intercambiador seco. Titular lentamente de nuevo, con agitación, hasta alcanzar el pH correcto y sustituir el sobrenadante con dos cambios de 0.1 M Tris 8.0. Repetir los cambios de solución amortiguadora hasta que el pH y la conductividad se estabilicen. Finalmente, repetir los pasos anteriores de este inciso con .1 M Tris pH 8.0.

d) Remover material fino agregando 20 volúmenes de 10 mM Tris, pH 8.0, dejando que sedimente durante 15 minutos y decantar el sobrenadante. Repetir este paso por lo menos dos veces.

e) Dializar extensivamente el IgG precipitado (proveniente del inciso 1) versus 10 mM Tris, pH 8.0 a 4° C.

f) Llevar a cabo la cromatografía de intercambio iónico para IgG. Correr la solución dializada de IgG diluido en 10

mM Tris, pH 8.0 a través de una columna de 0.5 x 5.0 cm de DEAE-celulosa, equilibrada como se indicó en los pasos a) al d) y lavar la columna utilizando 2 volúmenes equivalentes de la misma solución amortiguadora.

g) Eluir IgG con un gradiente lineal de 0-500 mM NaCl en 10 mM Tris pH 8.0 en la columna equilibrada. Un gradiente volumétrico de 40 ml permite fraccionar con adecuada separación de IgG. La resolución del punto más alto de IgG puede ser aumentado por medio del uso de un flujo lento y un gradiente de volumen mayor.

h) Colectar fracciones de 1-5 ml y monitorear la absorbancia a 280 nm. por fracción.

i) Seleccionar las fracciones con los picos más altos de absorbancia a 280 nm, la cual indica IgG.

## APENDICE C

### Estandarización de ELISA utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales de ratón

El procedimiento general de ELISA fue el siguiente: Los pozos de las placas de poliestireno (96 pozos, fondo plano, Corning, NY) fueron cubiertos con 10  $\mu\text{g/ml}$  de antígeno, preparado como se indicó previamente. Los antígenos solubles diluídos en PBS-Tween fueron incubados durante la noche a 4°C. Los pozos fueron bloqueados con 2% de BSA e incubados durante 2 hrs a 37° (para los ensayos con anticuerpos monoclonales este paso no fue utilizado). La solución fue desechada y las placas fueron lavadas tres veces con PBS-Tween, pH 7.4. Los pozos recibieron 50  $\mu\text{l}$  de las diluciones de anticuerpos policlonales o monoclonales y se incubaron 1 hr a 37° C. Se agregó el conjugado y se incubó 30 min a temperatura ambiente. El complejo específico antígeno-anticuerpo formado fue detectado agregando 50  $\mu\text{l}$ /pozo de sustrato consistiendo de p-nitrofenil fosfato, 1 mg/ml, en solución amortiguadora de dietanolamina ph 9.8, incubado por 30 min a temperatura ambiente y leyendo la absorbancia a 405 nm.

La determinación de la producción de anticuerpos policlonales en ratones se realizó utilizando diluciones

dobles empezando a una razón 1:20 v/v. Los anticuerpos policlonales de pollo purificados por cromatografía, previamente producidos contra S. scabies, se utilizaron como control positivo. El suero de ratón sano se utilizó como control negativo. Y se agregó en esos pozos 1/800 (v/v) de conjugado de conejo contra IgG de pollo, molécula entera, (1:1000, v/v) (Sigma A-9171). El conjugado utilizado para los pozos conteniendo anticuerpos policlonales de ratón fue 1/1000 (v/v) de cabra anti-ratón, molécula entera (IgA, IgG e IgM) (Organon Teknica Corp., Westchester PA).

Para la selección de las líneas de anticuerpos monoclonales de ratón, los anticuerpos policlonales de ratón fueron utilizados como control positivos, suero de ratón sano como control negativo y una solución equivolumétrica del sobrenadante del cultivo de las líneas monoclonales fue agregado para analizar. Se utilizaron dos conjugados; se agregó conjugado de cabra anti-ratón IgG, 1:800 v/v, molécula entera (A-9171, Sigma), el cual tuvo baja actividad por lo que se substituyó por 1/1000 conjugado de cabra anti-ratón IgG, molécula entera (A-5153).