

¿Porque Varían los Resultados de Diagnóstico en los Laboratorios?

Dra. Judit Monis, Asesora de Fitopatología (especializada en vid)



Probablemente sepa que hay muchas opciones de servicios de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades de plantas. Puede ser confuso para el productor, el administrador del viñedo y/o el personal del vivero decidir qué laboratorio elegir.

Los clientes siempre me preguntan: “¿Por qué los resultados de las muestras enviadas del mismo bloque de viñedo proveen resultados diferentes en diferentes laboratorios?” Hay muchas razones y trataré de aclarar algunos aspectos asociados con actividades del laboratorio (método/técnica utilizada) y la colección de muestras que afectarán los resultados finales del diagnóstico de la enfermedad. Finalmente, introduciré el concepto de estandarización de los métodos de diagnóstico utilizados para la detección de patógenos de la vid. Después de leer

este artículo, espero que contrate a profesionales expertos en fitopatología que puedan determinar sus mejores opciones según sus necesidades y lo pueda guiar a través del proceso.

Descripción de las técnicas de laboratorio más comunes

Cultivo Microbiológico

Los patógenos fúngicos y bacterianos se pueden aislar y cultivar en medios especializados. Sin embargo, los microorganismos podrán competir entre sí. Frecuentemente, los microbios que crecen más rápido enmascararán a aquellos que crecen más lentamente, lo que dificultaría el diagnóstico de ciertos patógenos bacterianos o fúngicos. El diagnóstico podría estar sesgado y por lo tanto el laboratorio no podrá informar cual es agente causal de la enfermedad a menos que se utilicen métodos moleculares. Sin embargo, en algunos casos, la identificación de la familia taxonómica fúngica (por ejemplo, géneros de la familia *Diatrypidae* o *Botryosphaeriaceae* aisladas de un cancro) o género bacteriano (especies de *Agrobacterium* aisladas de una agalla típica) puede ser suficiente para descifrar la causa del problema. Los fitoplasmas (un tipo especial de bacterias que carecen de paredes celulares) y los virus no pueden cultivarse y su identificación debe realizarse mediante métodos moleculares y/o serológicos.

ELISA, PCR, RT-PCR, qPCR



Una placa de ELISA con muestras de planta usada para determinar el estado de infección en el Laboratorio Bioreba AG en Suiza

ELISA es la abreviatura de "ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas", y consiste en la unión una proteína (proteína de cubierta, en el caso de un virus) en una placa de plástico recubierto con anticuerpos específicos. Un cambio de color en los pocillos de la placa indicará una reacción positiva (reacción enzimática colorimétrica). ELISA está limitada a la detección de la cantidad de virus presente en la muestra, por lo tanto, no es tan propensa a la contaminación en el laboratorio. Durante la pandemia de coronavirus, probablemente escuchó en los medios hablar de pruebas de anticuerpos o serológicos. ELISA, aunque diferente de las pruebas rápidas de COVID 19 basadas en inmuno-cromatografía, es una prueba serológica.

PCR, es la abreviatura de reacción en cadena de la polimerasa (esta es una prueba de base molecular). La técnica permite la amplificación de ácidos nucleicos a partir de una mínima concentración de patógeno presente en la planta de vid. El proceso es específico y utiliza copias de pequeñas porciones del genoma del patógeno (llamados cebadores o primers) para iniciar el proceso. La amplificación se repite muchas veces, y cada copia produce más copias, por lo que después de completar un número apropiado de ciclos de PCR, se producen más de mil millones de copias del ácido nucleico. Para los virus de ARN, la detección se realiza mediante RT-PCR (RT es la abreviación de transcripción inversa, una forma molecular de copiar ARN para producir ADN). PCR y RT-PCR son técnicas sensibles utilizadas frecuentemente para la detección de patógenos de la vid. La técnica de PCR en tiempo real es una modificación de la PCR que puede proporcionar la cuantificación relativa del patógeno presente en una muestra (abreviado como qPCR y qRT-PCR).

La sensibilidad y la especificidad de la detección de patógenos pueden verse influenciadas por la temporada del año, así como por la parte de la planta de vid en que se recolectan las muestras. Aunque generalmente se piensa que ELISA es menos sensible que RT-PCR, ELISA tiene un espectro de detección más amplio y puede detectar una variedad de variantes de virus. Por otro lado, la técnica de PCR es muy específica, esto puede ser una ventaja, pero también una desventaja. Si la detección es demasiado específica, podría pasar por alto la detección de variantes del mismo virus cuando hay pequeños cambios en el genoma (mutaciones). Esto es común cuando se usa TaqMan, un tipo de qPCR que además de primers utiliza una sonda específica para la detección de virus u otros patógenos. Esta es la razón por la cual se recomienda utilizar ELISA y RT-PCR consecutivamente para la detección fiable de virus de la vid, ya que cada método está diseñado para detectar diferentes componentes del virus (ELISA detecta las proteínas y PCR detecta el ácido nucleico). Dado que el virus de la mancha roja de la vid es un virus de ADN y hasta el momento no se han producido anticuerpos para ELISA, recomiendo que se realice PCR para amplificar al menos dos genes diferentes del genoma viral.

Pruebas Rápidas para la Detección de los Virus de la mancha roja (Red Blotch) y Pinot Gris de la Vid

El ensayo de amplificación de polimerasa de recombinasa (RPA) para la detección de los virus Grapevine red blotch (GRBV) y Grapevine Pinot Gris (GPGV) están disponibles comercialmente. El fabricante afirma que estas pruebas se pueden realizar en el campo. Sin embargo, para obtener resultados fiables, los ensayos deben ser realizados por técnicos con experiencia y en

el laboratorio. Una persona sin experiencia en la técnica de RPA deberá entender las instrucciones del ensayo y seguirlas cuidadosamente. El protocolo incluye muchos pasos que requieren medir pequeñas cantidades de reactivos (microlitros). Por lo tanto, es importante que un laboratorio experimentado realice estas pruebas. El personal de laboratorio está acostumbrado a ejecutar diferentes protocolos y está capacitado para mantener la muestra y otros materiales libres de contaminación. Un inconveniente grave de estas pruebas rápidas es que solo están disponibles para dos virus de la vid. Como he señalado en otros artículos, los síntomas causados por los patógenos de la vid pueden confundirse. Por ejemplo, un resultado negativo de GRBV puede dar una falsa seguridad de que las vides en el viñedo están sanas cuando, de lo contrario, podrían estar infectadas con el enrollamiento de la hoja (GLRaV), *Vitivirus*, o una combinación de estos y/o patógenos bacterianos o fúngicos.

Amplificación Isotérmica Mediada por Lazo (LAMP)

Al igual que la técnica de PCR, LAMP es un método de amplificación de nucleótidos que utiliza primers para iniciar el proceso de copia del ácido nucleico del patógeno. Sin embargo, difiere en que la reacción a menudo no requiere la extracción de ácido nucleico y se realiza a una temperatura constante (isotérmica). Estos ensayos LAMP se han desarrollado en Sudáfrica para la detección de GLRaV-3 y en EEUU (Cornell University) para la detección de GRBV. Varias sesiones de capacitación para utilizar la metodología para la detección de GRBV usando LAMP fueron dadas por el grupo técnico de viñedos de Napa Valley. En su opinión, LAMP es tan o más sensible que PCR. Desafortunadamente, debido a que LAMP es muy sensible, la técnica es propensa a la contaminación (es decir, pueden producir positivos falsos). Al igual que RPA, el operador deberá seguir cuidadosamente un protocolo que requiere la medición de volúmenes pequeños de reactivos, lo que requeriría personal capacitado con experiencia. La inversión inicial de equipos de laboratorio y un área limpia para realizar las operaciones también son necesarias para producir resultados fiables.

Secuenciación de Última Generación (NGS)

La secuenciación de última generación (NGS), también conocida como secuenciación de alta capacidad (High Throughput Sequencing = HTS), es un método poderoso que permite a un laboratorio detectar cualquier organismo presente en una muestra (con tal de que ese organismo haya sido secuenciado anteriormente).

Cuando se aplica NGS o HTS se obtiene la secuencia completa del material genético vegetal y su microbioma. Por lo general, durante la preparación de la muestra, las secuencias específicas de los patógenos se enriquecen para aumentar la sensibilidad del ensayo (por ejemplo, el laboratorio puede preferentemente amplificar las secuencias fúngicas). Los datos obtenidos se analizan con un software sofisticado que es capaz de analizar las secuencias bacterianas, fúngicas, virales u otros microorganismos presentes en la muestra (beneficiosos o patógenos). El método puede proporcionar datos cuantitativos relativos de cada organismo encontrado (generalmente expresados en porcentajes). La técnica de NGS se ha utilizado ampliamente en proyectos de investigación y ha permitido el descubrimiento y la caracterización de importantes virus como el de la mancha roja de la vid (GRBV) y muchos *Vitivirus*. Actualmente, esta técnica se está aplicando comercialmente para testar muestras de plantas y suelos para la detección de

microorganismos bacterianos y fúngicos. Se recomienda que un/a fitopatólogo/a con experiencia en taxonomía de bacterias, hongos y/o virus esté disponible para asociar la presencia de los microorganismos encontrados con los síntomas de la enfermedad (o el desarrollo potencial de la enfermedad).



Ácido nucleico extraído de muestras de suelo en el Laboratorio BiomeMakers en Sacramento, CA

Los Resultados Obtenidos en Diferentes Laboratorios pueden Variar

Con frecuencia, la causa de los diferentes resultados de las pruebas en diferentes laboratorios puede deberse a errores operativos. En mi carrera dirigiendo laboratorios de diagnóstico de plantas, puedo decir con confianza que he visto muchas cosas que pueden salir mal durante el procesamiento de muestras. No es mi intención enumerarlos aquí. La clave es que el laboratorio tenga personal capacitado y cepa detectar el error antes de que los resultados lleguen al cliente (es decir, algo no se ve bien, repitamos la prueba o investiguemos más). Un falso positivo es el reporte de una muestra positiva para cierto(s) patógeno(s) cuando en realidad no está infectado. Esto puede deberse a la contaminación en el laboratorio, pero también a un error en el campo o en el laboratorio durante el proceso (se rotuló mal la muestra). También pueden ocurrir falsos negativos, y esto puede deberse a la falta de sensibilidad del test utilizado, problemas con el muestreo (ya sea en el campo o en el laboratorio) y/o cuando el técnico de laboratorio cometió un error.

Supongamos que todo va bien en el laboratorio. El operador utiliza las mejores habilidades técnicas y aplica un buen control y garantía de calidad (QA/QC). Un factor importante a tener en cuenta es la calidad y el tipo de muestra recolectada en el viñedo. Mis investigaciones han demostrado que pueden obtener resultados diferentes con muestras de diferentes partes de la misma planta. Especialmente, la falla en la detección de un patógeno que está presente en baja concentración puede deberse a la distribución errática de ciertos patógenos en la planta. Si su

objetivo es determinar cuál es el mejor laboratorio para la detección de patógenos, es importante enviar muestras con infección conocida a cada laboratorio. Además, el recolector debería preparar muestras del mismo material de vid (representados por igual).

En este momento, no existe una acreditación que sea específica para las pruebas de diagnóstico de la vid en EEUU. Por lo tanto, cada laboratorio usa sus propios protocolos de testeo y muestreo. Es importante que estos métodos se desarrollen y optimicen con controles positivos (infectados con el patógeno de interés) y negativos (no infectados con el patógeno). Además, un laboratorio de confianza debe utilizar controles internos específicos para determinar la calidad de sus procesos.

La estandarización del muestreo y las pruebas es común en otros campos de la biotecnología de alimentos y plantas. Me sorprende que la industria de la vid no haya adoptado un sistema de acreditación dadas las pérdidas que los patógenos ocasionan a este cultivo perenne. La implementación de un sistema de acreditación y certificación para laboratorios de diagnóstico proporcionaría una evaluación imparcial de los procesos del laboratorio. Sin duda, La estandarización de los métodos de diagnóstico brindará resultados confiables a las partes interesadas. El objetivo futuro de la industria vitivinícola debe ser adoptar la acreditación de los laboratorios de diagnóstico de la vid.

Judit Monis, Ph.D. brinda servicios especializados para ayudar a los productores, administradores de viñedos y personal de viveros a evitar la propagación y transmisión de enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus en sus lotes de viñedos. Judit (basada en California) habla español y está disponible para consultas en todas las regiones vitivinícolas del mundo. También se pueden programar consultas virtuales de viñedos. Visite juditmonis.com para obtener información o comuníquese con juditmonis@yahoo.com para solicitar una sesión de asesoría.