

Esta página se ha dejado en blanco intencionalmente

NIMF 27

Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas

PD 2: *Virus de la sharka del ciruelo*

Adoptado en 2018; publicado en 2019

ÍNDICE

1	Información sobre la plaga	2
2.	Información taxonómica.....	3
3.	Detección e identificación	3
3.1	Rango de hospedantes	3
3.2	Síntomas.....	4
3.3	Detección biológica.....	4
3.4	Muestreo para las pruebas serológicas y moleculares.....	5
3.5	Detección e identificación serológica	5
3.5.1	Ensayo indirecto de inmunoabsorción enzimática en fase doble de anticuerpos (DASI-ELISA).....	6
3.5.2	Ensayo de inmunoabsorción enzimática en fase doble de anticuerpos (DAS-ELISA).....	6
3.6	Detección e identificación molecular.....	6
3.6.1	Purificación del ARN, inmunocaptura y síntesis de ADNc	7
3.6.2	Transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	7
3.6.3	Inmunocaptura seguida de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR)	8
3.6.4	Transcripción inversa cooperativa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (Co-RT-PCR)	8
3.6.5	Transcripción inversa en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa	9
4.	Identificación de las cepas	11
4.1	Identificación serológica de las cepas	12
4.2	Identificación molecular de las cepas.....	12
4.2.1	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.....	12
4.2.2	Inmunocaptura seguida de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa.....	13
4.2.3	Transcripción inversa cooperativa, reacción en cadena de la polimerasa	13
4.2.4	Transcripción inversa en tiempo real, reacción en cadena de la polimerasa.....	13
5.	Controles para las pruebas moleculares.....	14
6.	Registros	15
7.	Puntos de contacto para información adicional	15
8.	Agradecimientos	16
9.	Referencias	16

1 Información sobre la plaga

La sharka (viruela del ciruelo) es una de las enfermedades virales más graves de los frutales de hueso. En 1917-18 se comunicó por primera vez la presencia de la enfermedad en *Prunus domestica*, en Bulgaria, y en 1932 se describió como una enfermedad viral. Desde entonces, el virus se ha dispersado de forma progresiva en gran parte de Europa, alrededor de la cuenca mediterránea y en el Cercano Oriente. Se ha localizado con una distribución restringida en América del Sur, América del Norte y Asia (EPPO, 2006; CABI, 2018).

La sharka, causada por el *Plum pox virus* (PPV), afecta a las plantas del género *Prunus* (familia Rosaceae). Es especialmente perjudicial para *Prunus armeniaca*, *P. domestica*, *P. persica* y *P. salicina* porque reduce la calidad y causa caída temprana de los frutos. Se estima que desde la década de 1970, los costos relacionados con el manejo de la sharka en el mundo superan los 10 000 millones de euros (Cambra *et al.*, 2006b).

El PPV pertenece al género *Potyvirus* de la familia de los *Potyviridae*. Sus partículas son varillas flexuosas de aproximadamente 700 nm × 11 nm y están formadas por una molécula de ARN monocatenaria de casi 10 000 nucleótidos, cubiertos de hasta 2 000 subunidades de una sola proteína de envoltura (García *et al.*, 2014). El PPV se transmite en el campo por áfidos de forma no persistente, pero el movimiento del material vegetal propagativo infectado es la vía principal de dispersión del PPV a larga distancia. La transmisión por semilla y por polen no ha sido confirmada (Pasquini y Barba, 2006; Ilardi y Tavazza, 2015). En condiciones experimentales, el PPV se puede transmitir de forma mecánica a numerosas especies de *Prunus* y a varias especies herbáceas como *Arabidopsis thaliana*, *Chenopodium foetidum*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana glutinosa* y *Pisum sativum* (Barba *et al.*, 2011).

Los aislamientos de PPV pueden clasificarse actualmente en nueve cepas monofiléticas: D (Dideron), M (Marcus), C (Cherry), EA (El Amar), W (Winona), Rec (Recombinant), T (Turkish), CR (Cherry Russian) y An (Ancestor Marcus) (James *et al.*, 2013). Las cepas tienen secuencias genómicas específicas y se diferencian en cuanto a su sintomatología, patogenicidad, rango de hospedantes, epidemiología y transmisibilidad por áfidos. La mayoría de aislamientos de PPV pertenece a las cepas D y M. Las cepas de PPV D y M pueden infectar con facilidad *P. armeniaca* y *P. domestica*, pero difieren en su capacidad para infectar cultivares de *P. persica*. La patogenicidad de las diversas cepas es diferente; por ejemplo, los aislamientos de tipo M suelen causar epidemias más rápidas y síntomas más graves que los aislamientos de tipo D en *P. armeniaca*, *P. domestica*, *P. persica* y *P. salicina*. Los aislamientos de tipo EA se restringen geográficamente a Egipto y se dispone de poca información sobre su epidemiología y sus propiedades biológicas. En varios países europeos se han identificado aislamientos de PPV que infectan a *P. avium* y *P. cerasus*. Dichos aislamientos forman dos cepas diferentes definidas como PPV-C y PPV-CR. Se detectó un PPV atípico en *P. domestica* en Canadá (PPV-W) que representa otra cepa de PPV. La cepa PPV-W ha sido detectada posteriormente en varios países en Europa (James *et al.*, 2013). Además, se han descrito como PPV-Rec. recombinantes naturales entre las cepas D y M, los cuales muestran un comportamiento epidemiológico similar al de la cepa D. En Turquía se ha informado sobre un segundo tipo de cepa recombinante que se ha definido como cepa T (Ulubaş Serçe *et al.*, 2009). Se ha descrito un único aislamiento de PPV-An y se ha propuesto como posible ancestro de PPV-M (Palmisano *et al.*, 2012). También se ha propuesto una posible cepa adaptada al cerezo ácido (Tat), que no es C ni CR (Chirkov *et al.*, 2016).

Para más información sobre el PPV, con ilustraciones y síntomas de la enfermedad, consúltense Barba *et al.* (2011), CABI (2018), EPPO (2004, 2006, 2018b), García *et al.* (2014) y PaDIL (2018).

2. Información taxonómica

Nombre:	<i>Plum pox virus</i> (PPV)
Sinónimo:	Virus de la sharka
Posición taxonómica:	Potyviridae, Potyvirus
Nombres comunes:	Viruela del ciruelo, enfermedad de la sharka

3. Detección e identificación

La detección de PPV puede lograrse mediante un método biológico, serológico o molecular, mientras que para su identificación se requiere el uso de un método serológico o molecular. Una prueba que utilice un método serológico o molecular es el requisito mínimo para la detección e identificación de PPV, en particular en el diagnóstico rutinario si se sabe que la plaga está establecida ampliamente en un país. En caso de que la organización nacional de protección fitosanitaria (ONPF) requiera mayor confianza en la identificación de PPV (p. ej. la detección en un área en la que no se sabe si el virus está presente, o en un envío procedente de un país en el que se declara que el virus está ausente), podrán realizarse más pruebas para confirmar la identificación. En los casos en que la identificación inicial se haya realizado utilizando un método molecular, la confirmación debería, preferiblemente, realizarse utilizando un método con una sensibilidad analítica mayor o, de ser posible, utilizando un método específico para una región genómica o secuencia diferentes. También podrán realizarse pruebas adicionales, en particular mediante métodos serológicos para componentes proteicos específicos o métodos que permitan identificar la cepa de PPV que está presente. En todos los casos, deben incluirse controles negativos y positivos en las pruebas. En las siguientes secciones se describen las técnicas recomendadas.

En el presente protocolo de diagnóstico se describen métodos bien establecidos para la detección y la identificación de PPV. Se han utilizado ciertas técnicas nuevas y avanzadas para la detección de PPV, como la amplificación isotérmica mediada por asas (Varga y James, 2006b) y la secuenciación de nueva generación (Rodamilans *et al.*, 2014). No obstante, como la secuenciación de nueva generación y la amplificación isotérmica mediada por asas (LAMP)¹ no han sido validadas aún plenamente como instrumentos para la detección rutinaria de PPV, con descripciones de los protocolos publicadas, estas técnicas no se han incluido en el presente protocolo de diagnóstico.

En este protocolo de diagnóstico, los métodos (incluidas las referencias a nombres comerciales) se describen según se publicaron, ya que en ellos se define el nivel inicial de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad adquirido. 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 PPV infecta con facilidad árboles frutales del género *Prunus* (familia Rosaceae) utilizados como variedades comerciales o portainjertos. Los principales hospedantes son *Prunus armeniaca*, *P. cerasifera*, *P. davidiana*, *P. domestica*, *P. mahaleb*, *P. marianna*, *P. mume*, *P. persica*, *P. salicina* e híbridos interespecíficos entre dichas especies. Hay cepas de PPV (C y CR) adaptadas al cerezo que infectan de forma natural *P. avium* y *P. cerasus* (James *et al.*, 2013). El PPV podrá infectar ocasionalmente a *Prunus dulcis* (Llácer y Cambra, 2006). El virus también infecta muchas especies silvestres y ornamentales de *Prunus* como *P. besseyi*, *P. cistena*, *P. glandulosa*,

¹ Cuando se usa de forma regular la amplificación de tipo LAMP en un área que cuenta con un sistema de patentes como el Japón (patentes 3.313.358, 3.974.441 y 4.139.424), los Estados Unidos de América (US6.410.278, US6.974.670 y US7.494.790), la Unión Europea (1.020.534, 1.873.260, 2.045.337 y 2.287.338), China (ZL008818262), la República de Corea (10-0612551), Australia (779160) y la Federación de Rusia (2.252.964), los usuarios deben recibir una licencia de Eiken Chemical Co., Ltd antes de usar el método.

P. insititia, *P. laurocerasus*, *P. spinosa*, *P. tomentosa* y *P. triloba* (James y Thompson, 2006). En condiciones experimentales, el PPV puede transmitirse de forma mecánica a un gran número de *Prunus* spp. y a muchas plantas herbáceas (véase la Sección 1).

3.2 Síntomas

Los síntomas del PPV podrán manifestarse en hojas, brotes, corteza, pétalos, frutos y huesos en el campo. Suelen ser distinguibles en las hojas temprano en la temporada de crecimiento; consisten en una ligera discromía verde claro; manchas, franjas o anillos cloróticos; aclaramiento o amarillamiento de las nervaduras; o deformación foliar. Algunos de estos síntomas foliares se parecen a los que provocan otros virus, como el *virus del arabesco americano del ciruelo*. *P. cerasifera* ‘GF 31’ muestra un encorchado de color óxido y resquebrajamiento de la corteza.

Los síntomas florales podrán incluir discromía (vetas rosáceas) en los pétalos florales y la rotura de flores (Barba *et al.*, 2011). Estos síntomas florales pueden darse en algunos cultivares de *P. persica* cuando se infectan por PPV-M o en *P. glandulosa* infectado por PPV-D.

Los frutos infectados muestran manchas cloróticas o anillos o líneas con una ligera pigmentación amarilla. Los frutos pueden deformarse o adoptar una forma irregular y desarrollar zonas marrones o necróticas bajo los anillos discrómicos. Ciertas deformaciones del fruto, especialmente en *P. armeniaca* y *P. domestica*, son similares a las provocadas por el *virus de la mancha clorótica de la hoja del manzano*. Los frutos enfermos podrán mostrar pardeamiento interno y gomosis de la carne, y además pérdida de calidad. En los casos graves, los frutos enfermos caen prematuramente del árbol. Por lo general, los frutos de los cultivares de maduración temprana muestran síntomas más marcados que los de maduración tardía. Los huesos de los frutos enfermos de *P. armeniaca* típicamente muestran manchas o anillos de tono pálido. El alcohol o los licores que se producen a partir de estos frutos no son comercializables debido a su desagradable sabor.

La aparición de síntomas y su gravedad dependen en gran medida de la planta hospedante y de las condiciones climáticas. En climas fríos, el virus podrá estar latente durante varios años.

Los síntomas en diversos hospedantes pueden verse, por ejemplo, en el sitio web de la base de datos mundial de la OEPP (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas): <https://gd.eppo.int/taxon/PPV000>.

3.3 Detección biológica

Las principales plantas indicadoras para la indexación de PPV son plántulas de *P. cerasifera* ‘GF 31’, *P. persica* ‘GF 305’, *P. persica* × *P. davidiana* ‘Nemaguard’, o *P. tomentosa*. Las plantas indicadoras crecen a partir de semilla, se plantan en una mezcla de suelo bien drenada y se mantienen en un invernadero protegido contra insectos entre los 18 °C y los 25 °C hasta que son lo suficientemente grandes para la injertación (normalmente 25-30 cm de alto con un diámetro de 3-4 mm). Como alternativa se pueden injertar púas de plantas indicadoras en plántulas de otras especies de *Prunus*. La inoculación mediante injertos de los indicadores debe realizarse siguiendo métodos convencionales, como la gemación (Desvignes, 1999), con al menos cuatro réplicas por planta indicadora. Las plantas indicadoras injertadas se mantienen en las mismas condiciones y, tres semanas después, se podan hasta unos pocos centímetros sobre el injerto (Gentit, 2006). Las plantas injertadas deberían inspeccionarse durante por lo menos seis semanas para constatar si presentan síntomas. Los síntomas, en especial las líneas y franjas cloróticas, se observan en las partes nuevas de la planta después de 3-4 semanas y deben compararse con controles positivos y sanos. En Damsteegt *et al.* (1997, 2007) y Gentit (2006) pueden encontrarse ilustraciones de los síntomas provocados por el PPV en las plantas indicadoras.

No existen datos cuantitativos publicados sobre la especificidad, sensibilidad o fiabilidad de la injertación. Este método se utiliza de forma generalizada en programas de certificación y se considera un método sensible de detección. Sin embargo, no se trata de una prueba rápida (el desarrollo del síntoma requiere muchas semanas tras la inoculación); solo puede emplearse en material de propagación;

requiere instalaciones dedicadas como un espacio de invernadero con temperatura controlada; y los síntomas observados pueden confundirse con los de otros agentes transmisibles por injerto. Además, existen cepas asintomáticas que, justamente por no inducir síntomas, no son detectables en las plantas indicadoras.

También pueden utilizarse plantas herbáceas para la detección biológica de PPV (Barba *et al.*, 2011). El PPV puede transmitirse de forma mecánica a varias especies herbáceas (véase la Sección 1).

3.4 Muestreo para las pruebas serológicas y moleculares

La NIMF 31 (*Metodologías para muestreo de envíos*) proporciona orientación general sobre las metodologías de muestreo. En ciertas circunstancias (p. ej. en el diagnóstico rutinario de una plaga establecida ampliamente en un país), se podrán efectuar pruebas sobre varias plantas simultáneamente, utilizando una muestra múltiple obtenida de un cierto número de plantas. La decisión de realizar las pruebas en muestras de una sola planta o muestras múltiples dependerá de la concentración del virus en las plantas y del nivel de confianza requerido por la ONPF. El material vegetal de *Prunus* a menudo se envía en forma de estaquillas durmientes. En este caso, solo las yemas o el tejido del floema (raspaduras de la corteza) pueden utilizarse directamente para las pruebas.

Para detectar el PPV es imprescindible que la selección de las muestras sea adecuada. El muestreo debería tener en cuenta la biología del virus y las condiciones climáticas locales, en particular las condiciones del tiempo durante la temporada de crecimiento. Si se encuentran síntomas típicos, deberían recolectarse muestras de flores, hojas o frutos que presenten los síntomas. De las plantas asintomáticas deberían tomarse muestras de brotes de por lo menos un año que tengan hojas maduras o completamente desarrolladas, de la parte central de cada una de las ramas principales (la detección no es fiable en brotes de menos de un año). Las muestras deberían tomarse, como mínimo, en cuatro sitios diferentes (p. ej., cuatro ramas o cuatro hojas) de cada planta; esto es indispensable ya que la distribución del PPV es desigual. El muestreo no debería realizarse durante los meses de temperaturas más altas. Las pruebas son menos fiables si se realizan con muestras tomadas durante el otoño que con las obtenidas anteriormente, en primavera. El material vegetal debería recogerse preferiblemente de las partes internas de la copa del árbol. En primavera, las muestras pueden ser flores, brotes con las hojas totalmente desarrolladas o frutos. En verano y en otoño pueden utilizarse para el análisis las hojas maduras y la piel de los frutos maduros recogidos del campo o de los lugares de embalaje. En verano, pueden utilizarse yemas de estaquillas durmientes para pruebas mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) o PCR en tiempo real, que son también las técnicas preferidas para analizar las hojas maduras. Las flores, las hojas, los brotes y la piel del fruto pueden almacenarse a una temperatura de 4 °C por no más de 10 días antes del procesamiento. Los frutos pueden almacenarse durante un mes a una temperatura de 4 °C antes del tratamiento. En invierno, pueden usarse para las pruebas las yemas dormidas o los tejidos de corteza de la zona basal de ramillas, brotes y ramas, o espolones enteros.

3.5 Detección e identificación serológica

Los ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA) son muy recomendables para someter a análisis grandes cantidades de muestras.

Para el procesamiento de la muestra se corta en trozos pequeños aproximadamente 0,2-0,5 g de material vegetal fresco, que se coloca en un tubo o una bolsa de plástico adecuados. La muestra se homogeneiza en aproximadamente 4-10 ml (1:20 p/v) de tampón de extracción (o lo que recomiende el fabricante del kit ELISA) usando un homogeneizador eléctrico de tejidos o un rodillo manual, martillo o instrumento similar. El tampón de extracción es salino con tampón fosfato (PBS) de pH 7,2-7,4, con un 2 % de polivinilpirrolidona y un 0,2 % de dietilditiocarbamato de sodio (Cambra *et al.*, 1994), o un tampón alternativo adecuado. El material vegetal debería homogeneizarse por completo y utilizarse fresco.

3.5.1 Ensayo indirecto de inmunoabsorción enzimática en fase doble de anticuerpos (DASI-ELISA)

El DASI-ELISA, también denominado ensayo de inmunoabsorción enzimática en fase triple de anticuerpos (TAS-ELISA), debería realizarse según lo indicado por Cambra *et al.* (1994) con un anticuerpo monoclonal específico como 5B-IVIA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se ha comprobado que el anticuerpo monoclonal (MAb) 5B-IVIA detecta la mayoría de las cepas de PPV, aunque no todas (Cambra *et al.*, 2006a). El MAb 5B-IVIA detectará la presencia de la cepa CR, pero en los aislamientos para análisis debe ajustarse el pH a 6,0 para optimizar el reconocimiento del MAb 5B-IVIA (Glasa *et al.*, 2013; Chirkov *et al.*, 2013). El MAb 5B-IVIA también permite detectar la posible cepa adaptada al cerezo (Tat) (Chirkov *et al.*, 2016). Sin embargo, no se ha informado de la detección de PPV-An utilizando el MAb 5B-IVIA (Palmisano *et al.*, 2012).

En una prueba del anillo DIAGPRO (Harju *et al.*, 2000) realizada por 17 laboratorios con un grupo de diez muestras, entre las que había tanto muestras infectadas por PPV (PPV-D, PPV-M y PPV-D+M) como muestras sanas de Francia y España, la precisión del DASI-ELISA con el MAb 5B-IVIA fue del 95 % (número de valores negativos y positivos auténticos diagnosticados por la técnica dividido por el número de muestras analizadas). Esta precisión fue mayor que la obtenida con la RT-PCR con inmunocaptura (IC-RT-PCR) que fue del 82 %, o con la RT-PCR cooperativa (Co-RT-PCR) que fue del 94 % (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008). La proporción de valores negativos auténticos (número de valores negativos auténticos diagnosticado por la técnica, dividido por el número de plantas sanas) que se identificó mediante DASI-ELISA con el MAb 5B-IVIA fue del 99,0 %, frente a la RT-PCR en tiempo real con ácido nucleico purificado (89,2 %) o muestras manchadas (98,0 %), o IC-RT-PCR (96,1 %). Capote *et al.* (2009) también informaron que existía una probabilidad del 98,8 % de que un resultado positivo obtenido en invierno con DASI-ELISA utilizando el MAb 5B-IVIA fuera un valor positivo auténtico. Dado que los anticuerpos pueden variar de un lote a otro, debería verificarse su rendimiento antes de utilizarlos de forma rutinaria.

El MAb 5B-IVIA detecta, de forma específica, sensible y fiable, todas las cepas de PPV analizadas (Cambra *et al.*, 1994; Cambra *et al.*, 2006a; Glasa *et al.*, 2013; Chirkov *et al.*, 2013; Chirkov *et al.*, 2016). Existen varios kits comerciales que utilizan anticuerpos policlonales, junto con algunos datos de validación (Gougherty *et al.*, 2015; EPPO, 2018a). No obstante, se ha comprobado que estos kits son menos específicos y que la homogeneidad entre distintos lotes es insuficiente (Cambra *et al.*, 2006a), de modo que deberían ser validados antes de utilizarse. Se recomienda el uso de métodos adicionales en todas las situaciones en que se hayan utilizado anticuerpos policlonales en una prueba y la ONPF necesite más confianza en la identificación del PPV.

3.5.2 Ensayo de inmunoabsorción enzimática en fase doble de anticuerpos (DAS-ELISA)

El sistema de DAS-ELISA convencional o de biotina-estreptavidina utiliza kits basados en el anticuerpo específico monoclonal 5B-IVIA o en anticuerpos policlonales que se haya demostrado que detectan la mayoría de las cepas del PPV, en particular las cepas de mayor difusión, D, M y Rec, sin experimentar reacciones cruzadas con otros virus o con material vegetal sano (Cambra *et al.*, 2006a; Capote *et al.*, 2009). La prueba debería realizarse siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6 Detección e identificación molecular

Los métodos moleculares, como la RT-PCR, podrán ser más caros que los métodos serológicos, en especial en caso de pruebas a gran escala. Sin embargo, los métodos moleculares, en especial la RT-PCR en tiempo real, suelen ser más sensibles que los métodos serológicos. El uso de RT-PCR en tiempo real también evita la necesidad de un proceso de amplificación posterior (p.ej. electroforesis de gel) y, por lo tanto, es más rápido y menos propenso a la contaminación (con el ADN diana) que la PCR convencional.

A excepción de la IC-RT-PCR (para la que no es necesario el aislamiento de ARN), la extracción de ARN debería realizarse con protocolos adecuadamente validados. Las muestras deberían colocarse en bolsas de plástico individuales para evitar la contaminación cruzada durante su extracción. Como alternativa, para la RT-PCR en tiempo real, los aislamientos de plantas manchadas, impresos de secciones histológicas o muestras de material vegetal obtenidas por aplastamiento se pueden inmovilizar en papel secante o membranas de nailon para su análisis (Olmos *et al.*, 2005; Osman y Rowhani, 2006; Capote *et al.*, 2009). Se recomienda utilizar la RT-PCR en tiempo real para las pruebas de muestras manchadas o impresos histológicos, en lugar de la PCR convencional, que es menos sensible.

En cada uno de los métodos siguientes se describe el volumen de la muestra extraída que debería usarse como molde. Dependiendo de la sensibilidad del método, la concentración mínima del molde que se requiere para detectar el PPV varía como sigue: RT-PCR, 100 fg ARN molde/ml; Co-RT-PCR, 1 fg ARN molde/ml; y RT-PCR en tiempo real, 2 fg ARN molde/ml.

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 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (preferiblemente) o a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 constituye una alternativa a la purificación del ARN. Para este procedimiento, se prepara una mezcla diluida de anticuerpos y se usa para recubrir los microtubos empleados para la reacción de la transcripción inversa. El procedimiento se describe con mayor detalle en la Sección 3.6.2.

3.6.1.3 Síntesis de ADNc

Puesto que la conservación del ARN durante su almacenamiento es problemática, se recomienda sintetizar ADNc, dado que se puede conservar durante largos períodos y con unas necesidades de temperatura menores en comparación con las del ARN.

3.6.2 Transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Los cebadores utilizados en los métodos RT-PCR descritos a continuación han sido validados fehacientemente y se consideran referencias para la detección general de PPV aunque pueda haber otros cebadores de amplio espectro disponibles (Olmos *et al.*, 2006). No se observaron resultados de falso positivo en los estudios en los que se describe el desarrollo y la validación de estos métodos (Wetzel *et al.*, 1991; Levy y Hadidi, 1994). Otra ventaja de los cebadores de Wetzel *et al.* (1991) es que permiten también la identificación de las dos cepas más comunes de PPV, cuando se combinan con el análisis del producto de 243 pares de bases (bp) mediante polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción.

Los cebadores RT-PCR utilizados en este método son los cebadores de Wetzel *et al.* (1991):

P1 antisentido (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

P2 sentido (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')

o los de Levy y Hadidi (1994):

3'NCR sentido (5'-GTA GTG GTC TCG GTA TCT ATC ATA-3')

3'NCR antisentido (5'-GTC TCT TGC ACA AGA ACT ATA ACC-3')

La composición de la mezcla de reacción de 25 µl es la siguiente: 1 µM de cada cebador (P1 y P2 o el par cebador 3'NCR), 250 µM dNTP, 1 unidad de transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV)², 0,5 unidades de polimerasa de ADN Taq, 2,5 µl 10 × tampón de polimerasa Taq, 1,5 mM MgCl₂, 0,3% Triton X-100 y 5 µl ARN molde. La reacción se efectúa con los siguientes parámetros de termociclado: 45 min a 42 °C, 2 min a 94 °C, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s o bien a 60 °C (cebadores P1 y P2) o a 62 °C (cebadores 3'NCR) y 60 s a 72 °C, seguido de una extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de la PCR se analizan con electroforesis de gel. El par de cebadores P1 y P2 produce un amplicón de 243 bp y los cebadores 3'NCR producen un amplicón de 220 bp.

El método de Wetzel *et al.* (1991) se evaluó analizando aislamientos de PPV de áreas mediterráneas (Chipre, Egipto, España, Francia, Grecia y Turquía). Se pudieron detectar 10 fg de ARN viral, correspondiente a 2 000 partículas virales (Wetzel *et al.*, 1991). Levy y Hadidi (1994) evaluaron su método con aislamientos de PPV de Alemania, Egipto, España, Francia, Grecia, Hungría, Italia y Rumania.

3.6.3 Inmuncaptura seguida de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR)

La fase de inmuncaptura podrá realizarse siguiendo las indicaciones de Wetzel *et al.* (1992), con savia vegetal extraída como se indica en la Sección 3.5 y utilizando tubos o bolsas de plástico individuales para evitar la contaminación. Podrá utilizarse cualquier anticuerpo validado adecuadamente. Esta prueba ha sido validada solo para aislamientos de las cepas de distribución amplia D y M.

Se prepara una disolución (1 µg/ml) de anticuerpos policlonales o de un anticuerpo monoclonal específico de PPV (p. ej., 5B-IVIA) en un tampón de carbonato de pH 9,6. Se dispensan porciones de 100 µl de anticuerpo diluido en tubos de PCR y se incuban a 37 °C durante 3 h. A continuación, los tubos se lavan dos veces con 150 µl de PBS-Tween estéril (tampón de lavado), y se enjuaga dos veces con agua libre de RNase. Se aclara el aislamiento vegetal (100 µl; véase la Sección 3.5) mediante centrifugación (5 min a 15 500 g), y se añade el sobrenadante a los tubos recubiertos para PCR. Los tubos se incuban durante 2 h en hielo a una temperatura de 37 °C y luego se lavan tres veces con 150 µl de PBS-Tween estéril. Se prepara la mezcla de reacción RT-PCR como se describe en la Sección 3.6.2 utilizando los cebadores de Wetzel *et al.* (1991), y se añade directamente a los tubos recubiertos para PCR. La amplificación se realiza como se describe en la Sección 3.6.2.

En general, la IC-RT-PCR requiere el empleo de anticuerpos específicos, aunque con los métodos de enlace directo podrá eliminarse esta necesidad. La IC-RT-PCR con anticuerpo monoclonal 5B-IVIA ha sido validada en una prueba del anillo DIAGPRO mostrando una precisión del 82 % en la detección del PPV (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008). Capote *et al.* (2009) informaron de una probabilidad del 95,8% de que un resultado positivo obtenido en invierno mediante IC-RT-PCR con el anticuerpo monoclonal 5B-IVIA fuera un valor positivo auténtico.

3.6.4 Transcripción inversa cooperativa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (Co-RT-PCR)

Los cebadores RT-PCR utilizados en esta Co-RT-PCR son los cebadores de Wetzel *et al.* (1991; P1 y P2) y Olmos *et al.* (2002; P10 y P20):

Cebador interno P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

Cebador interno P2 (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')

Cebador externo P10 (5'-GAG AAA AGG ATG CTA ACA GGA-3')

Cebador externo P20 (5'-AAA GCA TAC ATG CCA AGG TA-3')

² 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.

La mezcla de reacción de 25 µl está formada por los siguientes componentes: 0,1 µM de cebadores P1 y P2, 0,05 µM de cebadores P10 y P20, 400 µM de dNTP, 2 unidades de transcriptasa inversa AMV, 1 unidad de polimerasa de ADN Taq, 10 × tampones de reacción de 2,5 µl, 3 mM de MgCl₂, un 5 % de dimetil sulfóxido, un 0,3 % de Triton X-100 y 5 µl de molde de ARN. La RT-PCR se efectúa con los siguientes parámetros de termociclado: 45 min a 42 °C, 2 min a 94 °C, 60 ciclos de 15 s a 94 °C, 15 s a 50 °C y 30 s a 72 °C, seguido de una extensión final de 10 min a 72 °C.

La reacción RT-PCR se une a la detección colorimétrica de amplicones usando una sonda universal de PPV marcada con dioxigenina (DIG) en el extremo 3' (5'-TCG TTT ATT TGG CTT GGA TGG AA-DIG-3') como se indica a continuación. El ADNc amplificado se desnaturaliza a 95 °C durante 5 min e inmediatamente se coloca en hielo. Se coloca una porción de 1 µl de muestra en una membrana de nailon. A continuación, la membrana se seca a temperatura ambiente y se entrecruza por exposición a UV en un transiluminador durante 4 min a 254 nm. Para la prehibridación, se coloca la membrana en un tubo de hibridación a 60 °C durante 1 h utilizando un tampón de hibridación estándar. La solución se descarta y se lleva a cabo la hibridación mezclando la sonda marcada con 3'DIG con un tampón de hibridación estándar en una concentración final de 10 pmol/ml, antes de incubar durante 2 h a 60 °C. La membrana se lava dos veces durante 15 min a temperatura ambiente con solución de lavado 2 x y dos veces durante 15 min a temperatura ambiente con solución de lavado 0,5 x. A continuación, la membrana se equilibra durante 2 min en un tampón de lavado antes de remojarla durante 30 min en una solución de bloqueo al 1% (1 g de reactivo de bloqueo disuelto en 100 ml de tampón de ácido maleico) esterilizada. La membrana se incuba a temperatura ambiente con anticuerpos anti-DIG conjugados con fosfatasa alcalina en una concentración de trabajo de 1:5 000 en una solución de bloqueo al 1 % (p/v) durante 30 min. A continuación, la membrana se lava dos veces durante 15 min con tampón de lavado, y se equilibra durante 2 min con tampón de detección (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5). La solución de sustrato se prepara mezclando 45 µl de una solución de NBT (75 mg ml⁻¹ sal de nitroazul de tetrazolio en un 70 % (v/v) dimetilformamida) y 35 µl de una solución de BCIP (50 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato, sal de toluidina en un 100 % de dimetilformamida) en 10 ml de tampón de detección. Después de la incubación con el sustrato, la reacción se detiene lavando con agua.

Se ha comprobado que este método es 100 veces más sensible que el método de RT-PCR de Wetzel *et al.* (1991) (Olmos *et al.*, 2002). Fue validado en la prueba del anillo de DIAGPRO, en la que tuvo una precisión del 94 % (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008).

3.6.5 Transcripción inversa en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa

La RT-PCR en tiempo real se puede llevar a cabo tanto mediante la prueba de TaqMan como con la del SYBR Green I². Se han descrito dos métodos de TaqMan para la detección universal del PPV (Schneider *et al.*, 2004; Olmos *et al.*, 2005). En el primer método se utilizaron los cebadores y la sonda TaqMan que se especifican en Schneider *et al.* (2004):

Cebador directo (5'-CCA ATA AAG CCA TTG TTG GAT C-3')

Cebador inverso (5'-TGA ATT CCA TAC CTT GGC ATG T-3')

Sonda TaqMan (5'-FAM-CTT CAG CCA CGT TAC TGA AAT GTG CCA-TAMRA-3').

La composición de la mezcla de reacción de 25 µl es la siguiente: 1 × mezcla de reacción (0,2 mM de cada uno de los dNTP y 1,2 mM de MgSO₄); 200 nM de los dos cebadores, directo e inverso; 100 nM de sonda TaqMan; 4,8 mM de MgSO₄; 0,5 µl de *RT/Platinum Taq Mix* (ADN polimerasa *Superscript One-Step RT-PCR with Platinum Taq*; Invitrogen)² y 5 µl de molde de ARN. El proceso RT-PCR se efectúa con los siguientes parámetros de termociclado: 15 min a 52 °C, 5 min a 95 °C, 60 ciclos de 15 s a 95 °C, y 30 s a 60 °C. Los productos obtenidos tras la PCR se analizan en tiempo real según las instrucciones del fabricante del equipo.

El método de Schneider *et al.* (2004) se evaluó analizando aislamientos de PPV-D de los Estados Unidos de América, y aislamientos de las cepas PPV-C, PPV-D, PPV-EA y PPV-M, así como otras ocho especies víricas distintas. Este método resultó específico y capaz de detectar sistemáticamente ARN

vírico en concentraciones de 10-20 fg (Schneider *et al.* 2004). También podría detectar PPV en diversos hospedantes, así como en las hojas, tallos, yemas y raíces de *P. persica*.

En el segundo método se utilizaron los cebadores y la sonda TaqMan que se especifican en Olmos *et al.* (2005):

Cebador P241 (5'-CGT TTA TTT GGC TTG GAT GGA A-3')

Cebador P316D (5'-GAT TAA CAT CAC CAG CGG TGT G-3')

Cebador P316M (5'-GAT TCA CGT CAC CAG CGG TGT G-3')

Sonda PPV-DM (5'-FAM-CGT CGG AAC ACA AGA AGA GGA CAC AGA-TAMRA-3').

La composición de la mezcla de reacción de 25 µl es la siguiente: 1 µM de cebador P241; 0,5 µM de cada uno de los cebadores P316D y P316M; 200 nM de sonda TaqMan; 1 × *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems)²; 1 × *MultiScribe and RNase Inhibitor Mix* (Applied Biosystems)² y 5 µl de molde de ARN. El proceso RT-PCR se efectúa con los siguientes parámetros de termociclado: 30 min a 48 °C, 10 min a 95 °C, y 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 60 s a 60 °C. Los productos obtenidos tras la PCR se analizan en tiempo real según las instrucciones del fabricante del equipo.

El método fue evaluado por Olmos *et al.* (2005) utilizando tres aislamientos de PPV-D y tres de PPV-M y resultó ser 1 000 veces más sensible que el análisis DASI-ELISA usando el anticuerpo monoclonal 5B-IVIA. El porcentaje de positivos reales (número de positivos reales diagnosticados mediante la técnica aplicada dividido por el número de plantas infectadas por PPV) identificados correctamente mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real usando TaqMan (Olmos *et al.*, 2005) y ácido nucleico purificado fue del 97,5 % frente al 93,6 % obtenido mediante la RT-PCR en tiempo real usando muestras manchadas, el 91,5 % obtenido mediante la IC-RT-PCR o el 86,6 % mediante DASI-ELISA usando el anticuerpo monoclonal 5B-IVIA (Capote *et al.*, 2009).

Varga y James (2005) describieron un método basado en la prueba del SYBR Green I² para detectar PPV e identificar, al mismo tiempo, las cepas D y M:

P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

PPV-U (5'-TGA AGG CAG CAG CAT TGA GA-3')

PPV-FD (5'-TCA ACG ACA CCC GTA CGG GC-3')

PPV-FM (5'-GGT GCA TCG AAA ACG GAA CG-3')

PPV-RR (5'-CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3')

Para asegurar la validez de los resultados de la prueba podrán incluirse los siguientes cebadores de control interno (Menzel *et al.*, 2002):

Nad5-F (5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3')

Nad5-R (5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3')

Se usa un protocolo de RT-PCR de dos fases. La composición de la mezcla de reacción de RT es la siguiente: 2 µl de cebador P1 10 µM; 2 µl de cebador Nad5-R 10 µM; 4 µg de ARN total y 5 µl de agua. La mezcla se incuba durante 5 min a 72 °C y después se coloca en hielo. A continuación, se añade lo siguiente: 4 µl de 5 × tampón de primera cadena (Invitrogen)²; 2 µl de ditiotreitól (DTT) 0,1 M; 1 µl de dNTP 10 mM; 0,5 µl de *RNaseOUT* (40 unidades/µl) (Invitrogen)²; 1 µl de transcriptasa inversa *Superscript II* (Invitrogen) y 2,5 µl de agua. La mezcla se incuba a 42 °C durante 60 min, seguidos de 5 min a 99 °C. La composición de los 24 µl de mezcla de reacción de la PCR es la siguiente: 400 nM de cebador PPV-U; 350 nM de cebador PPV-FM; 150 nM de cebador PPV-FD; 200 nM de cebador PPV-RR; 100 nM de cebador Nad5-F; 100 nM de cebador Nad5-R; 200 µM de dNTP; 2 mM de MgCl₂; 1 × tampón Karsai (Karsai *et al.*, 2002); SYBR Green I² diluido a 1:42 000 (Sigma) y 0,1 µl de Platinum *Taq DNA high fidelity polymerase* (Invitrogen)². La mezcla de la reacción se vierte junto con 1 µl de ADNc diluido (1:4) en un tubo PCR estéril. El proceso de PCR se efectúa con los siguientes parámetros de termociclado: 2 min a 95 °C y 39 ciclos de 15 s a 95 °C y 60 s a 60 °C. El análisis de la curva de fusión se lleva a cabo mediante la incubación de 60 °C a 95 °C con una velocidad de fusión de 0,1 °C/s

y ajustando la curva suavizada a un promedio de 1 punto. En las condiciones de Varga y James (2005), las temperaturas de fusión de cada producto son:

- Detección universal de PPV (fragmento de 74 bp): 80,08-81,52 °C
- Cepas D (fragmento de 114 bp): 84,3-84,43 °C
- Cepas M (fragmento de 380 bp): 85,34-86,11 °C
- Control interno (fragmento de 181 bp): 82,45-82,63 °C

Varga y James (2005) evaluaron su método usando aislamientos de PPV-C, PPV-D, PPV-EA, PPV-M y una cepa no caracterizada, en especies de *Nicotiana* y *Prunus*.

4. Identificación de las cepas

En esta sección se describen etapas adicionales para identificar las cepas de PPV (que utilizan DASI-ELISA, RT-PCR, Co-RT-PCR y RT-PCR en tiempo real) (véase la Figura 1). La identificación de la cepa no es un componente esencial de la identificación del PPV, pero una ONPF podrá desear determinarla con el fin de ayudar a predecir su comportamiento epidemiológico.

Debido a la variabilidad de los PPV, las técnicas que no consisten en secuenciar ni se basan en determinadas técnicas PCR (véase más adelante) podrán dar lugar a resultados erróneos para un pequeño porcentaje de aislamientos. Sin embargo, mediante los métodos serológicos o moleculares descritos a continuación (Cambra *et al.*, 2006a; Candresse y Cambra, 2006; Capote *et al.*, 2006) es posible, en general, diferenciar las cepas D y M de PPV entre sí. No se proporcionan técnicas para identificar cepas como las An y T porque los métodos para su identificación no han sido validados y publicados, o porque todavía son demasiado pocos los aislamientos caracterizados.

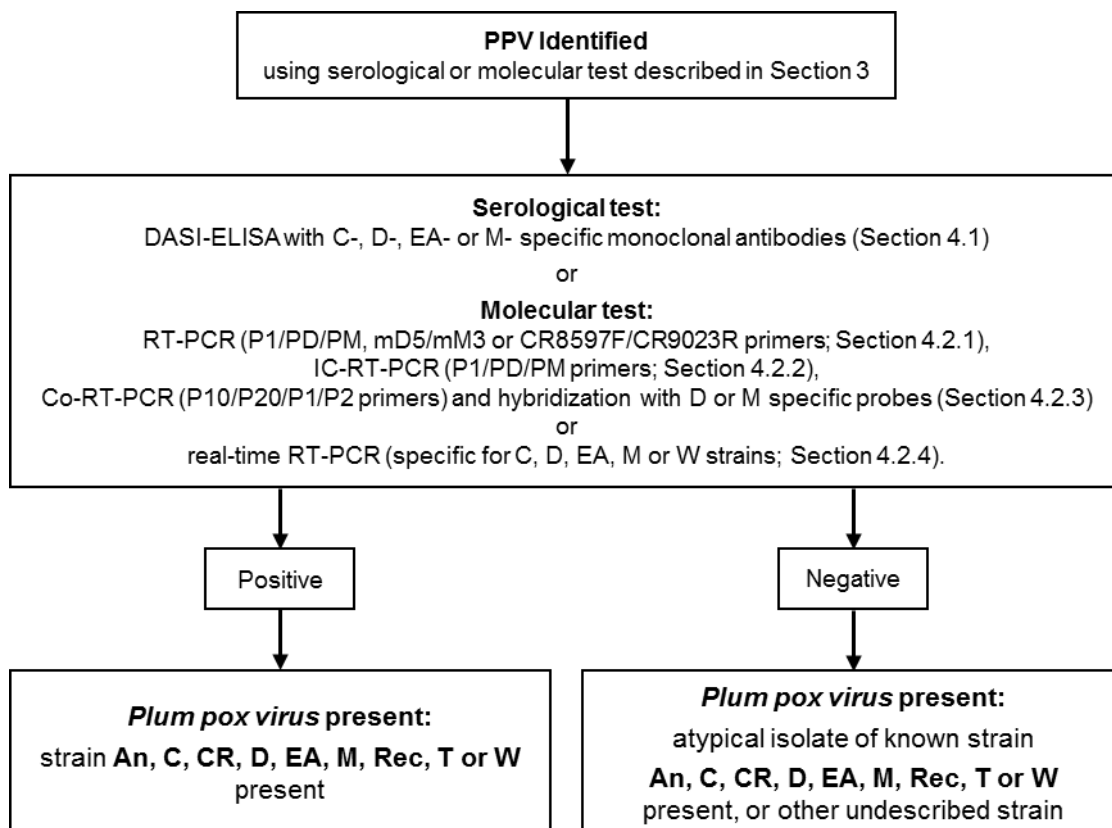


Figura 1. Etapas de los métodos para identificar las cepas del PPV

En los casos en que la ONPF exija una identificación más confiable de la cepa de PPV, podrán realizarse otras pruebas. En presencia de cepas no descritas o atípicas también se debería llevar a cabo una

secuenciación completa del genoma del PPV, la secuencia total o parcial de la proteína de cobertura, P3-6K1, y los genes que codifican la proteína de inclusión citoplasmática.

4.1 Identificación serológica de las cepas

Según se establece en Cambra *et al.* (1994), para diferenciar las dos principales cepas de PPV (D y M) debería llevarse a cabo la prueba de DASI-ELISA usando anticuerpos monoclonales específicos de D y M (Cambra *et al.*, 1994; Boscia *et al.*, 1997) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Este método se ha validado mediante la prueba del anillo de DIAGPRO; los resultados indican una precisión del 84 % para la cepa PPV-D y del 89 % para la PPV-M (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008). El anticuerpo monoclonal 4D es específico del PPV-D pero no reacciona con todos sus aislamientos. Además, el anticuerpo monoclonal utilizado para detectar el PPV-M reacciona con aislamientos pertenecientes a las cepas M, Rec y T, porque estos grupos contienen la misma secuencia de proteína de cobertura. Para diferenciar entre las cepas M, Rec y T, en consecuencia, es necesario realizar una prueba molecular usando un anticuerpo monoclonal específico de la cepa M.

La identificación serológica de los aislamientos de PPV de los grupos EA y C podrá realizarse mediante la prueba DASI-ELISA usando los anticuerpos monoclonales específicos de EA o C que se describen en Myrta *et al.* (1998, 2000). Sin embargo, es necesario validar estos métodos.

4.2 Identificación molecular de las cepas

4.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

Las cepas PPV-D y PPV-M se identifican usando los cebadores descritos en Olmos *et al.* (1997):

P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

PD (5'-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG-3')

PM (5'-CTT CAA CAA CGC CTG TGC GT -3')

La composición de 25 µl de mezcla de reacción de es la siguiente: 1 µM de cebador P1; 1 µM de cebador PD o bien PM; 250 µM de dNTP; 1 unidad de transcriptasa inversa AMV (10 unidades/µl); 0,5 unidades de polimerasa de ADN Taq (5 unidades/µl); 2,5 µl de tampón Taq polimerasa 10 ×; 1,5 mM de MgCl₂; 0,3 % de tritón X-100, 2 % de formamida y 5 µl de molde de ARN. El proceso RT-PCR se efectúa con los siguientes parámetros de termociclado: 45 min a 42 °C, 2 min a 94 °C, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 60 s a 72 °C, seguido de 10 min a 72 °C como extensión final. Los productos obtenidos tras la PCR se analizan por electroforesis de gel. Tanto el par de cebadores P1/PD como el par de cebadores P1/PM producen un amplicón de 198 bp. Olmos *et al.* (1997) evaluaron su método usando seis aislamientos de PPV-D y cuatro de PPV-M.

El RT-PCR en tiempo real con SYBR Green I² de Varga y James (2005), descrito en detalle en la Sección 3.6.5, también es adecuado para la identificación de las cepas D y M de PPV.

El PPV-Rec se identifica usando los cebadores mD5 y mM3, que son los específicos de dicha cepa descritos en Šubr *et al.* (2004):

mD5 (5'-TAT GTC ACA TAA AGG CGT TCT C-3')

mM3 (5'-CAT TTC CAT AAA CTC CAA AAG AC-3')

La composición de 25 µl de la mezcla de reacción es la siguiente (modificada a partir de Šubr *et al.*, 2004): 1 µM de cada cebador; 250 µM de dNTP; 1 unidad de transcriptasa inversa AMV (10 unidades/ µl); 0,5 unidades de polimerasa de ADN Taq (5 unidades/ µl); 2,5 µl de tampón de polimerasa Taq 10×; 2,5 mM de MgCl₂; 0,3 % de tritón X-100 y 5 µl de ARN extraído (véase la Sección 3.6). La transcripción inversa se realiza con cebadores de hexanucleótidos aleatorios a 42 °C durante 45 min (Glasa *et al.*, 2002). La PCR se realiza con una etapa inicial de desnaturalización durante 3 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 60 s a 72 °C y una extensión final durante 7 min a

72 °C (Šubr *et al.*, 2004). Los productos de 605 bp obtenidos tras la PCR se analizan por electroforesis de gel.

El PPV-CR se identifica usando los cebadores CR8597F y CR9023R descritos por Glasa *et al.* (2013):

CR8597F (5'-ATG ATG TGA CGT TAG TGG AC-3')

CR9023R (5'-TCG TGT GTT AGA CAG GTC AAC-3')

Para la detección específica de aislamientos de PPV-CR se utiliza un protocolo de RT-PCR en dos etapas (Glasa *et al.*, 2013). Se sintetiza ADN complementario (ADNc) a partir de los aislamientos de ARN total (NucleoSpin RNA Plant Kit, Macherey-Nagel)² usando cebadores de hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa AMV. A continuación, se añade una porción de ADNc a la mezcla de reacción de la PCR que contiene EmeraldAmp GT PCR Master Mix (TaKaRa Bio Inc.)². El proceso de PCR se efectúa con los siguientes parámetros de termociclado: 60 s a 98 °C, 35 ciclos de 30 s a 98 °C, 30 s a 55 °C y 30 s a 72 °C, seguido de 5 min a 72 °C como extensión final. Los productos obtenidos tras la PCR se analizan por electroforesis de gel. Los cebadores específicos para el extremo 5' de la región codificante de la proteína de envoltura de la cepa CR generan un producto de amplificación de 427 bp. La especificidad de los cebadores para CR fue validada con aislamientos de las cepas D, M, Rec, T, W, EA y C de PPV (Glasa *et al.*, 2013).

4.2.2 Inmuncaptura seguida de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa

La fase de inmuncaptura debería llevarse a cabo tal como se describe en la Sección 3.6.3. La mezcla de reacción de la PCR se vierte directamente a los tubos PCR. La identificación de las cepas PPV-D y PPV-M se realiza tal como se describe en la Sección 4.2.1.

4.2.3 Transcripción inversa cooperativa, reacción en cadena de la polimerasa

Para identificar las cepas PPV-D o PPV-M se debería proceder tal como se indica en la sección 3.6.4 usando sondas marcadas con DIG en el extremo 3' y específicas de las cepas D y M (Olmos *et al.*, 2002):

Sonda específica de PPV-D: 5'-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GGG CA-DIG-3'

Sonda específica de PPV-M: 5'-AAC GCC TGT GCG TGC ACG T-DIG-3'

La fase de hibridación, y la previa a ella, se llevan a cabo a 50 °C con tampones estándares de hibridación previa e hibridación y un 30 % o 50 % de formamida (para identificar las cepas PPV-D o PPV-M, respectivamente). La solución de bloqueo se usa al 2 % (w/v).

4.2.4 Transcripción inversa en tiempo real, reacción en cadena de la polimerasa

En particular, las cepas PPV-D y PPV-M se identifican mediante la prueba química del SYBR Green I² tal como se describe en Varga y James (2005) (véase la Sección 3.6.5) o mediante el método de TaqMan descrito en Capote *et al.* (2006).

Los cebadores y las sondas TaqMan que se usan en el método descrito en Capote *et al.* (2006) son:

Cebador PPV-MGB-F (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')

Cebador PPV-MGB-R (5'-CTC AAT GCT GCT GCC TTC AT-3')

Sonda MGB-D (5'- FAM-TTC AAC GAC ACC CGT A-MGB-3')

Sonda MGB-M (5'-FAM-TTC AAC AAC GCC TGT G-MGB-3').

La composición de 25 µl de la mezcla de reacción es la siguiente: 1 µM de cada cebador; 150 nM de sonda MGB-D o MGB-M marcadas con FAM; 1 × *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems)², 1 × *MultiScribe and RNase Inhibitor Mix* (Applied Biosystems)² y 5 µl de molde de ARN (véase la Sección 3.6). El proceso RT-PCR se efectúa con los siguientes parámetros de termociclado: 30 min a 48 °C, 10 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 60 s a 60 °. Los productos obtenidos tras la

PCR se analizan en tiempo real según las instrucciones del fabricante. Capote *et al.* (2006) evaluaron el método usando 12 aislamientos de la cepa PPV-D y 12 más de la PPV-M, así como 14 muestras infectadas por ambas cepas a la vez.

En particular, las cepas PPV-C, PPV-EA y PPV-W se identificaron usando SYBR Green I² tal como describe el método de Varga y James (2006a). Los cebadores que se utilizan para aplicar esta técnica son:

P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

PPV-U (5'-TGA AGG CAG CAG CAT TGA GA-3')

PPV-RR (5'-CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3')

Para asegurar la validez de los resultados de la prueba podrán incluirse los siguientes cebadores de control interno (Menzel *et al.*, 2002):

Nad5-F (5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3')

Nad5-R (5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3')

La composición de 25 µl de la mezcla de la reacción de RT-PCR es la siguiente: 2,5 µl de una solución acuosa 1:10 (v/v) de ARN extraído (véase la Sección 3.6) y 22,5 µl de mezcla maestra. La composición de la mezcla maestra es la siguiente: 2,5 µl de tampón Karsai (Karsai *et al.*, 2002); 0,5 µl de cada uno de los cebadores 5 µM de PPV-U, PPV-RR o P1, Nad5R y Nad5F; 0,5 µl de dNTP 10 mM ; 1 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,2 µl de *RNaseOUT* (40 unidades/µl, Invitrogen)²; 0,1 µl de transcriptasa inversa *Superscript III* (200 unidades/µl, Invitrogen)²; 0,1 µl de *Platinum Taq DNA high fidelity polymerase* (5 unidades/µl, Invitrogen)²; y 1 µl de SYBR Green I² 1:5 000 (en Tris-ácido etilendiaminotetraacético (TE), pH 7,5) en 16,1 µl de agua. La reacción se efectúa con los siguientes parámetros de termociclado: 10 min a 50 °C, 2 min a 95 °C y 29 ciclos de 15 s a 95 °C y 60 s a 60 °C. El análisis de la curva de fusión se lleva a cabo mediante la incubación de 60 °C a 95 °C con una velocidad de fusión de 0,1 °C/s y ajustando la curva suavizada a un promedio de 1 punto. En las condiciones de Varga y James (2006a), las temperaturas de fusión de cada producto son:

Cepa C (fragmento de 74 bp): 79,84 °C

Cepa EA (fragmento de 74 bp): 81,27 °C

Cepa W (fragmento de 74 bp): 80,68 °C

Varga y James (2006a) evaluaron su método usando un aislamiento de cada una de las cepas PPV-C, PPV-D, PPV-EA y PPV-W.

5. 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 del 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 la de la extracción) y en la RT-PCR, de la amplificación. Se podrá utilizar ARN total de una planta o ARN vírico, o bien material vegetal infectado por el PPV impreso en una membrana. El ARN almacenado o las preparaciones del PPV deberían comprobarse periódicamente para determinar la calidad del control conforme aumenta el tiempo de almacenamiento.

Control interno. Para la RT-PCR, podría incorporarse ARNm (mensajero) del gen mitocondrial de la *NADH deshidrogenasa 5* (*nad5*, Menzel *et al.*, 2002) en el protocolo de la RT-PCR, 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 a la presencia de inhibidores de la RT-PCR.

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 (con el ADN diana) 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 velar por 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 del hospedante infectado por el PPV o de tejidos de plantas sanas o de insectos a los que se ha añadido una concentración del PPV.

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 tanto la contaminación durante la extracción del ácido nucleico como 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 incluir varios controles en orden aleatorio.

En el caso de la IC-RT-PCR, en la que no se realiza extracción de ácido nucleico, debería usarse como control positivo savia de una planta que se sepa que está infectada por el PPV y como control negativo savia de una planta sana. Podrá incluirse también un control negativo de amplificación. Este control se usa para descartar falsos positivos debidos a la contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción. En la fase de amplificación se añade el agua de calidad apta para PCR libre de ARNasa que se utilizó para preparar la mezcla de reacción para su empleo como control negativo de amplificación.

6. Registros

Los registros y las pruebas 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 repercutir sobre otras partes contratantes, en concreto en casos de incumplimiento (NIMF 13, *Directrices para la notificación del incumplimiento y acción de emergencia*) y en áreas en las que se detecte el virus por primera vez, el siguiente material adicional debería conservarse por lo menos durante un año de un modo que garantice su plena rastreabilidad:

- La muestra original (etiquetada adecuadamente) debería conservarse congelada, a ser posible a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, o liofilizarse y conservarse a temperatura ambiente.
- Cuando proceda, deberían conservarse aislamientos de ARN a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y aislamientos de plantas manchadas o impresos de secciones histológicas (en membranas de papel o nailon) a temperatura ambiente.
- Cuando proceda, los productos de la amplificación mediante RT-PCR deberían conservarse a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7. Puntos de contacto para información adicional

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

Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), Servicio de Inspección Zoonosanitaria y Fitosanitaria (APHIS), Protección y Cuarentena Vegetales (PPQ), Science and Technology Beltsville Laboratory, Building 580 BARC-East, Powder Mill Road, Beltsville, MD 20705, Estados Unidos de América (Vessela Mavrodieva; email: vessela.a.mavrodieva@aphis.usda.gov; tel.: +1 3013139208; fax: +1 3023139232).

Equipo de virología del Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia (INRA), Centro de Burdeos, UMR GD2P, IBVM, BP 81, 33883-CEDEX Villenave d'Ornon, Francia (Thierry Candresse, correo electrónico: tc@bordeaux.inra.fr; tel.: +33 557122389; fax: +33 557122384).

Facultad de Horticultura, Departamento de Patología Vegetal, Universidad de Corvinus, Villányi út 29-43, H-1118 Budapest, Hungría (Laszlo Palkovics, correo electrónico: laszlo.palkovics@uni-corvinus.hu; tel.: +36 14825438; fax: +36 14825023).

Instituto de Virología, Academia Eslovaca de Ciencias, Dúbravská, 84505 Bratislava, Eslovaquia (Miroslav Glasa, correo electrónico: virumig@savba.sk; tel.: +421 259302447; fax: +421 254774284).

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Centro de Protección Vegetal y Biotecnología. Carretera Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada, Valencia, España (Antonio Olmos, correo electrónico: aolmos@ivia.es; tel.: +34 963424000; fax: +34 963424001).

Instituto de Virología Vegetal del Consejo Nacional de Investigaciones (CNR) de Italia, sección de Bari, via Amendola 165/A, 70126 Bari, Italia (Donato Boscia, correo electrónico: d.boscia@ba.ivv.cnr.it; tel.: +39 0805443067; fax: +39 0805442911).

Laboratorio de Sidney, Agencia de Inspección Alimentaria de Canadá (CFIA), Columbia Británica, V8L 1H3 Sidney, Canadá (Delano James, correo electrónico: Delano.James@inspection.gc.ca; tel.: +1 250 3636650; fax: +1 250 3636661).

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) por conducto de la Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (ippc@fao.org), quien a su vez remitirá la solicitud al Grupo técnico sobre protocolos de diagnóstico (GTPD).

8. Agradecimientos

El presente protocolo de diagnóstico fue redactado por M. Cambra, A. Olmos y N. Capote (IVIA, España (véase la Sección anterior), N.L. Africander (Departamento Nacional de Agricultura, Actividad Forestal y Pesca, Stellenbosch, Sudáfrica), L. Levy (USDA, Estados Unidos de América (véase la Sección anterior)), S.L. Lenardon (Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal - Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (IFFIVE-INTA), Córdoba, Argentina), G. Clover (Laboratorio Fitosanitario y Medioambiental, Ministerio de Industrias Primarias, Auckland, Nueva Zelanda) y D. Wright (Grupo Fitosanitario, Laboratorio Central de Ciencias, Sand Hutton, York, Reino Unido).

9. Referencias

En el presente anexo puede hacerse referencia a NIMF. Las NIMF están disponibles en el Portal fitosanitario internacional (PFI): <https://www.ippc.int/es/core-activities/standards-setting/ispms>.

Barba, M., Hadidi, A., Candresse, T. y Cambra, M. 2011. *Plum pox virus*. En: A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse y W. Jelkmann, eds. *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*, Capítulo 36. St. Paul, MN, APS Press. 428 págs.

Boscia, D., Zeramdini, H., Cambra, M., Potere, O., Gorris, M. T., Myrta, A., DiTerlizzi, B. y Savino, V. 1997. Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of *Plum pox potyvirus*. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 477-480.

CABI. 2018 Compendio de protección de cultivos. Wallingford (Reino Unido), CABI. (disponible en <http://www.cabi.org/cpc/>, consultado el miércoles, 14 de febrero de 2018).

Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M. T., Pérez, E., Camarasa, E., García, J. A., Moya, J. J., López-Abella, D., Vela, C. y Sanz, A. 1994. Detection of *Plum pox potyvirus* using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *EPPO Bulletin*, 24: 569-577.

- Cambra, M., Boscia, D., Myrta, A., Palkovics, L., Navrátil, M., Barba, M., Gorris, M.T. y Capote, N.** 2006a. Detection and characterization of *Plum pox virus*: serological methods. *EPPO Bulletin*, 36: 254-261.
- Cambra, M., Capote, N., Myrta, A. y Llácer, G.** 2006b. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *EPPO Bulletin*, 36: 202-204.
- Cambra, M., Capote, N., Olmos, A., Bertolini, E., Gorris, M. T., Africander, N. L., Levy, L., Lenardon, S. L., Clover, G. y Wright, D.** 2006b. Proposal for a new international protocol for detection and identification of *Plum pox virus*. Validation of the techniques. *Acta Horticulturae*, 781: 181-192.
- Candresse, T. y Cambra, M.** 2006. Causal agent of sharka disease: Historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. *EPPO Bulletin*, 36: 239-246.
- Capote, N., Bertolini, E., Olmos, A., Vidal, E., Martínez, M. C. y Cambra, M.** 2009. Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. *International Microbiology* 12: 1-6.
- Capote, N., Gorris, M. T., Martínez, M. C., Asensio, M., Olmos, A. y Cambra, M.** 2006. Interference between D and M types of *Plum pox virus* in Japanese plum assessed by specific monoclonal antibodies and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 96: 320-325.
- Chirkov, S., Ivanov, P. y Sheveleva, A.** 2013. Detection and partial molecular characterization of atypical *Plum pox virus* isolates from naturally infected sour cherry. *Archives of Virology*, 158: 1383-1387.
- Chirkov, S., Ivanov, P., Sheveleva, A., Zakubanskiy, A. y Osipov, G.** 2016. New highly divergent *Plum pox virus* isolates infecting sour cherry in Russia. *Virology*, 502: 56-62.
- Damsteegt, V.D., Scorza, R., Stone, A.L., Schneider, W.L., Webb, K., Demuth, M. y Gildow, F.E.** 2007. *Prunus* host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Disease*, 91: 18-23.
- Damsteegt, V.D., Waterworth, H.E., Mink, G.I., Howell, W.E. y Levy, L.** 1997. *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of *Plum pox virus* and other *Prunus* viruses. *Plant Disease*, 81: 329-332.
- Desvignes, J. C.** 1999. *Virus diseases of fruit trees*. París, Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL) Centr'imprint. 202 págs.
- EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas).** 2004. Diagnostic protocol for regulated pests: *Plum pox potyvirus*. PM 7/32(1). *EPPO Bulletin*, 34: 247-256.
- EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas).** 2006. Current status of *Plum pox virus* and sharka disease worldwide. *EPPO Bulletin*, 36: 205-218.
- EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas).** 2018a Base de datos de la OEPP sobre conocimientos diagnósticos. Relación de datos de validación. Disponible en <http://dc.eppo.int/validationlist.php> (consultado el 19 de marzo de 2018).
- EPPO (Organización Europea y Mediterránea de Protección de las Plantas).** 2018b. Base de datos mundial de la OEPP. *Plum pox virus* (PPV000). Disponible en <https://gd.eppo.int/taxon/PPV000> (consultado el 14 de febrero de 2018).
- García, J.A., Glasa, M., Cambra, M. y Candresse, T.** 2014. *Plum pox virus* and sharka: A model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology*, 15: 226-241.
- Gentit, P.** 2006. Detection of *Plum pox virus*: Biological methods. *EPPO Bulletin*, 36: 251-253.
- Glasa, M., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., Šubr, Z., Kúdela, O. y Quiot, J-B.** 2002. A natural population of recombinant *Plum pox virus* is viable and competitive under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 843-853.
- Glasa, M., Prikhodko, Y., Predajňa, L., Nagyová, A., Shneyder, Y., Zhivaeva, T., Šubr, Z., Cambra, M. y Candresse, T.** 2013. Characterization of sour cherry isolates of *Plum pox virus*

- from the Volga basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology*, 103: 972-979.
- Gougherty A.V., Pazdernik K.T., Kaiser M.S. y Nutter Jr, F.W.** 2015. Evaluation of sampling and testing efficiencies of *Plum pox virus* eradication programs in Pennsylvania and Ontario. *Plant Disease*, 99(9): 1247-1253.
- 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.
- Ilardi, V. y Tavazza, M.** 2015. Biotechnological strategies and tools for *Plum pox virus* resistance: Trans-, intra-, cis-genesis, and beyond. *Frontiers in Plant Science*, 6: 379.
- James, D. y Thompson, D.** 2006. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Ornamental and wild *Prunus* species. *EPPO Bulletin*, 36: 222-224.
- James, D., Varga, A. y Sanderson, D.** 2013. Genetic diversity of *Plum pox virus*: Strains, disease and related challenges for control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35: 431-441.
- Karsai, A., Müller, S., Platz, S. y Hauser, M.-T.** 2002. Evaluation of a homemade SYBR® Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques*, 32: 790-796.
- Levy, L. y Hadidi, A.** 1994. A simple and rapid method for processing tissue infected with *Plum pox potyvirus* for use with specific 3' non-coding region RT-PCR assays. *EPPO Bulletin*, 24: 595-604.
- Llácer, G. y Cambra, M.** 2006. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Fruiting *Prunus* species. *EPPO Bulletin*, 36: 219-221.
- Menzel, W., Jelkmann, W. y Maiss E.** 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99: 81-92.
- Myrta, A., Potere, O., Boscia, D., Candresse, T., Cambra, M. y Savino, V.** 1998. Production of a monoclonal antibody specific to the El Amar strain of *Plum pox virus*. *Acta Virologica*, 42: 248-250.
- Myrta, A., Potere, O., Crescenzi, A., Nuzzaci, M. y Boscia, D.** 2000. Properties of two monoclonal antibodies specific to cherry strain of *Plum pox virus*. *Journal of Plant Nutrition*, 82 (supl. 2): 95-101.
- Olmos, A., Bertolini, E. y Cambra, M.** 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): A new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, 106: 51-59.
- Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M. y Cambra, M.** 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128: 151-155.
- Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M.A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M.T. y Asensio, M.** 1997. Simultaneous detection and typing of *Plum pox potyvirus* (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods*, 68: 127-137.
- Olmos, A., Capote, N., Bertolini, E. y Cambra, M.** 2007. Molecular diagnostic methods for plant viruses. En: Z.K. Punja, S. De Boer y H. Sanfaçon, eds. *Biotechnology and plant disease management*, págs. 227-249. Wallingford, Reino Unido y Cambridge, Estados Unidos de América, CAB International. 574 págs.
- Olmos, A., Capote, N. y Candresse, T.** 2006. Detection and characterization of *Plum pox virus*: Molecular methods. *EPPO Bulletin*, 36: 262-266.
- Osman, F. y Rowhani, A.** 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 133: 130-136.
- PaDIL** (Pests and Diseases Image Library). 2018. Plant Biosecurity Toolbox. Disponible en <http://pbt.padil.gov.au/index.php?q=node/20&pbtID=136> (consultado el 27 de febrero de 2018).

- Palmisano, F., Boscia, D., Minafra, A., Myrta, A. y Candresse, T.** 2012. An atypical Albanian isolate of *Plum pox virus* could be the progenitor of the Marcus strain. *Petria*, 22(3): 224.
- Pasquini, G. y Barba, M.** 2006. The question of seed transmissibility of *Plum pox virus*. *EPPO Bulletin*, 36: 287-292.
- Rodamilans, B., León, D.S., Mühlberger, L., Candresse, T., Neumüller, M., Oliveros, J.C. y García, J.A.** 2014. Transcriptomic analysis of *Prunus domestica* undergoing hypersensitive response to *Plum pox virus* infection. *PLOS One*, 9(6): e100477.
- Schneider, W.L., Sherman, D.J., Stone, A.L., Damsteegt, V.D. y Frederick, R.D.** 2004. Specific detection and quantification of *Plum pox virus* by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, 120: 97-105.
- Šubr, Z., Pittnerova, S. y Glasa, M.** 2004. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant *Plum pox virus* isolates. *Acta Virologica*, 48: 173-176.
- Ulubaş Serçe, Ç., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M. y Çağlayan, K.** 2009. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in the Ankara province of Turkey. *Virus Research*, 142: 121-126.
- Varga, A. y James, D.** 2005. Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: A rapid method for strain typing. *Journal of Virological Methods*, 123: 213-220.
- Varga, A. y James, D.** 2006a. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of *Plum pox virus* strains C, EA, and W: Effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. *Journal of Virological Methods*, 132: 146-153.
- Varga, A. y James, D.** 2006b. Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Plum pox virus*. *Journal of Virological Methods*, 138: 184-190.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. y Dunez, J.** 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for *Plum pox potyvirus* detection. *Journal of Virological Methods*, 39: 27-37.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M. y Dunez, J.** 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to *Plum pox potyvirus* detection. *Journal of Virological Methods*, 33: 355-365.

Historia de la publicación

Esta no es una parte oficial de la norma.

2010-06: Consulta.

2012-03: La CMF-7 aprobó el Anexo 2 de la NIMF 27.

NIMF 27. Anexo 2. *Plum pox virus* (2012-007) Roma, CIPF, FAO.

2015-07: La Secretaría de la CIPF incorporó enmiendas editoriales y modificó el formato de las normas de acuerdo con el procedimiento de revocación de normas aprobado en la CMF-10 (2015).

2017-06: El CN aprobó presentar el texto para consulta a los miembros (2017_eSC_Nov_14).

2017-07: Primera consulta.

2018-04: La decisión por medios electrónicos del CN relativa a la aprobación se presentará durante el periodo de notificación del PD de 45 días (2018_eSC_May_09).

2018-08: el CN aprobó el PD en nombre de la CMF.

NIMF 27. Anexo 2. *Virus de la sharka del ciruelo* (2018). Roma, CIPF, FAO.

Última actualización de la historia de la publicación: 2019-06

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

