



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
Proteger de las plagas los recursos vegetales del mundo

PROTOSCOLOS DE DIAGNÓSTICO

NORMAS INTERNACIONALES PARA MEDIDAS FITOSANITARIAS 27

NIMF 27
ANEXO 15

ESP

PD 15: *Virus de la tristeza de los cítricos*

Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente

NIMF 27

Protocolos de diagnóstico para plagas reglamentadas

PD 15: *Virus de la tristeza de los cítricos*

Adoptado en 2016; publicado en 2018

ÍNDICE

1. Información sobre la plaga	3
2. Información taxonómica.....	5
3. Detección e identificación	5
3.1 Rango de hospedantes	6
3.2 Síntomas.....	7
3.3 Indexación biológica	8
3.4 Muestreo y preparación de las muestras para las pruebas serológicas y moleculares	9
3.4.1 Muestreo.....	9
3.4.2 Preparación de impresiones de tejidos	10
3.4.2.1 Preparación de impresiones de tejidos para las pruebas serológicas.....	10
3.4.2.2 Preparación de impresiones de tejidos y de frotis de áfidos para las pruebas de amplificación molecular.....	11
3.4.3 Preparación de extractos de plantas para las pruebas serológicas y de amplificación molecular.....	11
3.5 Pruebas serológicas	12
3.5.1 Inmunoimpresión directa-ELISA.....	12
3.5.2 DAS-ELISA	13
3.6 Pruebas moleculares	14
3.6.1 Purificación del ARN, inmunocaptura y síntesis de ADNc	15
3.6.1.1 Purificación del ARN.....	15

3.6.1.2	Inmunocaptura	15
3.6.1.3	Síntesis de ADNc	15
3.6.2	IC-RT-PCR	16
3.6.3	RT-PCR anidada con IC en un único tubo cerrado	16
3.6.4	Consideraciones generales relativas a la RT-PCR y la RT-PCR anidada	17
3.6.5	RT-PCR en tiempo real	17
3.6.7	Interpretación de los resultados de la RT-PCR convencional y en tiempo real ...	19
3.6.1	Controles para las pruebas moleculares	19
3.6.7.1	RT-PCR convencional y RT-PCR con IC	20
3.6.7.2	RT-PCR en tiempo real	20
3.7	Validación mediante un estudio del desempeño de la prueba	20
4.	Identificación de cepas agresivas del CTV	21
4.1	Indexación biológica	22
4.2	Pruebas serológicas con MCA13	23
4.2.1	Inmunoimpresión directa-ELISA	23
4.2.2	DAS-ELISA	23
5.	Registros	23
6.	Puntos de contacto para información adicional	24
7.	Agradecimientos	24
8.	Referencias	25
9.	Figuras	30

1. Información sobre la plaga

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV) causa una de las enfermedades más dañinas de este cultivo, con epidemias devastadoras que han cambiado el curso de la industria citrícola (Moreno *et al.*, 2008). El término portugués “tristeza” incorporado en el nombre en inglés del virus, que significa justamente “tristeza” o “melancolía”, se refiere al decaimiento observado en muchas especies de cítricos injertados sobre patrones de *Citrus aurantium* (naranja amargo) o de *Citrus limon* (limonero). Aunque la tristeza es fundamentalmente una enfermedad de la línea de injerto (Román *et al.*, 2004), algunas cepas del CTV inducen otros síndromes, como acanaladuras o picado del tallo (en inglés, *stem pitting*), enanismo, menor productividad y baja calidad del fruto en muchos cultivares comerciales, incluso en ejemplares injertados sobre patrones tolerantes a la tristeza.

El CTV se originó probablemente en Malasia y en otros países de Asia sudoriental, la supuesta área de origen de los cítricos, y se ha dispersado a casi todos los países productores mediante el movimiento de material vegetal infectado. La posterior dispersión a nivel local por medio de varias especies de áfidos (pulgones) vectores ha generado grandes epidemias.

Las primeras informaciones acerca de pérdidas de árboles injertados sobre naranja amargo fueron de Sudáfrica, a comienzos del siglo XX, y de Argentina y Brasil en la década de 1930. Es probable que esto haya sucedido tras la introducción de plantas infectadas por el CTV, presumiblemente infestadas por el áfido vector más eficaz como transmisor del virus, *Toxoptera citricida* Kirkaldy. El decaimiento inducido por el CTV ha matado o dejado improductivos los árboles injertados sobre patrones de naranja amargo (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Cambra *et al.*, 2000a). Se han observado brotes del CTV en los Estados Unidos, algunos países del Caribe y algunos países mediterráneos (en particular Italia y Marruecos). Se calcula que el CTV ha afectado a 38 millones de árboles en el continente americano (principalmente en Argentina, el Brasil, Venezuela y California, en los Estados Unidos), a 60 millones de árboles en la cuenca del Mediterráneo (sobre todo en España, con unos 50 millones de árboles afectados) y a unos 5 millones de árboles en otros sitios, los que suma más de 100 millones de árboles en total. La tristeza puede manejarse usando como patrones especies de cítricos que inducen tolerancia a la enfermedad. Algunas cepas agresivas del CTV pueden causar acanaladuras o picado del tallo en ciertos cultivares de cítricos independientemente del patrón utilizado. Esto tiene un impacto significativo en la calidad del fruto y el rendimiento de millones de árboles infectados por ellas en la mayoría de las explotaciones de cítricos de todo el mundo, excepto en las de la cuenca del Mediterráneo, donde las cepas agresivas no están presentes o no son predominantes. Para manejar de manera eficaz la enfermedad del picado del tallo, algunos productores de cítricos han adoptado una estrategia que consiste en inocular de forma profiláctica a los árboles con

cepas del CTV poco virulentas, también conocida como protección cruzada (Broadbent *et al.*, 1991; da Graça y van Vuuren, 2010).

El CTV es la especie más numerosa y compleja del género *Closterovirus* (Moreno *et al.*, 2008). Los viriones son flexuosos y filamentosos, de 2000 nm de longitud y 11 nm de diámetro, y su genoma es de ARN monocatenario de sentido positivo y no segmentado. El genoma del CTV contiene 12 marcos de lectura abiertos (ORF, del inglés *open reading frame*), que codifican al menos 17 proteínas, y dos regiones no traducidas (UTR, del inglés *untranslated region*). Los ORF 7 y 8 codifican proteínas con pesos moleculares estimados de 27,4 kDa (P27) y 24,9 kDa (P25) y que se han identificado como las proteínas de la cápsida. La diversidad del CTV es mayor de lo que se pensaba anteriormente: los nuevos genotipos han divergido de la población ancestral o han surgido por recombinación con cepas descritas anteriormente (Harper *et al.*, 2008). Las poblaciones del CTV de los cítricos tienen carácter de cuasiespecies, es decir, son mezclas complejas de genotipos víricos y ARN vírico defectuoso desarrolladas durante la propagación vegetativa a largo plazo, por medio de los injertos, de cepas aisladas del virus y por la mezcla de estas cepas con otras procedentes de áfidos vectores. Como consecuencia, las cepas aisladas del CTV contienen diversas variantes de secuencias, entre las que suele predominar una (Moreno *et al.*, 2008).

El CTV se transmite con facilidad a nivel experimental al injertarse sobre cítricos sanos material vegetal infectado por el virus. Lo transmiten de forma natural y semipersistente ciertas especies de áfidos. El vector más eficiente del CTV en todo el mundo es *T. citricida*. *T. citricida* está bien establecido en Asia, Australia, África subsahariana, América Central y del Sur, el Caribe, Florida (Estados Unidos) y el norte peninsular de España y Portugal, así como en las Islas Madeira (Ilharco *et al.*, 2005; Moreno *et al.*, 2008). Sin embargo, en España, Israel, algunas áreas cítricas de California (Estados Unidos) y en todos los lugares en los que *T. citricida* está ausente, el vector principal es *Aphis gossypii* Glover (Yokomi *et al.*, 1989; Cambra *et al.*, 2000a; Marroquín *et al.*, 2004). Se ha publicado una comparación entre los efectos de distintas especies de áfidos vectores en la dispersión del CTV (Gottwald *et al.*, 1997). También se han descrito otras especies de áfidos como vectores del CTV (Moreno *et al.*, 2008), entre las que se encuentran *Aphis spiraecola* Patch, *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonsicolombe), *Myzus persicae* (Sulzer), *Aphis craccivora* Koch y *Uroleucon jaceae* (Linnaeus). Aunque en estudios de transmisión experimental se comprobó que las especies de áfidos mencionadas son menos eficientes como vectores del CTV que *T. citricida* y *A. gossypii*, son las especies de áfidos predominantes en algunas áreas, por lo que es probable que participen de alguna forma en la dispersión del CTV, compensando su baja eficiencia de transmisión con su abundancia (Marroquín *et al.*, 2004).

Se ha estudiado en distintas partes del mundo la dispersión espacial y temporal del CTV en plantaciones de cítricos (Gottwald *et al.*, 2002). Estos estudios ponen de manifiesto que podrá transcurrir mucho tiempo entre la introducción de una fuente primaria de inóculo del CTV y la aparición de una epidemia de tristeza (Garnsey y Lee, 1988).

2. Información taxonómica

Nombre:	<i>Citrus tristeza virus</i> (CTV)
Sinónimos:	Tristeza virus
Posición taxonómica:	<i>Closteroviridae</i> , <i>Closterovirus</i>
Nombres comunes:	Virus de la tristeza de los cítricos, podredumbre de las raicillas.

3. Detección e identificación

La detección e identificación del CTV puede lograrse mediante pruebas biológicas, serológicas o de amplificación molecular (figuras 1 y 2). El uso de cualquiera de estas pruebas es el requisito mínimo para la detección e identificación del CTV (p. ej., en el diagnóstico rutinario de la plaga si está establecida ampliamente en un país). En los casos en que la organización nacional de protección fitosanitaria (ONPF) necesite más seguridad en la identificación del CTV

(p. ej., para la detección en un área en la que no se tenga conocimiento de la presencia del virus, o en un envío procedente de un país en el que se ha declarado la ausencia de la plaga), deberían realizarse más pruebas. En los casos en que la identificación inicial se haya realizado mediante una prueba de amplificación molecular, las pruebas posteriores deberían ser serológicas, y viceversa. También podrán realizarse más pruebas con el fin de determinar qué cepa del CTV está presente, en cuyo caso podrá ser necesario secuenciar el amplicón producido mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). En todos los casos, para que la prueba se considere válida, se deben incluir controles positivos y negativos. Las técnicas recomendadas para las pruebas biológicas, serológicas y de amplificación molecular se describen en las siguientes secciones. En la Figura 2 se presenta un diagrama de flujo para la identificación de cepas del CTV.

En este protocolo de diagnóstico, los métodos (incluidas las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que en ellos se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad adquirido. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

3.1 Rango de hospedantes

En condiciones naturales, el CTV infecta con facilidad a la mayoría de las especies de *Citrus* y de *Fortunella*, así como a algunas especies de géneros de la familia Rutaceae conocidos como parientes de los cítricos y que también son hospedantes susceptibles al CTV, a saber: *Aegle*, *Aeglopsis*, *Afraegle*, *Atalantia*, *Citropsis*, *Clausena*, *Eremocitrus*, *Hespertusa*, *Merrillia*, *Microcitrus*, *Pamburus*, *Pleiospermium* y *Swinglea* (Duran-Vila y Moreno, 2000; Timmer *et al.*, 2000). Casi todos los clones y muchos de los híbridos de *Poncirus trifoliata* (naranja trifoliado o espinoso), así como *Fortunella crassifolia* (kumquat Meiva o largo) y algunos *Citrus grandis* (pomelo), son resistentes a la mayoría de las cepas del CTV (Moreno *et al.*, 2008). Por lo tanto, el CTV está ausente en estas especies, o está presente en concentraciones muy bajas. *Citrus reticulata* (mandarino), *Citrus sinensis* (naranja dulce) y *Citrus latifolia* (lima de Tahití) son algunos de los cultivares más susceptibles a la infección natural por el CTV, seguidos de ciertos cultivares de *Citrus paradisi* (toronjero), *Citrus unshiu* (mandarino Satsuma) y *C. limon*. Entre las especies usadas como patrón, *Citrus macrophylla* (alemow), *Citrus volkameriana* (limonero volkameriano), *Citrus reshni* (mandarino Cleopatra) y *Citrus limonia* (lima de Rangpur) son muy susceptibles a la infección natural por el CTV, mientras que los citranges Carrizo y Troyer (híbridos de naranja dulce y naranja trifoliado) y *C. aurantium* se infectan en raras ocasiones. Los patrones de *P. trifoliata* y de *C. paradisi* × *P. trifoliata* (citrumelo) son resistentes a la

mayoría de las cepas del CTV. Las especies *Passiflora gracilis* y *Passiflora coerulea* se usan como hospedantes experimentales distintos de los cítricos.

3.2 Síntomas

La expresión de los síntomas en cítricos hospedantes infectados por el CTV es muy variable y depende de las condiciones ambientales, de la especie hospedante y de la agresividad de la cepa del CTV. Además, el virus podrá permanecer latente durante varios años. Algunas cepas del CTV son poco virulentas y no producen efectos detectables en la mayoría de las especies comerciales de cítricos, incluidos ejemplares de cítricos injertados sobre *C. aurantium*. En general, los mandarinos son especialmente tolerantes a la infección por el CTV. *C. sinensis*, *C. aurantium* (como plántula, no como patrón injertado), *Citrus jambhiri* (limonero rugoso) y *C. limonia* no suelen presentar síntomas cuando están infectados, pero pueden reaccionar ante algunas cepas agresivas. Los cítricos hospedantes que manifiestan síntomas son el limero, el toronjero, algunos cultivares de pomelo, alemow y naranjo dulce, algunos cítricos híbridos y ciertos parientes de los cítricos de la familia Rutaceae mencionados en la Sección 3.1.

En función de la cepa del CTV y de la especie de cítrico o de la combinación injerto-patrón, el virus podrá no causar ningún síntoma o causar alguno de los siguientes: tristeza (decaimiento); acanaladuras o picado del tallo, o amarilleo de los plantones, que se observa sobre todo en condiciones de invernadero. Estos tres síndromes se describen en los párrafos siguientes. En la Figura 1 se muestran los principales síntomas causados por el CTV.

Una de las consecuencias de mayor importancia económica de la infección por el CTV es la tristeza, una enfermedad de la línea de injerto que se caracteriza por el decaimiento de los árboles injertados sobre patrones de naranjo amargo o limonero. Los injertos de naranjo dulce, mandarino y toronjero sobre estos patrones sufren enanismo y clorosis, y a menudo mueren al cabo de varios meses o años (es decir, sufren un decaimiento lento), mientras que otros injertos experimentan un decaimiento rápido o colapso algunos días después de la observación del primer síntoma. El decaimiento se produce como resultado de los efectos fisiológicos del virus sobre el floema de los patrones susceptibles justo por debajo de la línea de injerto. Los árboles con decaimiento lento generalmente presentan un abultamiento por encima de la línea de injerto, una línea marrón justo en el punto de unión del injerto y punteado o panal de abeja (en inglés *inverse pinhole pitting* o *honeycombing*) en la cara interna de la corteza del patrón de naranjo amargo. En hospedantes susceptibles se observan comúnmente los siguientes síntomas: enanismo, hojas abarquilladas, aclaramiento de las nervaduras, hojas cloróticas, acanaladuras o picado del tallo, y tamaño reducido del fruto. Sin embargo, algunas cepas del virus, sobre todo en el sector citrícola de la cuenca del Mediterráneo, no inducen síntomas de decaimiento hasta muchos años después de la infección, incluso en árboles injertados sobre naranjo amargo.

Las cepas agresivas del CTV pueden afectar a los árboles gravemente, induciendo picado o acanaladuras en el tronco y las ramas del limero, el toronjero y el naranjo dulce. A veces, el picado o las acanaladuras pueden dar un aspecto irregular o fibroso al tronco y a las ramas de los árboles adultos, generar cavidades profundas en la madera bajo zonas deprimidas de la corteza y ocasionar una reducción de la calidad de los frutos y del rendimiento. La mayoría de las cepas del CTV afectan gravemente a los patrones de alemow, que desarrollan picado o acanaladuras que reducen el vigor del árbol.

El síndrome de amarilleo de los plantones se caracteriza por enanismo, producción de hojas cloróticas o pálidas, menor desarrollo radicular e interrupción del crecimiento de los árboles injertados sobre plantones de naranjo amargo, toronjero y limonero cultivados en condiciones de invernadero (20-26 °C).

3.3 Indexación biológica

El objetivo de la indexación biológica es detectar la presencia del CTV en lotes o selecciones de plantas o en muestras cuya condición sanitaria se está evaluando, y estimar la agresividad del aislamiento en plántulas de *Citrus aurantifolia* (limero agrio o mexicano), *C. macrophylla* o *Citrus paradisi* Macfadyen (toronjero Duncan). El indicador es un patrón inoculado mediante métodos convencionales que se conserva en condiciones estándar (Roistacher, 1991), con cuatro a seis repeticiones (o dos o tres si no se pueden tomar suficientes muestras). En estas plantas indicadoras sensibles, cualquiera de los siguientes síntomas evidencia la infección por el CTV tras la inoculación del patrón: aclaramiento de las nervaduras en hojas jóvenes; abarquillamiento o deformación de las hojas; entrenudos cortos; acanaladuras o picado del tallo, y amarilleo de los plantones. Los síntomas se comparan con los de las plantas utilizadas como controles positivo y negativo. En Roistacher (1991) y en Moreno *et al.* (2008) hay ilustraciones de los síntomas provocados por el CTV en plantas indicadoras.

La indexación biológica se utiliza de forma generalizada en programas de certificación y se considera un método sensible y fiable para la detección de cepas nuevas o inusuales del virus. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes: no es una prueba rápida (los síntomas tardan de tres a seis meses en desarrollarse tras la inoculación); solo puede emplearse en yemas; se necesitan instalaciones dedicadas, como espacio en un invernadero con temperatura controlada y a prueba de insectos, y personal dedicado que pueda cultivar plantas hospedantes indicadoras sanas y vigorosas capaces de mostrar los síntomas pertinentes, así como personal con experiencia que esté en condiciones de interpretar correctamente los síntomas de enfermedad observados que puedan confundirse con los de otros agentes transmisibles por injerto. Además, existen cepas del CTV asintomáticas (cepas latentes) que no son detectables en las plantas indicadoras, p. ej., la cepa K del CTV descrita por Albertini *et al.* (1988).

Se han publicado pocos datos cuantitativos sobre la especificidad, la sensibilidad, otros parámetros de diagnóstico y la fiabilidad de los ensayos biológicos realizados mediante injerto de plantas indicadoras (indexación) para la detección, el diagnóstico o la identificación del CTV. Cambra *et al.* (2002), en el proyecto de protocolos de diagnóstico europeos (DIAGPRO), y Vidal *et al.* (2012) compararon la indexación, en limero mexicano, con el ensayo de inmunopresión directa-inmunoabsorción enzimática (ELISA) (Sección 3.5.1) (con anticuerpos monoclonales 3DF1 + 3CA5) y con la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en tiempo real con inmunopresión (Sección 3.6.5), y concluyeron que, para la detección del CTV, la indexación biológica en limero mexicano puede sustituirse eficazmente por cualquiera de esos dos métodos de laboratorio.

3.4 Muestreo y preparación de las muestras para las pruebas serológicas y moleculares

3.4.1 Muestreo

La NIMF 31 (*Metodologías para muestreo de envíos*) brinda orientación general sobre las metodologías de muestreo y en Cambra *et al.* (2002) se describe específicamente el muestreo del CTV. Para detectar e identificar el CTV con métodos biológicos, serológicos o de amplificación molecular, es imprescindible un muestreo apropiado. Los cambios en un programa de muestreo aceptado podrían hacer que un protocolo de diagnóstico eficaz genere falsos positivos o falsos negativos. La muestra estándar para árboles adultos es de cinco brotes jóvenes o pedúnculos de frutos, diez hojas completamente desarrolladas, o cinco flores o frutos recogidos alrededor de la copa de cada árbol y de cada rama principal. Las muestras (brotes u hojas completamente desarrolladas y pedúnculos) pueden tomarse de naranjo dulce, mandarino, limonero y toronjero en cualquier momento del año en climas mediterráneos templados, pero en climas tropicales y subtropicales, la primavera y el otoño son los períodos óptimos de muestreo para obtener concentraciones altas del CTV. En estos climas, se observa una concentración reducida del CTV en mandarinos Satsuma durante el verano, por lo que el período recomendado de muestreo abarca todas las estaciones vegetativas, excepto los días calurosos (35–40 °C) del verano. Sin embargo, pueden tomarse muestras de las raíces en períodos cálidos, en caso necesario. Las flores y los frutos (cuando los haya) también son materiales adecuados para el muestreo (Cambra *et al.*, 2002). Las muestras del fruto más adecuadas son las del tejido del pedúnculo en la zona del albedo, donde el pedúnculo se une al fruto, o de la columela. Los requisitos estándar para el muestreo de plantas de vivero incluyen la toma de dos brotes jóvenes o cuatro hojas por planta. Según Roistacher (1991), para la indexación normalmente se toman, en cualquier época del año (pero preferiblemente durante el período vegetativo), pequeños

fragmentos de corteza sin yemas, o incluso hojas, de brotes o ramas de al menos un año de las plantas infectadas.

Los brotes, los pecíolos de las hojas, los pedúnculos de los frutos y las flores se pueden conservar a una temperatura aproximada de 4 °C durante un máximo de siete días hasta su procesamiento. Los frutos pueden almacenarse durante un mes a una temperatura aproximada de 4 °C; el almacenamiento durante más tiempo podrá resultar en concentraciones más bajas y en la posibilidad de obtener falsos negativos con los métodos de diagnóstico.

Las muestras compuestas, para su análisis como muestras individuales mediante pruebas serológicas o de amplificación molecular, pueden tomarse juntas (normalmente, dos hojas o un brote de una a diez plantas de vivero, o bien diez hojas o cinco brotes por árbol adulto tomadas alrededor de la copa). En ciertas circunstancias (p. ej. en el diagnóstico rutinario cuando el CTV está ampliamente distribuido en un país o área) se podrán efectuar pruebas sobre varias plantas simultáneamente, utilizando una muestra compuesta obtenida de un cierto número de ellas. La decisión de realizar las pruebas en muestras compuestas o en plantas individuales con métodos serológicos o de amplificación molecular dependerá de la concentración del virus en las plantas, de la prevalencia esperada del CTV en esa área (Vidal *et al.*, 2012), del límite de detección del método de prueba que se utilizará y del nivel de confianza requerido por la ONPF.

Se pueden analizar ejemplares de áfidos individuales (frescos o conservados en alcohol al 70 %) para determinar la presencia del CTV. Los áfidos se toman directamente de colonias establecidas o se capturan mediante trampas: se recomienda el uso de trampas de succión, trampas amarillas de agua de Moericke clásicas o trampas adhesivas para brotes. Los especímenes recolectados se usarán preferentemente para las pruebas de frotis por aplastamiento y RT-PCR en tiempo real (Bertolini *et al.*, 2008) u otras pruebas de amplificación molecular (Marroquín *et al.*, 2004).

3.4.2 Preparación de impresiones de tejidos

3.4.2.1 Preparación de impresiones de tejidos para las pruebas serológicas

Se realizan cortes netos de brotes tiernos, pecíolos de hojas, pedúnculos de frutos u ovarios de flores. Las secciones recién cortadas se presionan con cuidado contra una membrana de nitrocelulosa o de éster de celulosa (0,45 mm) y la huella o impresión se deja secar durante 2-5 min. Para las pruebas serológicas rutinarias, deberían hacerse al menos dos impresiones por cada pedúnculo o brote seleccionado (una de cada extremo del brote) y una por cada pecíolo u ovario. Las membranas con las impresiones se pueden conservar durante varios meses en un lugar seco y oscuro.

3.4.2.2 Preparación de impresiones de tejidos y de frotis de áfidos para las pruebas de amplificación molecular

Se recomienda tomar el material vegetal a mano para evitar la contaminación de las muestras con las tijeras. Se toman alrededor de la copa del árbol brotes tiernos con hojas completamente desarrolladas o maduras. Se presionan los pecíolos de dos hojas o dos brotes directamente sobre papel Whatman¹ 3MM (0,45 mm) o sobre una membrana de nailon de carga positiva. Según Bertolini *et al.* (2008), se realizan varias impresiones parcialmente superpuestas de distintas hojas sobre aproximadamente 0,5 cm² del papel o la membrana. La huella o impresión se deja secar durante 2-5 min. Para las pruebas de amplificación molecular rutinarias, se debería hacer una impresión por cada pecíolo seleccionado. Los especímenes individuales de áfidos se aplastan directamente sobre papel Whatman¹ 3MM o sobre una membrana de nailon de carga positiva con la base redondeada de un tubo Eppendorf¹ para conseguir la rotura completa del espécimen (Bertolini *et al.*, 2008). Las membranas impresas o aplastadas se pueden conservar durante varios meses en un lugar seco y oscuro.

Los métodos directos de preparación de muestras (impresión de tejidos o aplastamiento) sin preparación de extractos se han validado como una alternativa a la preparación convencional de extractos para el tratamiento de las muestras (Vidal *et al.*, 2012).

3.4.3 Preparación de extractos de plantas para las pruebas serológicas y de amplificación molecular

Se toman 0,2-0,5 g de material vegetal fresco, se cortan en trozos pequeños con hojas de afeitar desechables o con tijeras tratadas con lejía para evitar la contaminación de una muestra a otra y se colocan en un tubo o una bolsa de plástico adecuados. Los extractos para las pruebas serológicas pueden prepararse en tubos o en bolsas de plástico. Las muestras para las pruebas de amplificación molecular solo deberían prepararse en bolsas de plástico individuales, para evitar la contaminación entre muestras. La muestra se homogeneiza por completo en 4-10 ml (1:20 p/v, a no ser que el fabricante indique otra cosa) de tampón de extracción con un homogeneizador de tejidos eléctrico, un rodillo manual, un martillo o un instrumento similar. El tampón de extracción es solución salina con tampón fosfato (PBS) de pH 7,2-7,4 (8 g de NaCl₂, 0,2 g de KCl, 2,9 g de Na₂HPO₄·12H₂O, 0,2 g de KH₂PO₄, y 1 litro de agua destilada),

¹ En este protocolo de diagnóstico, los métodos (incluidas las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que en ellos se definió el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y/o reproducibilidad alcanzado. El uso de nombres de reactivos, productos químicos o equipo en estos protocolos de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también podrán ser adecuados. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos podrán ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

complementado con un 0,2 % de dietilditiocarbamato de sodio (DIECA) o un 0,2 % de mercaptoetanol, u otro tampón adecuadamente validado.

3.5 Pruebas serológicas

Los ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) con anticuerpos monoclonales o policlonales validados son muy recomendables para analizar numerosas muestras a efectos de detectar e identificar el CTV. La producción de anticuerpos monoclonales específicos de este virus (Vela *et al.*, 1986; Permar *et al.*, 1990) y otros revisada por Nikolaeva *et al.* (1996) resolvió el problema de la especificidad del diagnóstico que presentaban los anticuerpos policlonales (Cambra *et al.*, 2011), y así aumentó la sensibilidad del diagnóstico de las pruebas serológicas. Una mezcla de los dos anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5, o sus versiones recombinantes (Terrada *et al.*, 2000), reconoce todas las cepas del CTV de distintas colecciones internacionales sometidas a la prueba (Cambra *et al.*, 1990). En Cambra *et al.* (2000a) se presenta una descripción, caracterización y validación detalladas de estos anticuerpos monoclonales. Se ha informado que una mezcla de los anticuerpos monoclonales 4C1 y 1D12 producida en Marruecos reacciona contra un amplio espectro de cepas del CTV (Zebzami *et al.*, 1999), pero no hay datos de validación disponibles.

3.5.1 Inmunoimpresión directa-ELISA

La inmunoimpresión directa-ELISA o impresión directa de tejidos-ELISA (en inglés *direct tissue print-ELISA*, o *direct tissue blot immunoassay* [DTBIA]), se realiza según lo indicado en Garnsey *et al.* (1993) y en Cambra *et al.* (2000b) usando el método que se describe a continuación. Plant Print Diagnostics SL¹ comercializa un kit completo (validado por el desempeño de la prueba y en varios estudios publicados), basado en los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5, específicos del CTV (Vela *et al.*, 1986), que incluye membranas impresas con controles positivos y negativos, así como todos los reactivos, tampones y sustrato. Agdia¹ comercializa un kit similar, basado en los anticuerpos 4C1 y 1D12 de Zebzami *et al.* (1999), pero que aún no ha sido validado.

Las membranas impresas previamente con los tejidos (de un tamaño recomendado de aproximadamente 7 × 13 cm) se colocan en un recipiente adecuado (una bandeja, un envase hermético o una bolsa de plástico), se cubren con una solución al 1 % de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) en agua destilada y se incuban durante 1 h a temperatura ambiente, o bien durante la noche, unas 16 h, a 4 °C (se recomienda hacer esto último). Una ligera agitación durante este paso es beneficiosa. La solución de BSA se desecha, pero las membranas se mantienen en el mismo recipiente. Se prepara una solución de los conjugados constituida por concentraciones iguales de los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5 específicos del CTV, marcados con fosfatasa alcalina (aproximadamente 0,1 µg/ml de cada

anticuerpo monoclonal en PBS) o de proteínas fusionadas (scFv-AP/S) de los fragmentos 3DF1 y 3CA5 expresadas en *Escherichia coli* (dilución adecuada en PBS) (Terrada *et al.*, 2000). La solución de los conjugados se vierte sobre las membranas hasta cubrirlas, y las membranas se incuban durante 3 h a temperatura ambiente con agitación suave. Después se desecha la solución de los conjugados. Las membranas y el recipiente se enjuagan con tampón de lavado (PBS, pH 7,2–7,4, con un 0,05 % de Tween 20) y se lavan agitándolas (de forma manual o mecánica) durante 5 min; el tampón de lavado se desecha y el lavado se repite dos veces. A continuación, se vierte sobre las membranas el sustrato para la fosfatasa alcalina -pastillas Sigma¹ Fast de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato / nitroazul de tetrazolio (BCIP/NBT) disueltas, siguiendo las instrucciones del fabricante, hasta alcanzar una concentración final de 0,33 mg/ml de NBT y 0,175 mg/ml de BCIP- y las membranas se incuban estas hasta que aparece un color violeta-púrpura en los controles positivos (unos 10–15 min). La reacción se detiene lavando las membranas con agua corriente. Las membranas se extienden sobre papel absorbente y se dejan secar. Las impresiones se examinan con una lupa de baja potencia (10x a 20x). La presencia de precipitados de color violeta-púrpura en la región vascular del material vegetal revela la presencia del CTV.

3.5.2 DAS-ELISA

El ensayo de inmunoabsorción enzimática en fase doble de anticuerpos (DAS-ELISA) se realiza según lo indicado por Garnsey y Cambra (1991), usando el método que se describe a continuación. Se comercializan kits completos preparados con los anticuerpos monoclonales validados 3DF1 y 3CA5, específicos del CTV (Plant Print Diagnostics SL¹), y con diferentes anticuerpos policlonales (Agdia¹, Agritest¹, Bioreba¹, Loewe¹, Sediag¹).

Se usan dos pocillos de una placa de microvaloración para cada muestra y al menos dos pocillos para los controles positivo y negativo. Se prepara una dilución adecuada de los anticuerpos policlonales o monoclonales (3DF1 y 3CA5) (normalmente con una concentración total de inmunoglobulinas de 1-2 µg/ml) en un tampón de carbonato de pH 9,6 (1,59 g de Na₂CO₃, 2,93 g de NaHCO₃ y 1 litro de agua destilada), y se añaden 200 µl en cada pocillo. La placa se incuba durante 4 h a 37 °C o durante la noche (unas 16 h) a 4 °C. Los pocillos se lavan tres veces con tampón de lavado (PBS, pH 7,2–7,4, con un 0,05 % de Tween 20). A continuación, se añaden en cada pocillo 200 µl del extracto de la planta (Sección 3.4.3). Tras incubar las placas durante 16 h a 4 °C, se lavan tres veces como se describió en la técnica de inmunopresión directa-ELISA (Sección 3.5.1). Se preparan mezclas de anticuerpos policlonales o monoclonales (3DF1 y 3CA5) específicos marcados con fosfatasa alcalina en diluciones adecuadas (aproximadamente 0,1 µg/ml en PBS con un 0,5 % de BSA) y a continuación se añaden 200 µl en cada pocillo. Se incuban durante 3 h a 37 °C. Las placas se lavan otra vez como se describió

en la técnica de inmunopresión directa-ELISA (Sección 3.5.1). Se prepara una solución de 1 mg/ml de fosfatasa alcalina (p-nitrofenil-fosfato) en tampón de sustrato (se diluyen 97 ml de dietanolamina en 800 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 9,8 con HCl concentrado y se completa con agua destilada hasta un volumen total de 1000 ml) y se añaden 200 µl en cada pocillo. Las placas se incuban a temperatura ambiente y se leen a 405 nm, a intervalos regulares, en un plazo de 120 min, o siguiendo las instrucciones del proveedor del anticuerpo policlonal usado.

El ensayo ELISA se considera negativo si el valor medio de la densidad óptica (DO) de los dos pocillos de la muestra duplicada es $<0,1$ o es $<2\times$ el valor de la DO del control negativo de los extractos de plantas sanas. El ensayo ELISA se considera positivo si el valor medio de la DO de los dos pocillos de la muestra duplicada es $\geq 2\times$ el valor de la DO del control negativo de los extractos de plantas sanas. Cuando se usan anticuerpos policlonales, es primordial que los controles negativos sean tan parecidos como sea posible a la matriz analizada en la misma placa.

El método que usa los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5 se validó en una prueba interlaboratorios del proyecto DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). En la Sección 3.7 se compara ese método con otras técnicas y se indican los parámetros de diagnóstico.

Mientras que algunas mezclas de anticuerpos monoclonales detectan con especificidad, sensibilidad y fiabilidad todas las cepas del CTV, algunos anticuerpos policlonales no son específicos y tienen una sensibilidad limitada (Cambra *et al.*, 2011). Por lo tanto, en situaciones en las que se hayan utilizado anticuerpos policlonales en una prueba y la ONPF necesite mayor confianza en la identificación del CTV, se recomienda el uso de métodos adicionales.

3.6 Pruebas moleculares

Tras obtenerse la secuencia completa de nucleótidos del ARN genómico del CTV, se desarrollaron diversos procedimientos de diagnóstico basados en la detección específica de este ácido nucleico, como la hibridación molecular con sondas de ADNc (complementario) o ARNc y varios métodos basados en la transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Moreno *et al.*, 2008). Estos métodos basados en la RT-PCR han mejorado considerablemente la sensibilidad de la detección, y permiten la cuantificación de las copias de ARN vírico en tejido de cítricos infectados o en especies de áfidos virulíferos del CTV (Bertolini *et al.*, 2008). El uso de una técnica de alto rendimiento como la RT-PCR en tiempo real evita la necesidad de un procesamiento posterior a la amplificación (p. ej., la electroforesis en gel); por lo tanto, el diagnóstico es más rápido y existe una probabilidad menor de contaminación cruzada que en la PCR convencional.

Excepto en el caso de la RT-PCR con inmunocaptura (IC), para la que no es necesario el aislamiento del ARN, el ARN debería extraerse aplicando protocolos adecuadamente validados. Las muestras deberían colocarse en bolsas de plástico individuales para evitar la contaminación cruzada durante la extracción. Otra opción es inmovilizar en papel secante o membranas de nailon las manchas de extractos de plantas, las impresiones de secciones histológicas de material vegetal o las muestras obtenidas por aplastamiento y analizarlas mediante RT-PCR en tiempo real (Bertolini *et al.*, 2008). No se recomienda utilizar muestras de manchas o impresiones histológicas en la PCR convencional porque, al tener menor sensibilidad que la RT-PCR en tiempo real, puede dar falsos negativos.

3.6.1 Purificación del ARN, inmunocaptura y síntesis de ADNc

3.6.1.1 Purificación del ARN

La purificación del ARN debería realizarse aplicando protocolos debidamente validados o usando un kit de purificación de ARN según las instrucciones del fabricante. El ARN extraído debería conservarse, hasta que se use como molde, a -70°C (preferiblemente) o a -20°C y durante menos de un año. El ARN debería conservarse en pequeñas cantidades para evitar su degradación por efecto de ciclos repetidos de congelación-descongelación.

3.6.1.2 Inmunocaptura

La inmunocaptura puede utilizarse en lugar de la purificación del ARN. Para este procedimiento, se prepara una mezcla diluida de anticuerpos, que contiene $1\ \mu\text{g/ml}$ de anticuerpos policlonales específicos del CTV o una dilución de anticuerpos monoclonales ($0,5\ \mu\text{g/ml}$ de 3DF1 y $0,5\ \mu\text{g/ml}$ de 3CA5) en tampón de carbonato de pH 9,6 (véase la composición del tampón de carbonato descrita en la Sección 3.5.2). La mezcla de anticuerpos se reparte en microtubos ($100\ \mu\text{l}$ por tubo) y estos se incuban durante 3 h a 37°C . Los tubos recubiertos se lavan dos veces con $150\ \mu\text{l}$ de tampón de lavado estéril (PBS, pH 7,2–7,4, con un 0,05 % de Tween 20; véase la composición del PBS descrita en la Sección 3.4.3). El extracto vegetal ($100\ \mu\text{l}$), que puede clarificarse mediante centrifugación o por filtración con papel de filtro o bien usarse directamente como extracto bruto, se reparte en partes alícuotas en los microtubos recubiertos de anticuerpos. Los tubos se incuban durante al menos 2 h en hielo o durante 2 h a 37°C . Tras esta fase de inmunocaptura, los microtubos se lavan tres veces con $150\ \mu\text{l}$ de tampón de lavado estéril. La síntesis de ADNc y la amplificación mediante PCR se realizan en estos tubos lavados.

3.6.1.3 Síntesis de ADNc

Puesto que la conservación del ARN durante su almacenamiento es problemática, se recomienda sintetizar ADNc, que se puede conservar durante largos períodos con unas

necesidades de temperatura mínimas en comparación con las del ARN. Existen varios kits comerciales para la síntesis de ADNc.

3.6.2 IC-RT-PCR

Según Olmos *et al.* (1999), los cebadores son:

PIN1: 5'-GGT TCA CGC ATA CGT TAA GCC TCA CTT-3'

PIN2: 5'-TAT CAC TAG ACA ATA ACC GGA TGG GTA-3'

La mezcla de la RT-PCR contiene 14,3 µl de agua ultrapura, 2,5 µl de tampón de ADN polimerasa de Taq 10×, 1,5 µl de MgCl₂ 25 mM, 1,25 µl de dNTP 5 mM, 2 µl de Triton X-100 al 4 %, 1 µl de cebador PIN1 25 µM, 1 µl de cebador PIN2 25 µM, 1,25 µl de sulfóxido de dimetilo (DMSO), 0,1 µl de transcriptasa inversa AMV 10 U/µl y 0,1 µl de ADN polimerasa de Taq 5 U/µl. La mezcla de reacción (25 µl) se añade directamente a los microtubos recubiertos de anticuerpos y lavados. Los parámetros de ciclado para la RT-PCR son: 45 min a 42 °C y 2 min a 92 °C seguidos de 40 ciclos de 30 s a 92 °C, 30 s a 60 °C y 1 min a 72 °C, con una fase de extensión final de 10 min a 72 °C seguida de enfriamiento a 8 °C. El tamaño esperado del amplicón es de 131 pares de bases (pb).

El método se validó en una prueba interlaboratorios del proyecto DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). En la Sección 3.7 se presenta una comparación con otras técnicas y se indican los parámetros de diagnóstico.

3.6.3 RT-PCR anidada con IC en un único tubo cerrado

Según Olmos *et al.* (1999), los cebadores son:

PEX1: 5'-TAA ACA ACA CAC ACT CTA AGG-3'

PEX2: 5'-CAT CTG ATT GAA GTG GAC-3'

PIN1: 5'-GGT TCA CGC ATA CGT TAA GCC TCA CTT-3'

PIN2: 5'-TAT CAC TAG ACA ATA ACC GGA TGG GTA-3'

El dispositivo de compartimentación de un microtubo de 0,5 ml para la RT-PCR anidada en un único tubo cerrado corresponde a lo indicado por Olmos *et al.* (1999). La mezcla maestra de la RT-PCR está formada por dos mezclas de reacción:

A (vertida en el fondo del microtubo): 15,8 µl de agua ultrapura, 3 µl de tampón de ADN polimerasa de Taq 10×, 3,6 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de dNTP 5 mM, 2,2 µl de Triton X-100 al 4 %, 0,6 µl de cebador PEX1 25 µM, 0,6 µl de cebador PEX2 25 µM, 1,5 µl de DMSO, 0,2 µl de transcriptasa inversa AMV 10 U/µl y 0,5 µl de ADN polimerasa de Taq 5 U/µl.

B (colocada en el cono): 2,6 µl de agua ultrapura, 1 µl de tampón de ADN polimerasa de Taq 10×, 3,2 µl de cebador PIN1 25 µM y 3,2 µl de cebador PIN2 25 µM.

Los parámetros de ciclado para la RT-PCR son: 45 min a 42 °C y 2 min a 92 °C seguidos de 25 ciclos de 30 s a 92 °C, 30 s a 45 °C y 1 min a 72 °C). Tras este primer paso, el tubo se agita con el vórtex y se centrifuga (a 6000 r. p. m. durante 5 s) para mezclar B con los productos de la primera amplificación. A continuación, se vuelve a poner el tubo en el termociclador y la reacción prosigue de la siguiente forma: 40 ciclos de 30 s a 92 °C, 30 s a 60 °C y 1 min a 72 °C, con una fase de extensión final de 10 min a 72 °C seguida de enfriamiento a 8 °C. El tamaño esperado del amplicón es de 131 pb.

El método se validó en una prueba interlaboratorios del proyecto DIAGPRO (Cambra *et al.*, 2002). En la Sección 3.7 se presenta una comparación con otras técnicas y se indican los parámetros de diagnóstico.

3.6.4 Consideraciones generales relativas a la RT-PCR y la RT-PCR anidada

Es posible que los protocolos de RT-PCR deban modificarse y optimizarse cuando se usen reactivos o termocicladores diferentes.

Si se usa la RT-PCR convencional para la detección del CTV, se recomienda la RT-PCR con IC. La RT-PCR convencional sin IC no es sensible y podrá dar falsos negativos. Es posible que la presencia de inhibidores afecte la sensibilidad de la RT-PCR convencional.

La prueba de una muestra es negativa si no se detecta el amplicón específico del CTV del tamaño esperado en la muestra en cuestión, pero sí en todos los controles positivos. La prueba de una muestra es positiva si se detecta el amplicón específico del CTV del tamaño esperado en la muestra en cuestión, siempre que no haya amplificación en ninguno de los controles negativos.

3.6.5 RT-PCR en tiempo real

Se han descrito dos ensayos de RT-PCR en tiempo real, uno por Bertolini *et al.* (2008) y otro por Saponari *et al.* (2008).

Según Bertolini *et al.* (2008), los cebadores y la sonda son:

3'UTR1: 5'-CGT ATC CTC TCG TTG GTC TAA GC-3'

3'UTR2: 5'-ACA ACA CAC ACT CTA AGG AGA ACT TCT T-3'

181T: FAM-TGG TTC ACG CAT ACG TTA AGC CTC ACT TG-TAMRA

La reacción se produce en un volumen final de 25 µl. La mezcla de la RT-PCR en tiempo real contiene 0,95 µl de agua ultrapura, 12,5 µl de mezcla maestra para RT-PCR AgPath-ID One-Step 2× (Applied Biosystems¹), 1 µl de mezcla de enzimas para RT-PCR 25×, 2,4 µl de cebador 3'UTR1 10 µM, 2,4 µl de cebador 3'UTR2 10 µM, 0,75 µl de sonda marcada con FAM 181T 5 µM y 5 µl de ARN extraído o desprendido de una membrana añadidos a 20 µl de la mezcla de la RT-PCR en tiempo real. Los parámetros de ciclado son: 10 min a 45 °C y 10 min a 95 °C seguidos de 45 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 60 °C. El tamaño esperado del amplicón es de 95 pb.

Para la RT-PCR en tiempo real con inmunopresión se estimó una sensibilidad de diagnóstico de 0,98, una especificidad de 0,85 y una razón de verosimilitud positiva y negativa de 6,63 y 0,021, respectivamente (Vidal *et al.*, 2012). Estos parámetros de diagnóstico muestran que la RT-PCR en tiempo real con inmunopresión es más sensible que la inmunopresión directa-ELISA, lo que valida su uso para la detección y el diagnóstico rutinarios del CTV, y hace que sea muy recomendable para evaluar la condición de libre del CTV de cualquier material vegetal. La alta sensibilidad de esta técnica permite el análisis preciso de muestras compuestas (de lotes de hasta 10 árboles o plantas de vivero) como una sola muestra para diagnóstico en pruebas realizadas en cualquier época del año, y también permite analizar especies de áfidos para detectar concentraciones bajas del CTV. En la Sección 3.7 se describen otros parámetros de diagnóstico para la validación de la RT-PCR en tiempo real con inmunopresión.

Según Saponari *et al.* (2008), los cebadores y la sonda son:

P25F: 5'-AGC RGT TAA GAG TTC ATC ATT RC-3'

P25R: 5'-TCR GTC CAA AGT TTG TCA GA-3'

CTV-CY5: CY5-CRC CAC GGG YAT AAC GTA CAC TCG G

La reacción se produce en un volumen final de 25 µl. La mezcla de la RT-PCR en tiempo real contiene: 6,6 µl de agua ultrapura, 12,5 µl del kit de RT-PCR para sondas iScript One-Step 2× (Bio-Rad1), 0,5 µl de la supermezcla de transcriptasa inversa iScript, 1 µl del cebador P25F 10 µM, 2 µl del cebador P25R 10 µM, 0,4 µl de sonda CTV-CY5 5 µM y 2 µl de ARN extraído o desprendido de una membrana añadidos a 23 µl de la mezcla de la RT-PCR en tiempo real. Los parámetros de ciclado son: 2 min a 55 °C y 5 min a 95 °C seguidos de 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 30 s a 59 °C. El tamaño esperado del amplicón es de 101 pb.

No se han descrito parámetros de diagnóstico (sensibilidad, especificidad, exactitud, razón de verosimilitud positiva y negativa y probabilidad de enfermedad tras la prueba) para este protocolo de RT-PCR en tiempo real.

3.6.7 Interpretación de los resultados de la RT-PCR convencional y en tiempo real

3.6.1 Controles para las pruebas moleculares

Para considerar fidedigno el resultado de las pruebas, en cada serie de aislamiento de ácidos nucleicos y de amplificación del ácido nucleico de la plaga objetivo, o ácido nucleico objetivo, se deberían tener en cuenta los controles adecuados, que dependerán del tipo de prueba utilizada y del grado de certidumbre necesario. Para la RT-PCR, deberían utilizarse, como mínimo, un control positivo de ácido nucleico y un control negativo de amplificación (control sin molde).

Control positivo del ácido nucleico. Este control se utiliza para determinar la eficiencia del método de prueba (aparte de aquella de la extracción) y en la RT-PCR, de la amplificación. Se podrá utilizar ARN previamente preparado (almacenado) o material vegetal infectado por el CTV impreso en una membrana. El ARN almacenado o las preparaciones del CTV deberían comprobarse periódicamente para determinar la calidad del control conforme aumenta el tiempo de almacenamiento.

Control interno. Para la RT-PCR en tiempo real descrita por Saponari *et al.* (2008), podría incorporarse en el protocolo ARNm (mensajero) del gen mitocondrial *NADH deshidrogenasa 5* (*nad5*) como control interno, a fin de descartar la posibilidad de falsos negativos debido a deficiencias en la extracción del ácido nucleico o a su degradación, o bien a la presencia de inhibidores de la RT-PCR. Al tratarse del hospedante objetivo, se debe tener cuidado de no contaminar el laboratorio con ADN *nad5*, lo que resultaría en una falsa confianza en la reacción del control interno.

Control negativo de la amplificación (control sin molde). Este control es necesario para la RT-PCR convencional y en tiempo real a fin de descartar falsos positivos por contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción. El agua de calidad apta para PCR libre de ARNasa que se utilizó para preparar la mezcla de reacción se añade en la fase de amplificación.

Control positivo de la extracción Este control se utiliza para asegurar que el ácido nucleico objetivo se haya extraído en una cantidad y con una calidad suficientes para realizar la RT-PCR y que el virus objetivo sea detectable. El ácido nucleico se extrae de tejido infectado del hospedante, de tejidos de plantas sanas o de insectos a los que se ha añadido una concentración del CTV.

En la RT-PCR, deben adoptarse precauciones a fin de evitar la contaminación cruzada por aerosoles procedentes del control positivo o de las muestras positivas.

Control negativo de la extracción. Este control se utiliza para controlar la contaminación durante la extracción del ácido nucleico o la reacción cruzada con el tejido hospedante. El

control comprende ácido nucleico extraído de tejido no infectado del hospedante y posteriormente amplificado. Cuando se prevea analizar muchas muestras positivas se recomienda utilizar varios controles.

3.6.7.1 RT-PCR convencional y RT-PCR con IC

La RT-PCR específica del patógeno solo se considerará válida si:

- 1) el control positivo genera un amplicón del tamaño correcto para el virus, y
- 2) no se producen amplicones del tamaño correcto para el virus en el control negativo de la extracción ni en el control negativo de la amplificación.

Si también se usan cebadores de ARNm del gen mitocondrial *NADH deshidrogenasa 5 (nad5)* de control interno (directo: 5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3', inverso: 5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3'; producto de 181 pb), entonces el control negativo de la extracción (tejido vegetal sano), si se utiliza, el control positivo y cada una de las muestras analizadas deben producir un amplicón de 115 pb. Si no se logra la amplificación de las muestras con los cebadores de control interno, la causa puede ser, por ejemplo, una deficiente extracción del ARN, que no se incluyó el ARN en la mezcla de la reacción, que el extracto de ARN contiene compuestos inhibidores de la RT-PCR o que el ARN se ha degradado.

La prueba de una muestra se considerará positiva si produce un amplicón del tamaño correcto.

3.6.7.2 RT-PCR en tiempo real

La RT-PCR en tiempo real específica del patógeno solo se considerará válida si:

- 1) el control positivo produce una curva de amplificación con los cebadores específicos del virus, y
- 2) el control negativo de la extracción y el control negativo de la amplificación no producen curvas de amplificación con los cebadores específicos del virus.

La prueba de una muestra se considerará positiva si produce una curva de amplificación típica, de tipo exponencial. Cada laboratorio tiene que comprobar el valor de ciclo umbral (Ct) cuando realice la prueba por primera vez.

3.7 Validación mediante un estudio del desempeño de la prueba

En una prueba interlaboratorios del proyecto DIAGPRO (Cabra *et al.*, 2002) realizada por diez laboratorios que analizaron un conjunto de diez muestras codificadas entre las que había muestras de tejido infectado por el CTV y de tejido sano de la colección del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), la técnica de inmunopresión directa-ELISA con anticuerpos monoclonales DF1 y 3CA5 alcanzó una exactitud del 99 % (número de negativos verdaderos y positivos verdaderos diagnosticados por la técnica/número de muestras

analizadas). Esta exactitud es mayor que la obtenida con la técnica DAS-ELISA (98 %), la RT-PCR con IC (94 %) y la RT-PCR anidada con IC en un único tubo cerrado (89 %). La sensibilidad de la inmunopresión directa-ELISA fue de 0,98 mientras que las otras técnicas mencionadas mostraron sensibilidades de 0,96, 0,96 y 0,93, respectivamente (Vidal *et al.*, 2012). La especificidad diagnóstica de la inmunopresión directa-ELISA fue de 1,0, mientras que la de las otras técnicas fue de 1,0, 0,91 y 0,82, respectivamente. El valor predictivo positivo (resultados positivos en pruebas de muestras que efectivamente tienen la enfermedad; Sackett *et al.*, 1991) de la inmunopresión directa-ELISA fue de 1,0, mientras que el valor predictivo positivo de las otras técnicas fue de 1,0, 0,94 y 0,89, respectivamente. El valor predictivo negativo (Sackett *et al.*, 1991) de la inmunopresión directa-ELISA fue de 0,97, mientras que el valor predictivo negativo de las otras técnicas fue de 0,95, 0,94 y 0,88, respectivamente (Harju *et al.*, 2000).

La inmunopresión directa-ELISA con los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA52 demostró ser el método más fiable, sencillo y económico para el análisis rutinario de material vegetal para la detección del CTV en comparación con la indexación biológica en limero mexicano, el ensayo ELISA, la RT-PCR con IC y la RT-PCR anidada con IC (Cambra *et al.*, 2002). La inmunopresión directa-ELISA también fue validada por Ruiz-García *et al.* (2005) y analizada por el mismo equipo para demostrar que era tan sensible como la técnica DAS-ELISA (el sistema detectó el 97 % de los árboles positivos analizando cuatro pecíolos), pero más fácil de realizar y menos costosa. La inmunopresión directa-ELISA con anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA52 para la detección del CTV se comparó con la indexación biológica en limero mexicano y la RT-PCR en tiempo real con inmunopresión (Vidal *et al.*, 2012). Se evaluaron varios parámetros de diagnóstico y se determinó que la inmunopresión directa-ELISA era el método más específico y exacto, y el que mostraba la probabilidad más alta de detectar la enfermedad después de la prueba a cualquier nivel de prevalencia del CTV.

4. Identificación de cepas agresivas del CTV

Para la identificación de cepas del CTV se necesita una prueba biológica, serológica o de amplificación molecular.

No hay métodos basados en el ácido nucleico que permitan tipificar las cepas del CTV según su agresividad porque el CTV es un fenotipo. Todavía se desconoce en gran medida la base genética de la alta variabilidad biológica del CTV (Moreno *et al.*, 2008). También se sabe poco sobre la función biológica de su diversidad y, en particular, sobre los efectos de la recombinación. Además, no hay un sistema normalizado de agrupamiento de genotipos (Harper, 2013). Se han usado muy diversos métodos moleculares para diferenciar entre distintas cepas del CTV, como la hibridación molecular, los patrones de ARNdc (de doble cadena), el análisis

de fragmentos de restricción de ADNc amplificado del CTV, la amplificación mediante PCR de distintas regiones del genoma, la PCR en tiempo real (Moreno *et al.*, 2008; Yokomi *et al.*, 2010), la secuenciación genómica y las micromatrices (chips) de resecuenciación. Más recientemente, se han probado el análisis secuencial de inmunoensayos enzimáticos y el polimorfismo conformacional de cadena simple con electroforesis capilar (Licciardello *et al.*, 2012). Sin embargo, ninguna de estas tecnologías es práctica para la categorización fiable de cepas del CTV de dispersión natural, y ninguna se ha validado todavía; su aplicación se limita a fines de investigación.

Dada la variabilidad genética y biológica del CTV, el uso de técnicas distintas de la secuenciación para identificar sus distintas cepas podrá generar resultados erróneos. El uso de la secuenciación profunda, también conocida como secuenciación de nueva generación, podría aportar en poco tiempo información sobre la secuencia del genoma. No obstante, todavía no se puede relacionar la secuencia de nucleótidos del CTV con las propiedades biológicas y el comportamiento de una determinada cepa (es decir, su agresividad y transmisibilidad). Aunque las cepas del CTV se han clasificado y agrupado en función de su fenotipo, virulencia, rango de hospedantes, composición del epítipo y, más recientemente, por la identidad de la secuencia de uno o más genes (Moreno *et al.*, 2008), no se ha encontrado una correlación clara con el comportamiento biológico (Harper, 2013).

Los métodos recomendados para obtener información sobre las propiedades biológicas de una determinada cepa del CTV son (Figura 2):

- 1) Indexación biológica con varias plantas indicadoras, como *C. aurantifolia*, *C. macrophylla*, *C. sinensis* o *C. paradisi* (cultivar Duncan) para la evaluación del picado del tallo o acanaladuras, y plántulas de *C. aurantium* o *C. limon* para la evaluación del amarilleo de las plántulas (Roistacher, 1991; Ballester-Olmos *et al.*, 1993).
- 2) Reactividad frente al anticuerpo monoclonal MCA13 (Permar *et al.*, 1990), que reconoce un epítipo que está bien conservado en cepas de efectos graves (agresivas) del CTV pero que está ausente en cepas de efectos leves (menos agresivas) (Pappu, *et al.*, 1993). La reacción con el MCA13 está fuertemente asociada con la capacidad para inducir decaimiento en árboles injertados sobre patrones de naranjo amargo o limonero. La mayoría de las cepas del CTV que producen acanaladuras o picado del tallo en toronjero o naranjo dulce son positivas al MCA13.

4.1 Indexación biológica

La indexación biológica de las cepas agresivas del CTV sigue los procedimientos expuestos en la Sección 3.3.

4.2 Pruebas serológicas con MCA13

4.2.1 Inmunoimpresión directa-ELISA

Plant Print Diagnostics SL¹ comercializa un kit completo, basado en el anticuerpo monoclonal MCA13, específico del CTV, que incluye membranas impresas con controles positivos y negativos, así como todos los reactivos, los tampones y el sustrato. El método consiste en lo siguiente.

Las membranas se imprimen con los tejidos y se fijan como se describe en la Sección 3.5.1. Se prepara una solución del anticuerpo monoclonal MCA13, específico del CTV, marcado con fosfatasa alcalina (aproximadamente 0,1 µg/ml en PBS), se vierte sobre las membranas, cubriéndolas, y las membranas se incuban durante 3 h a temperatura ambiente, con agitación ligera. El lavado y tratamiento de las membranas y la lectura e interpretación de los resultados se realizan según lo indicado en la Sección 3.5.1. La presencia de precipitados normalmente pequeños y de color violeta-púrpura en la región vascular del material vegetal revela la presencia de cepas del CTV de mayor agresividad.

4.2.2 DAS-ELISA

El ensayo de DAS-ELISA se realiza según lo indicado en Garnsey y Cambra (1991) usando el método descrito a continuación. Plant Print Diagnostics SL¹ comercializa un kit basado en el anticuerpo monoclonal MCA13 específico del CTV.

El recubrimiento se lleva a cabo como se describe en la Sección 3.5.2. Se añade el anticuerpo monoclonal MCA13, específico del CTV, marcado con fosfatasa alcalina como conjugado, a una dilución adecuada (aproximadamente 0,1 µg/ml en PBS con un 0,5 % de BSA). La incubación, el lavado, la adición del sustrato y la interpretación de los resultados se hace según lo indicado en la Sección 3.5.2.

5. Registros

Los registros y las evidencias deberían conservarse según lo descrito en la Sección 2.5 de la NIMF 27 (Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas).

En los casos en que los resultados del diagnóstico puedan afectar negativamente a otras partes contratantes, en particular en casos de incumplimiento o en áreas donde se detecte el virus por primera vez, se debería conservar también el siguiente material, cuando proceda, de un modo que garantice su rastreabilidad:

- La muestra original debería conservarse a -80 °C, o bien liofilizarse y conservarse a temperatura ambiente.

- Las extracciones de ARN deberían conservarse a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que los impresos de secciones histológicas y/o manchas de extractos de plantas en papel o membranas de nailon deben conservarse a temperatura ambiente.
- Los productos de la amplificación mediante RT-PCR deberían conservarse a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6. Puntos de contacto para información adicional

Puede obtenerse información adicional sobre este protocolo en las siguientes fuentes:

Centro de Protección Vegetal, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113 Moncada, Valencia, España (Mariano Cambra; e-mail: mcambra@ivia.es o mcambra@mcambra.es).

Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 7712, 91540-000 Porto Alegre, Brasil (Edson Bertolini; e-mail: edson.bertolini@ufrgs.br; tel.: +55 (51) 3308 8100).

APHIS-USDA-PPQ-CPHST, 4700 River Road, Riverdale, MD 20737 Estados Unidos de América (Laurene Levy; e-mail: laurene.levy@aphis.usda.gov; tel.: +1 301 851 2078; fax: +1 301 734 8724).

Citrus Research International (CRI), PO Box 28, 1200 Nelspruit, Mpumalanga, Sudáfrica (S. P. Fanie van Vuuren; e-mail: faniev@cri.co.za).

Alico, Inc., Suite 100, 10070 Daniels Interstate Court, Fort Myers, FL 33913, Estados Unidos de América (Marta Isabel Francis; e-mail: mfrancis@alicoinc.com; tel.: +1 863 673 4774).

Podrán presentar una solicitud de revisión de un protocolo de diagnóstico las organizaciones nacionales de protección fitosanitaria (ONPF), las organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) o los órganos auxiliares de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF) a través de la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (ippc@fao.org), que a su vez remitirá la solicitud al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

7. Agradecimientos

El primer proyecto del presente protocolo fue redactado por M. Cambra (IVIA, España [véase la sección anterior]), E. Bertolini (IVIA, España [véase la sección anterior; actualmente en UFRGS]), L. Levy (APHIS-USDA, Estados Unidos [véase la sección anterior]); S. P. F. van Vuuren (CRI, Sudáfrica [véase la sección anterior]) y M. I. Francis, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) (Uruguay) [véase la sección anterior; actualmente en Alico, Inc.].

La mayoría de las técnicas descritas se sometieron a pruebas interlaboratorios en el proyecto DIAGPRO, financiado por la Unión Europea, o se evaluaron en proyectos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España.

8. Referencias

En el presente anexo se hace referencia a las normas internacionales para medidas fitosanitarias (NIMF). Las NIMF están disponibles en el Portal fitosanitario internacional (PFI):

<https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>.

Albertini, D., Vogel, R., Bové, C. y Bové, J. M. 1988. Transmission and preliminary characterization of *Citrus tristeza virus* strain K. En L. W. Timmer, S. M. Garnsey y L. Navarro, eds. *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. págs. 17–21. Riverside, CA. (www.iocv.org/proceedings.html).

Ballester-Olmos, J. F., Pina, J. A., Carbonell, E., Moreno, P., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M. y Navarro, L. 1993. Biological diversity of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology*, 42: 219–229.

Bar-Joseph, M., Marcus, R. y Lee, R. F. 1989. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 291–316.

Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., De Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J. y Cambra, M. 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 177–188.

Broadbent, P., Bevington, K. R. y Coote, B. G. 1991. Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain protection. En R. H. Brlansky, R. F. Lee y L. W. Timmer, eds. *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. págs. 64–70. Riverside, CA (www.iocv.org/proceedings.html).

Cambra, M., Boscia, D., Gil, M., Bertolini, E. y Olmos, A. 2011. Immunology and immunological assays applied to the detection, diagnosis and control of fruit tree viruses. En A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse y W. Jelkmann, eds. *Virus and virus-like disease of pome and stone fruits*, págs. 303–313. Saint Paul, MN, APS Press. 429 págs.

Cambra, M., Garnsey, S. M., Permar, T. A., Henderson, C. T., Gumph, D. y Vela, C. 1990. Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology*, 80: 103.

- Cambra, M., Gorris, M. T., Marroquín, C., Román, M. P., Olmos, A., Martínez, M. C., Hermoso de Mendoza, A., López, A. y Navarro, L.** 2000a. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian Community of Spain. *Virus Research*, 71: 85–95.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Román, M.P., Terrada, E., Garnsey, S.M., Camarasa, E., Olmos, A. y Colomer, M.** 2000b. Routine detection of *Citrus tristeza virus* by direct Immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies. *En J. da Graça, R. F. Lee y R. K. Yokomi, eds. Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV).*, págs. 34–41. Riverside, CA. (www.iocv.org/proceedings.html).
- Cambra, M., Gorris, M. T., Olmos, A., Martínez, M. C., Román, M. P., Bertolini, E., López, A. y Carbonell, E. A.** 2002. European Diagnostic Protocols (DIAGPRO) for *Citrus tristeza virus* in adult trees. *En J. da Graça, R. Milne y L. W. Timmer, eds. Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV).* págs. 69-77. Riverside, CA, (www.iocv.org/proceedings.html)
- Duran-Vila, N. y Moreno, P.** 2000. *Enfermedades de los cítricos*. Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF) N.º 2. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa Libros y SEF (www.sef.es). 165 págs.
- Garnsey, S. M. y Cambra, M.** 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens. *En C. N. Roistacher, ed. Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis*, págs. 193–216. Roma, FAO. 286 págs.
- Garnsey, S. M. y Lee, R. F.** 1988. Tristeza. *En J. O. Whiteside, S. M. Garnsey y L. W. Timmer, eds. Compendium of citrus diseases*, págs. 48–50. APS Press. St. Paul, MN. 80 págs.
- Garnsey, S. M., Permar, T. A., Cambra, M. y Henderson, C. T.** 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). *En P. Moreno, J. da Graça y L. W. Timmer, eds. Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV).* págs. 39-50. Riverside, CA. (www.iocv.org/proceedings.html).
- Gottwald, T. R., Garnsey, S. M., Cambra, M., Moreno, P., Irej, M. y Borbón, J.** 1997. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of *Citrus tristeza virus*. *Fruits*, 52: 397–404.
- Gottwald, T. R., Polek, M. L. y Riley, K.** 2002. History, present incidence, and spatial distribution of *Citrus tristeza virus* in the California Central Valley. *En N. Duran-Vila, R. G. Milne y J. V. da Graça, eds. Proceedings of the 15th Conference of the International*

- Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. págs. 83-94. Riverside, CA, (www.iocv.org/proceedings.html).
- da Graça, J. V. y van Vuuren, S. P.** 2010. Managing *Citrus tristeza virus* losses using cross protection. En A. V. Karasev y M. E. Hilf, eds. *Citrus tristeza virus complex and tristeza diseases*, págs. 247–260. Eagan, MN, APS Press. 304 págs.
- Harju, V. A., Henry, C. M., Cambra, M., Janse, J. y Jeffries, C.** 2000. Diagnostic protocols for organisms harmful to plants-DIAGPRO. *EPPO Bulletin*, 30: 365–366.
- Harper, S. J.** 2013. *Citrus tristeza virus*: Evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology*, doi:10.3389/fmicb.2013.00093.
- Harper, S. J., Dawson, T. E. y Pearson, M. N.** 2008. Molecular analysis of the coat protein and minor coat protein genes of New Zealand *Citrus tristeza virus* isolates that overcome the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Australasian Plant Pathology*, 37: 379–386.
- Ilharco, F. A., Sousa-Silva, C. R. y Alvarez-Alvarez, A.** 2005. First report on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) in Spain and continental Portugal. *Agronomia Lusitana*, 51: 19–21.
- Licciardello, G., Raspagliesi, D., Bar-Joseph, M. y Catara, A.** 2012. Characterization of isolates of *Citrus tristeza virus* by sequential analyses of enzyme immunoassays and capillary electrophoresis-single-strand conformation polymorphisms. *Journal of Virological Methods*, 181: 139–147.
- Marroquín, C., Olmos, A., Gorris, M. T., Bertolini, E., Martínez, M. C., Carbonell, E. A., Hermoso de Mendoza, A. H. y Cambra, M.** 2004. Estimation of the number of aphids carrying *Citrus tristeza virus* that visit adult citrus trees. *Virus Research*, 100: 101–108.
- Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Martí, M. R., Guerri, J. y Peña, L.** 2008. *Citrus tristeza virus*: A pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, doi:10.1111/J.1364-3703.2007.00455.X.
- Nikolaeva, O. V., Karasev, A. V., Powell, C. A., Gumpf, D. J., Garnsey, S. M. y Lee, R. F.** 1996. Mapping of epitopes for *Citrus tristeza virus*-specific monoclonal antibodies using bacterially expressed coat protein fragments. *Phytopathology*, 86: 974–979.
- Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M. T. y Terrada, E.** 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Research*, 27: 1564–1565.
- Pappu, H. R., Manjunath, K. L., Lee, R. F. y Niblett, C. L.** 1993. Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 3641–3644.

- Permar, T. A., Garnsey, S. M., Gumpf, D. J. y Lee, R.** 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 80: 224–228.
- Roistacher, C.N.** 1991. *Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis*. Roma, FAO. 286 págs.
- Román, M. P., Cambra, M., Juárez, J., Moreno, P., Durán-Vila, N., Tanaka, F. A. O., Alves, E., Kitajima, E. W., Yamamoto, P. T., Bassanezi, R. B., Teixeira, D. C., Jesús Jr, W. C., Ayres, J. A., Gimenes-Fernandes, N., Rabenstein, F., Girotto, L. F. y Bové, J. M.** 2004. Sudden death of citrus in Brazil: A graft transmissible, bud union disease. *Plant Disease*, 88: 453–467.
- Ruiz-García, N., Mora-Aguilera, G., Rivas-Valencia, P., Ochoa-Martínez, D., Góngora-Canul, C., Loeza-Kuk, E. M., Gutiérrez-E., A., Ramírez-Valverde, G. y Álvarez-Ramos, R.** 2005. Probability model of *Citrus tristeza virus* detection in the tree canopy and reliability and efficiency of direct immunoprinting-ELISA. En M. E. Hilf, N. Duran-Vila y M. A. Rocha-Peña, eds. *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. págs. 196-204. Riverside, CA. (www.iocv.org/proceedings.html).
- Sackett, D. L., Haynes, R. B., Guyatt, G. H. y Tugwell, P.** 1991. *Clinical epidemiology: A basic science for clinical medicine*, segunda edición. Boston, MA, Little Brown and Co. 441 págs.
- Saponari, M., Manjunath, K. y Yokomi, R. K.** 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 147: 43–53.
- Terrada, E., Kerschbaumer, R. J., Giunta, G., Galeffi, P., Himmler, G. y Cambra, M.** 2000. Fully “Recombinant enzyme-linked immunosorbent assays” using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 90: 1337–1344.
- Timmer, L. W., Garnsey, S. M. y Graham, J. H.** 2000. *Compendium of citrus diseases*. Saint Paul, MN, APS Press. 92 págs.
- Vela, C., Cambra, M., Cortés, E., Moreno, P., Miguet, J., Pérez de San Román, C. y Sanz, A.** 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. *Journal of General Virology*, 67: 91–96.
- Vidal, E., Yokomi, R. K., Moreno, A., Bertolini, E. y Cambra, M.** 2012. Calculation of diagnostic parameters of advanced serological and molecular tissue-print methods for detection of *Citrus tristeza virus*. A model for other plant pathogens. *Phytopathology*, 102: 611-619.

- Yokomi, R. K., Garnsey, S.M., Civerolo, E. L. y Gumpf, D.** 1989. Transmission of exotic citrus tristeza isolates by a Florida colony of *Aphis gossypii*. *Plant Disease*, 73: 552–556.
- Yokomi, R. K., Saponari, M. y Sieburth, P. J.** 2010. Rapid differentiation and identification of potential severe strains of *Citrus tristeza virus* by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Phytopathology*, 100: 319–327.
- Zebzami, M., Garnsey, S. M., Nadori, E. B. y Hill, J. H.** 1999. Biological and serological characterization of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates from Morocco. *Phytopathologia Mediterranea*, 38: 95–100.

9. Figuras

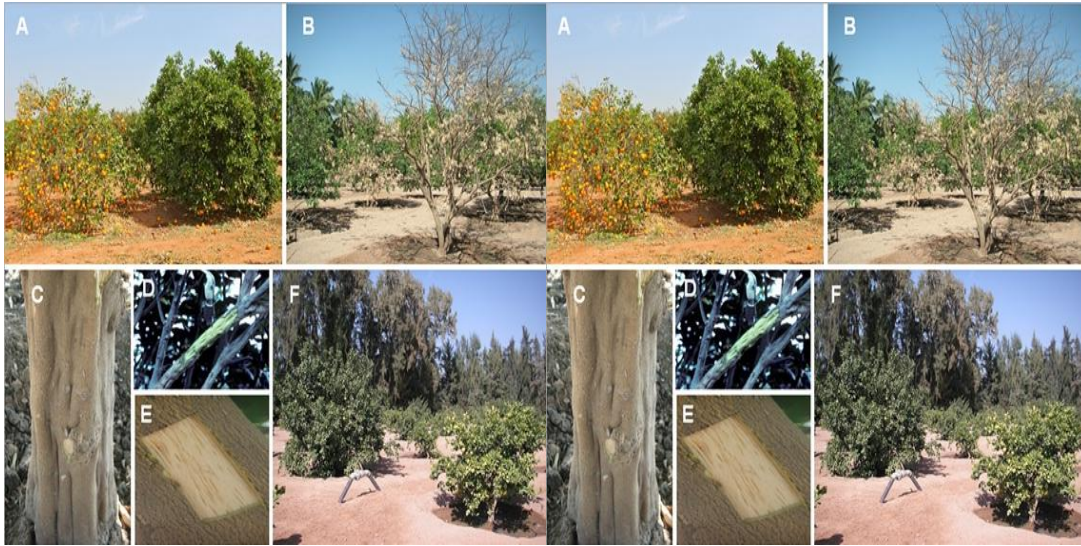


Figura 1. Síntomas de la infección por el virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV): A) síndrome de tristeza o decaimiento en naranjo dulce injertado sobre naranjo amargo infectado por el CTV (izquierda.) y árbol sin síntomas (derecha.); B) colapso o decaimiento rápido en toronjero injertado sobre naranjo amargo; C) acanaladuras en el tronco de un toronjero injertado sobre citrange Troyer causadas por una cepa agresiva de CTV; D) acanaladuras graves en las ramas de un toronjero; E) acanaladuras en el tronco de un naranjo dulce injertado sobre mandarino Cleopatra, y F) enanismo pronunciado en naranjos dulces injertados sobre citrange Carrizo infectados por el CTV (derecha.) comparados con un árbol sano (izquierda.).

Fotografías por gentileza de A: P. Moreno; B, C y E: M. Cambra; D: L. Navarro, y F: M. Cambra y J.A. Pina, todos del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, IVIA, Moncada (España).

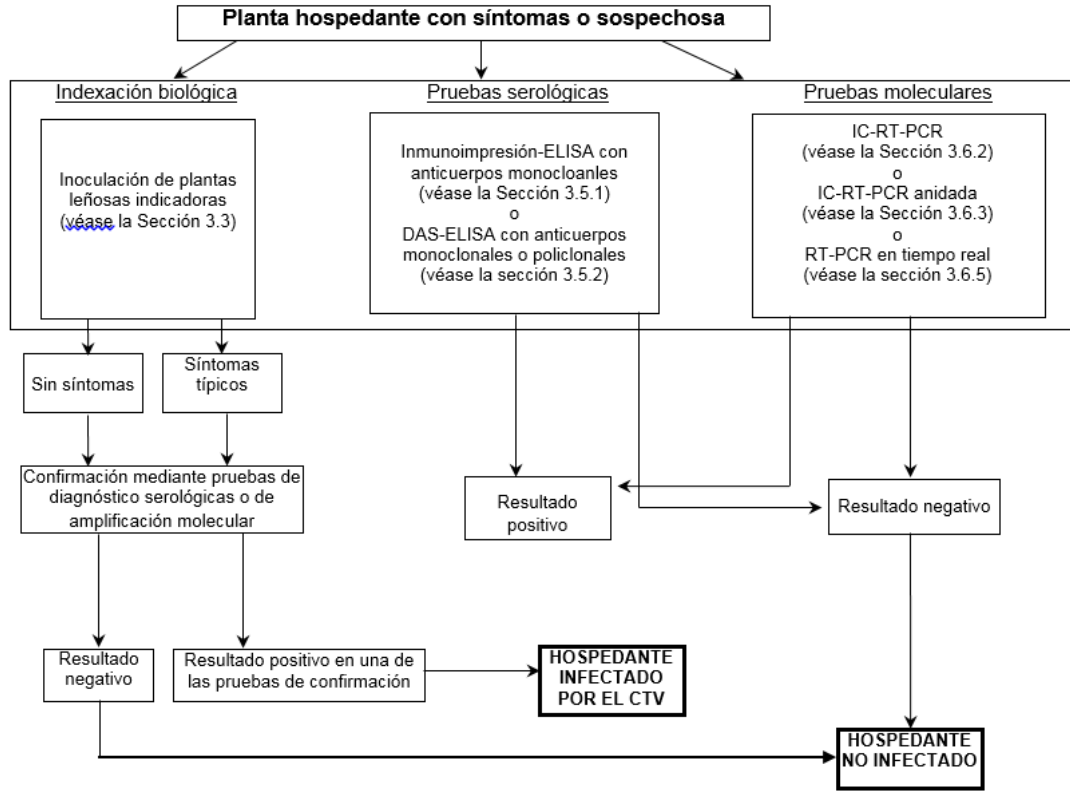


Figura 2. Diagrama de flujo para la detección y la identificación del virus de la tristeza de los cítricos (CTV).

DAS, fase doble de anticuerpos; ELISA: ensayo de inmunoabsorción enzimática; IC: inmunocaptura; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; RT: transcripción inversa.

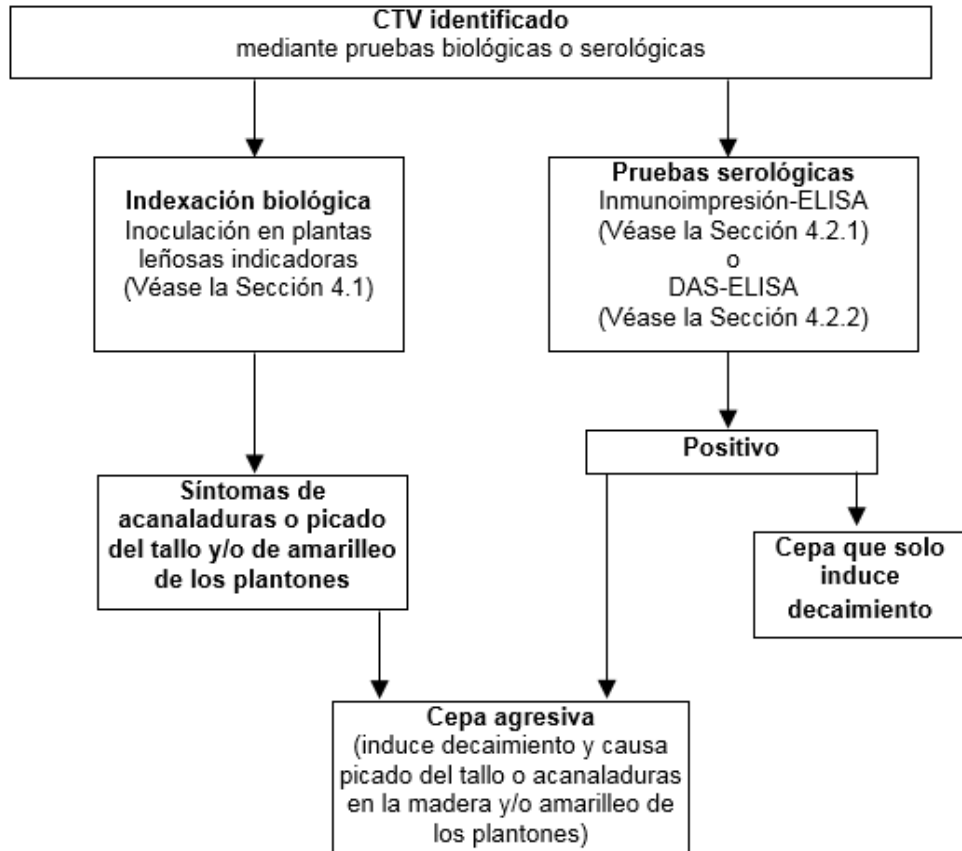


Figura 3. Diagrama de flujo para la identificación de cepas agresivas del virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV).

DAS: fase doble de anticuerpos; ELISA: ensayo de inmunoabsorción enzimática.

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma.

- 2004-11: El CN presentó la cuestión original: *Virus de la tristeza de los cítricos* (2004-021).
- 2006-04: La CMF-1 añadió esta cuestión al tema del programa de trabajo: Virus y fitoplasmas (2006-009).
- 2006-04: La CMF-1 (2006) añadió este tema al programa de trabajo: Nematodos (2006-008).
- 2014-04: Consulta de expertos.
- 201-01: El CN aprobó presentar el texto para consulta a los miembros (2015_eSC_May_02).
- 2015-02: Consulta a los miembros.
- 2015-12: El grupo de redacción del PD examinó el proyecto de DP y las respuestas a las observaciones de los miembros.
- 2015-11: Presentación al CN a efectos de su aprobación para el período de notificación del PD (2016_eTPDP_Feb_02).
- 2016-03: El CN decidió por medios electrónicos someter la aprobación del PD al período de notificación de 45 días (2016_eSC_May_10).
- 2016-08: El CN adoptó el PD en nombre de la CMF (no se recibieron objeciones).
- NIMF 27. Anexo 15.** *Virus de la tristeza de los cítricos* (2016). Roma, CIPF, FAO.
- 2018-01: El GRE para el Español y el Servicio de Traducción de la FAO revisaron este PD y la Secretaría de la CIPF incorporó las modificaciones conformemente.
- Última actualización de la historia de publicación: 2018-01.

CIPF

La Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) es un acuerdo internacional de sanidad vegetal que tiene como objetivo proteger las plantas cultivadas y silvestres previniendo la introducción y propagación de plagas. Los viajes y el comercio internacional hoy son más abundantes que nunca antes. En el desplazamiento de personas y mercancías por todo el mundo, los acompañan organismos que representan riesgos para las plantas.

La organización

- ◆ Hay más de 180 partes contratantes de la CIPF
- ◆ Cada parte contratante tiene una organización nacional de protección fitosanitaria (ONPF) y un contacto oficial de la CIPF
- ◆ Nueve organizaciones regionales de protección fitosanitaria (ORPF) obran para facilitar la aplicación de la CIPF en los países
- ◆ La CIPF se enlaza con las organizaciones internacionales pertinentes a fin de contribuir a la creación de capacidad regional y nacional
- ◆ La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) proporciona la Secretaría de la CIPF

Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF)

Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia

Tel. +39 06 5705 4812

Correo electrónico: ippc@fao.org | Web: www.ippc.int

