

# Evaluación de la eficiencia de las técnicas PCR en tiempo real y LAMP para la detección de *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* en muestras sintomáticas de almendro

Palacio-Bielsa, A.<sup>1</sup>, López-Soriano, P.<sup>2</sup>, Bühlmann, A.<sup>3</sup>, van Doorn, J.<sup>4</sup>, Pham, K.<sup>4</sup>, Cambra, M. A.<sup>5</sup>, Berruete, I. M.<sup>1</sup>, Collados, R.<sup>5</sup>, Palazón, M. L.<sup>5</sup>, Olmos, A.<sup>2</sup>, López, M. M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón. Zaragoza. E-mail: apalaciob@aragon.es

<sup>2</sup>Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Moncada, Valencia

<sup>3</sup>Agroscope Changins-Wädenswil, Research Station ACW. Wädenswil, Suiza

<sup>4</sup>Wageningen University and Research Centre. Holanda

<sup>5</sup>Centro de Sanidad y Certificación Vegetal. Zaragoza



## INTRODUCCIÓN

*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* (*Xap*), bacteria de cuarentena en la Unión Europea, es el agente causal de la mancha bacteriana de los frutales de hueso y almendro. Se realizó un ring-test, en el que participaron cuatro laboratorios europeos, para la evaluación de los parámetros diagnósticos asociados a dos protocolos recientemente desarrollados para la detección de *Xap*: PCR en tiempo real (PCR-tr) y amplificación isoterma *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluaron los protocolos de PCR-tr (8) y LAMP (3), este último solo en tres laboratorios, para el análisis de ocho muestras de hojas sanas de almendro y ocho muestras de hojas con síntomas característicos de la infección por *Xap*. Se analizaron muestras directas de lavado de hojas y ADN purificado de los tejidos machacados (6) y sus respectivas diluciones 1:10 y 1:100.

- La concordancia interlaboratorios se evaluó utilizando el coeficiente kappa (4, 7). Se consideraron como buena concordancia los valores del coeficiente kappa  $\geq 0,61$  y como excelente los valores  $> 0,80$  (5).
- La sensibilidad se definió como la proporción de resultados verdaderos positivos (VP) detectados por las técnicas diagnósticas entre las muestras enfermas [VP / (VP+FN)]; siendo FN: falsos negativos identificados por la técnica (1, 7).
- La especificidad se definió como la proporción de resultados verdaderos negativos (VN) identificados por las técnicas diagnósticas respecto al total de muestras sanas [VN / (FP+VN)]; siendo FP: falsos positivos identificados por la técnica (2, 7).

## RESULTADOS

- La concordancia interlaboratorios para ambos protocolos demostró que los análisis de las muestras procedentes de lavados directos y sus diluciones 1:10 fueron los más reproducibles y coincidentes entre laboratorios, con valores kappa que variaron de 0,87 a 1 (Tabla 1).
- Los resultados de los análisis de las diluciones 1:100 de lavados de hojas, con una concordancia que varió desde 0,48 a 0,85, evidenciaron problemas en LAMP (Tabla 1).
- Los resultados de los análisis de los extractos de ADN mediante LAMP revelaron una problemática en un laboratorio, que se solventó en sus diluciones 1:10 y 1:100 (Tabla 1).
- La sensibilidad estimada en este ring-test para PCR-tr fue 0,98 y 0,89 para lavados y extractos de ADN, respectivamente, y superior a la de LAMP, con valores de 0,86 y 0,58, respectivamente (Tabla 2).
- La especificidad de PCR-tr fue 0,99 independientemente del tratamiento de las muestras, y la de LAMP fue 1 y 0,99 para lavados y extractos de ADN, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 1. Concordancia interlaboratorios

	PCR-tr	LAMP
Lavado	0,87 $\pm$ 0,25 - 1 $\pm$ 0,25	1 $\pm$ 0,25
Lavado 1:10	1 $\pm$ 0,25	1 $\pm$ 0,25
Lavado 1:100	0,75 $\pm$ 0,24 - 1 $\pm$ 0,25	0,48 $\pm$ 0,21 - 0,85 $\pm$ 0,25
Machacado	0 $\pm$ 0 - 1 $\pm$ 0,25	0 $\pm$ 0 - 1 $\pm$ 0,25
Machacado 1:10	0,87 $\pm$ 0,25 - 1 $\pm$ 0,25	0,87 $\pm$ 0,25 - 1 $\pm$ 0,25
Machacado 1:100	0,87 $\pm$ 0,25 - 1 $\pm$ 0,25	0,87 $\pm$ 0,25 - 1 $\pm$ 0,25

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad para muestras de lavados y ADN purificado de tejidos machacados

		SENSIBILIDAD			ESPECIFICIDAD		
		Valor	ET	IC95%	Valor	ET	IC95%
PCR-tr	Lavado	0,98	0,01	0,96-1	0,99	0,004	0,98-1,01
	Machacado	0,89	0,02	0,85-0,94	0,99	0,004	0,98-1,01
LAMP	Lavado	0,86	0,02	0,79-0,92	1	0	1
	Machacado	0,58	0,03	0,49-0,67	0,99	0,01	0,97-1,01

ET, Error típico; IC95%, Intervalo de confianza del 95%

## CONCLUSIONES

- En base a los resultados, el protocolo de PCR-tr empleando los lavados de hojas de almendro resultó el más adecuado para la detección precisa y fiable de *Xap* en este ring-test.
- Por su sencillez, el protocolo LAMP también resultaría adecuado para la detección de *Xap* en hojas sintomáticas de almendro, aunque sería necesario realizar ensayos adicionales con distintos huéspedes para verificar su eficiencia.