

Guía de clase práctica:
TECNICAS DE DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES

Autor: Vivienne Gepp

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se han desarrollado una serie de técnicas nuevas (serología y otros métodos moleculares) que se utilizan en la detección e identificación de patógenos humanos, animales y vegetales, los cuales complementan y no sustituyen las técnicas más tradicionales. El Agrónomo debe conocer en qué se basan, cuál es su utilidad y las características positivas y negativas de cada una.

ACTIVIDADES DE APRENDIZAJE

Observación de videos que presentan técnicas de ELISA y PCR. Análisis de material disponible y respuesta a preguntas en seis mesas. Comparación de técnicas al final.

MESA 1. TÉCNICAS “RÁPIDAS”

Materiales: Cámaras húmedas confeccionadas con diferentes materiales (bolsa de nylon, caja de plástico, placa de Petri, etc.

Pregunta 1.

- ¿Cuáles son los elementos fundamentales que se requieren para realizar una cámara húmeda?
- Según su opinión, ¿por qué en la práctica se utiliza más la cámara húmeda para enfermedades causadas por hongos que para las provocadas por bacterias?
- ¿En qué casos puede utilizarse un test de flujo? ¿Y una microcorrida?

MESA 2. Técnicas que implican inoculación de plantas

Materiales: Figuras que esquematizan diferentes técnicas de inoculación.

Pregunta 2. ¿Cuál de las técnicas que muestran las figuras utilizaría para inocular plantas con cada uno de los siguientes patógenos?

- Un oomycete que provoca un mildiu.
- Un oídio.
- Un virus.
- Una bacteria.
- Un hongo que ataca las raíces.

MESA 3. SEROLOGÍA**Ejemplo: Test de ELISA**

Materiales: placas de ELISA, catálogos de antisueros y reactivos para serología.

3A. Pregunta 3. El test denominado Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) se realiza mediante una serie de etapas. Con la ayuda de los esquemas disponible en la mesa complete los pasos que faltan en el cuadro siguiente:

Paso N°	Actividad a realizar:
1	
2	Incubar
3	Lavar la placa
4	
5	Incubar
6	Lavar la placa
7	
8	Incubar
9	Lavar la placa
10	
11	Observar el resultado y medir absorbancia

3B. Pregunta 4. En la placa de ELISA se observa el resultado del diagnóstico realizado en plantas de una maleza que está ampliamente distribuida en el país y se sospecha que puede ser reservorio de PVY. Las 2 primeras columnas (1y 2) fueron sensibilizadas con macerado de plantas sanas. El resto de las columnas (3 a 12) con muestras problema. Hay 2 repeticiones de cada muestra que ocupan pocillos consecutivos en la misma fila. Ejemplo: Los posillos A y B de la columna 3 están sensibilizados con macerado de la misma planta.

Conteste las siguientes preguntas de acuerdo al resultado obtenido con la técnica de diagnóstico utilizada.

- ¿Cuántas muestras de las analizadas, están infectadas con PVY?
- Conociendo únicamente los resultados de este test de ELISA, se puede asegurar que las demás plantas están sanas. ¿Por qué?

3C. Pregunta 5. Con la ayuda de los catálogos que se encuentran sobre la mesada, indique para qué factores patogénicos existen antisueros disponibles ¿Por qué piensa Ud. que hay mayor número de antisueros para virus?

MESA 4. HIBRIDACION MOLECULAR

Materiales: Autoradiografía de test con sonda de ADN.

Pregunta 6. La metodología utilizada fue la siguiente: Se maceraron plantas a testar y testigos sanos y enfermos. Se colocó una gota de cada planta en un lugar predeterminado de una membrana de nitrocelulosa. Luego de fijarlos se incubaron con una sonda de ADN marcado con P32, y se obtuvo una autoradiografía de la reacción que se observa en la mesa. Observe el resultado.

- ¿Cuál(es) de las plantas a testar contenían el virus en cuestión? ¿Cómo lo determinó?
- ¿Se puede afirmar que las plantas que no dieron una reacción en esta prueba estaban sanas? ¿Por qué?

MESA 5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Materiales: video de PCR. Fotografía de un gel de electroforesis realizado luego de 1 PCR.

Pregunta 7. Observe el video y conteste:

- ¿En qué se diferencian una PCR para detectar PVY de una para determinar otro virus?
- Además de los virus, ¿qué otro(s) tipo(s) de fitopatógenos podría(n) ser detectado(s) mediante PCR?

Pregunta 8. Desde 1994 en Fitopatología se está estudiando una enfermedad importante en la producción de duraznos denominada podredumbre morena. La bibliografía cita tres especies de hongos del género *Monilinia* como agentes causales esta enfermedad. Interesa saber cuál(es) de estas especies está(n) presentes en el Uruguay porque difieren en características como el rango de huéspedes y entre ellas hay especies cuarentenarias para otros países. Entre otros estudios, se están identificando las especies de *Monilinia* presentes mediante PCR con primers específicos, realizado sobre muestras de órganos afectados recolectados en la zona productora. Luego del PCR se realiza una corrida de electroforesis de las muestras.

- En la Mesa verá el resultado de la electroforesis para algunas de las muestras y los testigos de las 3 especies. ¿Qué conclusiones saca de esta prueba?

MESA 6. Microscopía óptica y electrónica

Materiales: Varias fotografías de preparados al microscopio óptico y electrónico. Fotografía de un microscopio electrónico.

Pregunta 9.

¿Cuáles de las fotografías corresponden a preparados vistos al microscopio óptico, electrónico o electrónico de barrido?

COMPARACIÓN DE TÉCNICAS

Pregunta 10. Utilidad de diferentes técnicas según el factor patogénico.

Indique en el siguiente cuadro para qué factores patogénicos se utilizan cada uno de las técnicas.

Técnica	Hongos	Bacterias	Virus	Viroides	Nematodos
Test de flujo					
Microcorrida					
Cámara húmeda					
Observación morfológica al microscopio óptico					
Observación morfológica al microscopio electrónico					
Aislamiento en medio de cultivo					
Inoculación en su huésped					
Inoculación en plantas indicadoras					
Prueba de hipersensibilidad en no huésped					
Tamizado					
Embudo de Bareman					
Dilaceración					
Pruebas bioquímicas					
Serología					
Sondas de ADN					
PCR					
Secuenciado					

Pregunta 11. Compare en las celdas en blanco del cuadro siguiente las características de de las técnicas.

- = no posee la característica; + = en bajo nivel; ++ = medio; +++ = alto

Técnicas	Especificidad	Detecta solamente individuos viables	Tiempo para obtener el resultado		Equipamiento necesario	Apto para el procesamiento de muchas muestras
			Horas (hasta 48)	días -semanas		
Test de flujo	+					
Microcorrida		++				
Cámara húmeda					+	
Observación morfológica al microscopio óptico						
Observación morfológica al microscopio electrónico						
Aislamiento en medio de cultivo		+++			++	
Inoculación en su huésped						
Inoculación en plantas indicadoras				+++		
Prueba de hipersensibilidad en no huésped						
Tamizado					++	
Embudo de Baerman						
Dilaceración		+				
Pruebas bioquímicas						
Serología						+++
Sondas de ADN	+					
PCR					+++	
Secuenciado					+++	