

**NORMAS INTERNACIONALES PARA
MEDIDAS FITOSANITARIAS****NIMF 27**
PROTOCOLOS DE DIAGNÓSTICO**PROYECTO DE PROTOCOLO DE DIAGNÓSTICO X:**
Plum pox virus**(201-)****PROYECTO
DE
DOCUMENTO****Información sobre la publicación**

Fecha de este documento	2011-11-02
Categoría del documento	Proyecto de nuevo anexo a la NIMF 27:2006 (<i>Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas</i>)
Etapas en que se encuentra el documento	Proyecto de documento para la séptima reunión de la Comisión de Medidas Fitosanitarias (CMF-7), 2012 2011-10: Decisión electrónica del Comité de Normas (CN)
Origen	Tema del programa de trabajo: Virus y fitoplasmas, CMF-1 (2006) (2004-007)
Etapas principales	2010-05: Aprobado para consulta con los miembros 2010-06: Consulta con los miembros 2011-10: Decisión electrónica del CN
Notas	IPPCStyles, Oct. 2011. Auto marginal numbering.

ÍNDICE

1.	Información sobre la plaga	DP X-5
2.	Información taxonómica.....	DP X-5
3.	Detección e identificación	DP X-5
3.1	Detección e identificación biológica	DP X-7
3.2	Detección e identificación serológica.....	DP X-7
3.2.1	Ensayo indirecto de inmunoabsorción enzimática en fase doble de anticuerpos (DASI-ELISA).....	DP X-8
3.2.2	Ensayo de inmunoabsorción enzimática en fase doble de anticuerpos (DAS-ELISA).....	DP X-8
3.3	Detección e identificación molecular	DP X-8
3.3.1	Transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	DP X-9
3.3.2	Inmunocaptura seguida de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR).....	DP X-9
3.3.3	Transcripción inversa cooperativa seguida de reacción en cadena de la polimerasa	DP X-10
3.3.4	Transcripción inversa en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa	DP X-10
4.	Identificación de las cepas	DP X-13
4.1	Identificación serológica de las cepas	DP X-13
4.2	Identificación molecular de las cepas.....	DP X-14
4.2.1	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.....	DP X-14
4.2.2	Inmunocaptura seguida de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa.....	DP X-14
4.2.3	RT-PCR cooperativa	DP X-14
4.2.4	RT-PCR a tiempo real	DP X-15
5.	Registros.....	DP X-16
6.	Puntos de contacto para información adicional.....	DP X-16
7.	Agradecimientos.....	DP X-17
8.	Referencias	DP X-17

[1] 1. Información sobre la plaga

[2] La sharka (viruela del ciruelo) es una de las enfermedades más graves de los frutales de hueso. Esta enfermedad, causada por el *Plum pox virus* (PPV), afecta a las plantas del género *Prunus*. Es especialmente perjudicial para *P. armeniaca*, *P. domestica*, *P. persicae* y *P. salicina* por ser causa de pérdida de calidad y caída prematura de los frutos. Se estima que desde la década de 1970, los costos relacionados con la gestión de la sharka en el mundo superan los 10 000 millones de euros (Cambra *et al.*, 2006b).

[3] La sharka se localizó por primera vez en *P. domestica* en 1917-18 en Bulgaria y en 1932 se describió como una enfermedad vírica. Desde entonces, el virus se ha dispersado de forma progresiva en gran parte de Europa, alrededor de la cuenca mediterránea y en el Cercano y Medio Oriente. Se ha localizado con una distribución restringida en América del Sur, América del Norte y Asia (EPPO, 2006; CABI, 2011).

[4] 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 al menos 10 000 nucleótidos, cubiertos de hasta 2 000 subunidades de una sola proteína de envoltura (García y Cambra, 2007). El PPV se transmite en el campo por áfidos de forma no persistente, pero el movimiento del material propagativo de la planta infectado es la principal vía de dispersión del PPV a larga distancia.

[5] Los extractos de PPV pueden clasificarse actualmente en siete tipos o cepas: D (Dideron), M (Marcus), C (Cherry), EA (El Amar), W (Winona), Rec (Recombinante) y T (Turco) (Candresse y Cambra, 2006; James y Glasa, 2006; Ulubaş Serçe *et al.*, 2009). La mayoría de extractos de PPV pertenece a los tipos D y M. Las cepas de PPV D y M pueden infectar con facilidad plantas de *P. armeniaca* y *P. domestica*, pero su capacidad para infectar cultivares de *P. persica* es distinta. La patogenicidad de las diversas cepas es diferente; por ejemplo, los extractos de tipo M suelen causar epidemias más rápidas y síntomas más graves que los extractos de tipo D en *P. armeniaca*, *P. domestica*, *P. persica* y *P. salicina*. Los extractos de tipo EA se restringen geográficamente a Egipto; se dispone de poca información sobre su epidemiología y sus propiedades biológicas. En muchos países europeos y en Turquía se ha identificado recientemente extractos de PPV que infectan a *P. avium* y *P. cerasus*. Dichos extractos forman un tipo diferente definido como PPV-C. Se extrajo un PPV atípico de *P. domestica* en Canadá (PPV-W) que representa otro tipo de PPV. Además, se han descrito como PPV-Rec los recombinantes naturales entre los tipos D y M, que muestran un comportamiento epidemiológico similar al del tipo D. En Turquía se ha informado recientemente sobre un extracto de un segundo tipo de recombinante (tipo T).

[6] Para más información sobre el PPV, con ilustraciones y síntomas de la enfermedad, consúltense Barba *et al.* (2011), CABI (2011), EPPO (2004), EPPO (2006), García y Cambra (2007) y PaDIL (2011).

[7] 2. Información taxonómica

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

[8] 3. Detección e identificación

[9] En circunstancias naturales, el PPV infecta con facilidad árboles frutales del género *Prunus* utilizados como variedades comerciales o rizomas: *P. armeniaca*, *P. cerasifera*, *P. davidiana*, *P. domestica*, *P. mahaleb*, *P. marianna*, *P. mume*, *P. persica*, *P. salicina* e híbridos interespecíficos entre dichas especies. *Prunus avium*, *P. cerasus* y *P. dulcis* podrán infectarse de forma ocasional. El virus también

infecta muchas especies de *Prunus* salvajes u ornamentales como *P. besseyi*, *P. cistena*, *P. glandulosa*, *P. insititia*, *P. laurocerasus*, *P. spinosa*, *P. tomentosa* y *P. triloba*. En circunstancias experimentales, el PPV puede transmitirse de forma mecánica a un gran número de *Prunus* spp. y a muchas plantas herbáceas (*Chenopodium foetidum*, *Nicotiana benthamiana*, *N. glutinosa*, *N. clevelandii* y *Pisum sativum*).

- [10] Los síntomas del PPV podrán manifestarse en hojas, brotes, corteza, pétalos, frutos y huesos en el campo. Suelen ser distinguibles en las hojas en las primeras fases de la temporada de crecimiento; consisten en una decoloración suave, verde claro; manchas, franjas o anillos cloróticos; aclaramiento o amarilleo de las nerviaciones; o deformación foliar. Algunos de estos síntomas foliares se parecen a los que provocan otros virus, como el *virus del arbesco americano del ciruelo*. *Prunus cerasifera* cv. GF 31 muestra un encorchado de color óxido y resquebrajamiento de la corteza. Los síntomas florales pueden darse en los pétalos (decoloración) de algunos cultivares de *P. persica* cuando se infectan por PPV-M o en el *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 decolorados. 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* muestran manchas o anillos típicos 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 intensidad dependen en gran medida de la planta hospedante y de las condiciones climáticas; por ejemplo, el virus puede mantenerse latente durante varios años en los climas fríos.
- [11] La NIMF 31:2008 (Metodologías para muestreo de envíos) brinda orientación general sobre las metodologías de muestreo. 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, se recomienda recolectar flores, hojas y frutos que presenten los síntomas. De las plantas asintomáticas deberían tomarse muestras de brotes de por lo menos un año de madurez u hojas 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 al principio de la primavera. El material vegetal debería recogerse preferiblemente de las partes internas de la copa del árbol. En primavera, las muestras pueden ser flores, brotes jóvenes 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. Las flores, las hojas, los brotes y la piel del fruto pueden almacenarse a una temperatura de 4 °C durante un máximo de 10 días antes del tratamiento. Los frutos pueden almacenarse durante un mes a una temperatura de 4 °C antes del tratamiento. En invierno pueden seleccionarse las yemas aletargadas o los tejidos de corteza de la zona basal de ramillas, brotes y ramas, o espolones enteros.
- [12] La detección de los extractos de PPV puede lograrse mediante una prueba biológica, serológica o molecular; para su identificación se requiere una prueba serológica o molecular. Una prueba serológica o molecular es el requisito mínimo para la detección e identificación del PPV (p. ej. en el diagnóstico rutinario de una plaga establecida ampliamente en un país). En caso de que la organización nacional de protección fitosanitaria (ONPF) requiera una identificación más segura del PPV (p. ej. la detección en una zona 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. En los casos en que la identificación inicial se haya realizado mediante un método molecular, las

pruebas posteriores deberían utilizar técnicas serológicas y viceversa. También podrán realizarse más pruebas o con el fin de identificar la cepa de PPV que está presente. En cualquier caso, las pruebas deberán consistir en controles negativos y positivos. En las siguientes secciones se describen las técnicas recomendadas.

[13] En ciertas circunstancias (p. ej. en el diagnóstico rutinario de una plaga extendida 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 seguridad requerido por la ONPF.

[14] 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/o reproducibilidad adquirido. Los procedimientos de laboratorio presentados en los protocolos pueden ajustarse a las normas de los laboratorios individuales, siempre que estén adecuadamente validadas.

[15] 3.1 Detección e identificación biológica

[16] Las principales plantas indicadoras para la indexación de PPV son plantones de *P. cerasifera* cv. GF31, *P. persica* cv, GF305, *P. persica* x *P. davidiana* cv. Nemaguard, o *P. tomentosa*. Las plantas indicadoras crecen a partir de semilla, se plantan en una mezcla de tierras con buen drenaje 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 plantones 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 deben 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 tres o cuatro 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.

[17] 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. 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.

[18] 3.2 Detección e identificación serológica

[19] Los ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) son muy recomendables para someter a análisis grandes cantidades de muestras.

[20] En el tratamiento de la muestra se corta en trozos pequeños aproximadamente 0,2-0,5 g de material vegetal fresco, que se deposita 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 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 adecuadamente validado. El material vegetal debería homogeneizarse por completo y utilizarse fresco.

[21] **3.2.1 Ensayo indirecto de inmunoabsorción enzimática en fase doble de anticuerpos (DASI-ELISA)**

[22] 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.

[23] El 5B-IVIA es actualmente el único anticuerpo monoclonal que detecta todas las cepas del PPV con alta fiabilidad, especificidad y sensibilidad (Cambra *et al.*, 2006a). En una prueba del anillo DIAGPRO realizada por 17 laboratorios con un grupo de 10 muestras, infectadas por PPV (PPV-D, PPV-M y PPV-D+M) y muestras sanas de Francia y España, la precisión del DASI-ELISA con el anticuerpo monoclonal 5B-IVIA fue del 95 % (número de valores negativos y positivos auténticos diagnosticados por la técnica/número de muestras analizadas). Esta precisión fue mayor que la obtenida con la inmunocaptura, transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (IC-RT-PCR) que fue del 82 %, o con la RT-PCR cooperativa (Co-RT-PCR) que fue del 94 % (Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007). La proporción de valores negativos auténticos (número de valores negativos auténticos diagnosticado por la técnica/número de plantas sanas) que se identificó mediante DASI-ELISA con el anticuerpo monoclonal 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 de que existía una probabilidad del 98,8 % de que un resultado positivo obtenido en invierno con DASI-ELISA utilizando el anticuerpo monoclonal 5B-IVIA fuera un valor positivo auténtico.

[24] **3.2.2 Ensayo de inmunoabsorción enzimática en fase doble de anticuerpos (DAS-ELISA)**

[25] El sistema de DAS-ELISA convencional o de biotina-estreptavidina debería aplicarse mediante equipos basados en el anticuerpo específico monoclonal 5B-IVIA o en anticuerpos policlonales que se haya demostrado que detectan todas las cepas del PPV 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.

[26] Mientras que el anticuerpo monoclonal 5B-IVIA detecta con especificidad, sensibilidad y fiabilidad todas las cepas del PPV, algunos anticuerpos policlonales no son específicos y tienen una sensibilidad limitada (Cambra *et al.*, 1994; Cambra *et al.*, 2006a). Por lo tanto, 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 seguridad en la identificación del PPV.

[27] **3.3 Detección e identificación molecular**

[28] Los métodos moleculares que utilizan la transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) podrán ser más caros o lentos que las técnicas serológicas, en especial en las pruebas a gran escala. Sin embargo, los métodos moleculares, en especial la RT-PCR en tiempo real, suelen ser más sensibles que las técnicas serológicas. El uso de RT-PCR en tiempo real también evita un posible proceso de amplificación posterior (p.ej. electroforesis de gel) y, por lo tanto, es más rápido y presenta una probabilidad menor de contaminación que la PCR convencional.

[29] A excepción de la inmunocaptura (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 extractos 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 y analizarse con RT-PCR en tiempo real

(Olmos *et al.*, 2005; Osman y Rowhani, 2006; Capote *et al.*, 2009). No se recomienda utilizar muestras manchadas o impresos histológicos en la PCR convencional debido a su menor sensibilidad en comparación con la RT-PCR a tiempo real.

[30] Cada método 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 RNA molde ml⁻¹; Co-RT-PCR, 1 fg RNA molde ml⁻¹; y RT-PCR en tiempo real, 2 fg RNA molde ml⁻¹.

[31] 3.3.1 Transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

[32] Los cebadores RT-PCR utilizados en este ensayo son los cebadores de Wetzel *et al.* (1991),

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

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

o los de Levy y Hadidi (1994):

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

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

[33] La mezcla de reacción, 25 µl, tiene los siguientes componentes: 1 µM de cada cebador (P1/P2 o el par cebador 3'NCR), 250 µM dNTP, 1 unidad de transcriptasa inversa AMV, 0,5 unidades de polimerasa Taq DNA, 2,5 µl 10 × tampón de polimerasa Taq, 1,5 mM MgCl₂, 0,3% Triton X-100 y 5 µl RNA molde. La reacción se produce en las condiciones de termociclado descritas a continuación: 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/P2) o a 62 °C (cebadores 3'NCR) y 1 min 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. Los cebadores P1/P2 y 3'NCR producen 243 pares de bases (bp) y 220 bp amplicón, respectivamente.

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

[35] 3.3.2 Inmunocaptura seguida de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR)

[36] La fase de inmunocaptura debería realizarse siguiendo las indicaciones de Wetzel *et al.* (1992), con savia vegetal extraída como se indica en la sección 3.2 y utilizando tubos de plástico individuales para evitar la contaminación.

[37] Preparar una disolución (1 µg ml⁻¹) de anticuerpos policlonales o de un anticuerpo específico monoclonal de PPV (5B-IVIA) en un tampón de carbonato de pH 9,6. Añadir 100 µl de anticuerpos diluidos en tubos de PCR e incubar a 37 °C durante 3 h. Lavar los tubos dos veces con 150 µl de PBS-Tween estéril (tampón de lavado). Enjuagar dos veces los tubos con agua libre de Rnasa. Aclarar 100 µl del extracto vegetal (véase la sección 3.2) mediante centrifugación (5 min a 15 500 × g) y añadir el sobrenadante a los tubos para PCR. Incubar durante 2 h en hielo a una temperatura de 37 °C. Lavar los tubos tres veces con 150 µl de PBS-Tween estéril. Preparar la mezcla de reacción RT-PCR como se describe en la sección 3.3.1 utilizando los cebadores de Wetzel *et al.* (1992), y añadir directamente a los tubos de PCR. Amplificar como se describe en la sección 3.3.1.

[38] La IC-RT-PCR requiere generalmente el empleo de anticuerpos específicos, aunque con los métodos de enlace directo puede 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 (Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007). 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.

[39] 3.3.3 Transcripción inversa cooperativa seguida de reacción en cadena de la polimerasa

[40] Los cebadores RT-PCR utilizados en este ensayo cooperativo (Co)-RT-PCR son los cebadores de Bertolini y Cambra (2002):

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')

[41] 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 µl, 3 mM de MgCl₂, un 5 % de DMSO, un 0,3 % de Triton X-100 y 5 µl de molde de ARN. La RT-PCR se produce en las condiciones de termociclado descritas a continuación: 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.

[42] La reacción RT-PCR se une a la detección clorimétrica 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. Desnaturalizar el ADNc amplificado a 95 °C durante 5 min e inmediatamente colocar en hielo. Colocar 1 µl de muestra en una membrana de nailon. Secar la membrana a temperatura ambiente y entrecruzar UV en un transiluminador durante 4 min a 254 nm. Para la prehibridación, colocar la membrana en un tubo de hibridación a 60 °C durante 1 h utilizando un tampón de hibridación estándar. Descartar la solución y llevar 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⁻¹, antes de incubar durante 2 h a 60 °C. Lavar la membrana dos veces durante 15 min a temperatura ambiente con 2 x solución de lavado y dos veces durante 15 min a temperatura ambiente con 0,5 x solución de lavado. Equilibrar la membrana durante 2 min en un tampón de lavado antes de la germinación 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. Incubar la membrana a temperatura ambiente con anticuerpos anti-DIG conjugados con fosfatasa alcalina en una concentración de trabajo de 1:5 000 (150 unidades litro⁻¹) en una solución de bloqueo al 1 % (p/v) durante 30 min. Lavar la membrana dos veces durante 15 min con tampón de lavado, y equilibrar durante 2 min con tampón de detección (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5). La solución de sustrato se prepara mezclando una solución de 45 µl NBT (75 mg ml⁻¹ sal de nitroazul de tetrazolio en un 70 % (v/v) dimetilformamida) y una solución de 35 µl BCIP (50 mg ml⁻¹ 5-bromo-4cloro-3indol fosfato, sal de toluidina en un 100 % de dimetilformamida) en 10 ml de tampón de detección. Después de la incubación con el sustrato detener la reacción lavando con agua.

[43] Este método fue 100 veces más sensible que la RT-PCR usando el ensayo de Wetzel *et al.* (1991) (Olmos, Bertolini y Cambra, 2002). Fue validado en la prueba del anillo de DIAGPRO y tuvo una precisión del 94 % (Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007).

[44] 3.3.4 Transcripción inversa en tiempo real de la reacción en cadena de la polimerasa

[45] La RT-PCR en tiempo real se puede llevar a cabo tanto mediante la prueba de TaqMan como con la del SYBR Green I. Se han descrito dos métodos de TaqMan para la detección universal del PPV (Schneider *et al.*, 2004 y Olmos *et al.*, 2005). En el primer ensayo 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').

[46] 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 cebadores directos e inversos; 100 nM de sonda TaqMan; 4,8 mM de MgSO₄; 0,5 µl de *RT/Platinum[®] Taq Mix* (equipo *Superscript[™] One-Step RT-PCR with Platinum[®] Taq¹*; Invitrogen) y 5 µl de molde de ARN. El proceso de RT-PCR se efectúa en las siguientes condiciones 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.

[47] El método que se ilustra en Schneider *et al.* (2004) se evaluó analizando extractos de PPV de los Estados Unidos, las cepas PPV-C, PPV-D, PPV-EA y PPV-M, así como ocho otras especies víricas distintas. Este método resultó preciso y capaz de detectar sistemáticamente ARN vírico de entre 10-20 fg (Schneider *et al.* 2004). También podría detectar los PPV en diversos hospedantes, así como en las hojas, tallos, yemas y raíces de *P. persica*.

[48] En el segundo ensayo 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 CGA CAC AGA-TAMRA-3').

[49] 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)³ y 5µl de molde de ARN. El proceso RT-PCR se efectúa en las siguientes condiciones de termociclado: 30 min a 48 °C, 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 60 s a 60 °C, y un rápido enfriamiento hasta alcanzar la temperatura ambiente. Los productos obtenidos tras la PCR se analizan en tiempo real según las instrucciones del fabricante.

[50] El método que se ilustra en Olmos *et al.* (2005) se evaluó utilizando tres extractos 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/número de plantas infectadas por PPV) identificados correctamente mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real usando TaqMan (Olmos *et al.*, 2005) y de ácido nucleico purificado fue del 97,5 % frente al 93,6 % obtenido mediante la RT-PCR en tiempo real

¹ El uso de la marca Invitrogen para el equipo *Superscript[™] One-Step RT-PCR with Platinum[®] Taq* en este protocolo de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también puedan ser adecuados. Esta información se ofrece únicamente para ayudar a los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que permiten obtener los mismos resultados.

² El uso de la marca Applied Biosystems para la *TaqMan Universal PCR Master Mix* y la *MultiScribe and RNase Inhibitor Mix* en este protocolo de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros productos que también puedan ser adecuados. Esta información se ofrece únicamente para ayudar a los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que producen los mismos resultados.

³ Véase la nota a pie de página n.º 2.

usando muestras manchadas, el 91,5 % obtenido mediante la inmunocaptura RT-PCR o el 86,6 % mediante DAS-ELISA usando el anticuerpo monoclonal 5B-IVIA (Capote *et al.*, 2009).

- [51] Varga y James (2005) describieron una técnica basada en la prueba del SYBR Green I para detectar PPV e identificar, al mismo tiempo, las cepas D y M:

P1 (5'-ACC GAC 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').

- [52] Para asegurar la correcta realización del ensayo podrán incluirse los siguientes cebadores de control interno:

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

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

- [53] Se usa un protocolo de RT-PCR de dos fases. La composición de la reacción de RT es la siguiente: 2 µl de 10 µM de cebador P1; 2 µl de 10 µM de cebador Nad5-R; 4 µg de ARN total y 5 µl de agua. Incubar durante 5 min a 72 °C colocándola en hielo. Añadir 4 µl de 5 × tampón de primera cadena (Invitrogen)⁴; 2 µl de 0,1 M de DTT; 1 µl de 10 mM de dNTP; 0,5 µl de *RNaseOUT*TM (40 unidades µl⁻¹) (Invitrogen)⁵; 1 µl de *Superscript*TM II (Invitrogen)⁶ y 2,5 µl de agua. Incubar a 42 °C durante 60 min, seguidos de 5 min a 99 °C. La composición de la reacción de mezcla de la PCR de 25 µl 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 I de 1:42 000 (Sigma)⁷ y 0,1 µl de *Platinum*[®] *Taq DNA high fidelity polymerase*⁶ (Invitrogen). Verter la mezcla de la reacción junto con 1 µl de ADNc diluido (1:4) en un tubo PCR estéril. El proceso de PCR se efectúa en las siguientes condiciones de termociclado: 2 min a 95 °C, 39 ciclos de 15 s a 95 °C y 60 s a 60 °C. El análisis de la curva de fusión se ha realizado mediante incubación de 60 °C a 95 °C a 0,1 °C s⁻¹ ajustando la curva suavizada a un promedio de 1 punto. Aplicando 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.

⁴ El uso de la marca Invitrogen para el tampón de primera cadena, *RNaseOUT*TM *Superscript*TM II y *Platinum*[®] *Taq DNA high fidelity polymerase* en este protocolo de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también puedan ser adecuados. Esta información se ofrece únicamente para ayudar a los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que producen los mismos resultados.

⁵ Véase la nota a pie de página n.º 4.

⁶ Véase la nota a pie de página n.º 4.

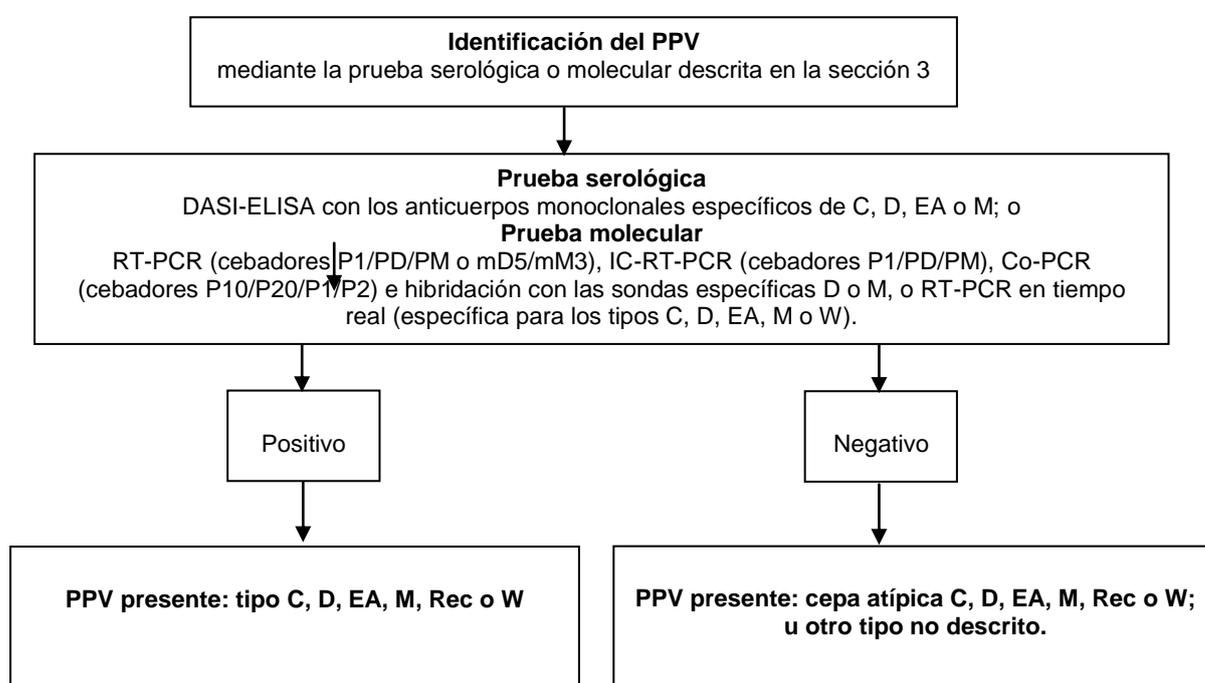
⁷ El uso de la marca Sigma para el Sybr Green I en este protocolo de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también puedan ser adecuados. Esta información se ofrece únicamente para ayudar a los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que producen los mismos resultados.

[54] El método de Varga y James (2005) se evaluó usando extractos de PPV-C, PPV-D, PPV-EA, PPV-M y una cepa no caracterizada, en las especies *Nicotiana* y *Prunus*.

[55] **4. Identificación de las cepas**

[56] En esta sección se describen métodos adicionales (que utilizan DASI-ELISA, RT-PCR, Co-RT-PCR y RT-PCR en tiempo real) para identificar las cepas de PPV (véase la figura 1). Pese a que la determinación de la cepa que se presenta no es un componente esencial de la identificación del PPV, alguna ONPF podrá desear conocerla con el fin de ayudar, por ejemplo, a predecir su comportamiento epidemiológico.

[57] Debido a la variabilidad de los PPV, las técnicas que no consisten en secuenciar ni se basan en determinados ensayos PCR (véase más adelante) podrán dar lugar a resultados erróneos para un pequeño porcentaje de extractos. Sin embargo, mediante las técnicas serológicas o moleculares descritas a continuación (Cambra *et al.*, 2006a; Candresse y Cambra, 2006; Capote *et al.*, 2006) es posible, en general, diferenciar los PPV de tipo D y M entre sí.



[58] **Figura 1:** Métodos para identificar las cepas del PPV

[59] En los casos en que alguna ONPF exija una identificación más confiable del tipo de PPV, podrán llevarse a cabo otras pruebas. En presencia de tipos no descritos o atípicos también se debería determinar la secuencia 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.

[60] **4.1 Identificación serológica de las cepas**

[61] Según se establece en Cambra *et al.* (1994), para diferenciar los dos principales tipos 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.

[62] 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 (Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2007). El anticuerpo monoclonal 4D es específico del PPV-D pero no reacciona con todos sus extractos. Por otra parte, el anticuerpo monoclonal utilizado para detectar el PPV-M reacciona con

extractos pertenecientes a las cepas M, Rec y T, ya que estos grupos contienen la misma secuencia de proteína de cobertura. En consecuencia, para diferenciar entre los tipos M, Rec y T es necesario realizar una prueba molecular usando un anticuerpo monoclonal específico de la cepa M.

[63] La identificación serológica de los extractos de PPV de los grupos EA y C puede realizarse mediante la prueba DASI-ELISA usando los anticuerpos monoclonales específicos de EA y/o C que se describen en Myrta *et al.* (1998, 2000). Sin embargo, es necesario validar estas pruebas.

[64] 4.2 Identificación molecular de las cepas

[65] 4.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

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

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

PD (5'-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG-3') o PM (5'-CTT CAA CAA CGC CTG TGC GT -3').

[67] La composición de la mezcla de reacción de 25 μ l es la siguiente: 1 μ M de cebador P1; 1 μ M de cebador PD o bien PM; 250 μ M de dNTP; 1 unidad de transcriptasa inversa AMV (10 unidades μ l⁻¹); 0,5 unidades de polimerasa de ADN Taq (5 unidades μ l⁻¹); 10 \times tampón Taq polimerasa de 2,5 μ l; 1,5 mM de MgCl₂; 0,3 % de tritón X-100, 2 % de formamida y 5 μ l de molde de RNA. El proceso RT-PCR se efectúa en las siguientes condiciones 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 1 min 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. Los cebadores P1/PD y P1/PM producen un amplicón de 198 bp. Este método se evaluó usando seis extractos de PPV-D y cuatro de PPV-M.

[68] El PPV-Rec se identifica usando los cebadores mD5/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').

[69] La composición de la mezcla de reacción de 25 μ l es la siguiente (modificada a partir de Šubr *et al.*, 2004): 1 μ M de cada cebador; 250 μ M de dNTP; 1 unidad de transcriptasa inversa AMV (10 unidades μ l⁻¹); 0,5 unidades de polimerasa de ADN Taq (5 unidades μ l⁻¹); 10 \times tampón de polimerasa Taq de 2,5 μ l; 2,5 mM de MgCl₂; 0,3 % de tritón X-100 y 5 μ l de ARN extraído (véase la sección 3.3). Los productos de 605 bp obtenidos tras la PCR se analizan por electroforesis de gel.

[70] 4.2.2 Inmuncaptura seguida de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa

[71] La fase de inmuncaptura debería llevarse a cabo tal como se describe en la sección 3.3.2. La mezcla de reacción de la PCR se vierte directamente a los tubos PCR. Para diferenciar las cepas PPV-D y PPV-M se procede tal como se describe en la sección 4.2.1.

[72] 4.2.3 Transcripción inversa cooperativa, reacción en cadena de la polimerasa

[73] Para identificar las cepas PPV-D o PPV-M se debería proceder tal como se indica en la sección 3.3.3 usando sondas marcadas con DIG en el extremo 3' y específicas de las cepas D y M (Olmos, Bertolini y Cambra, 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'.

[74] 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 % (p/v).

[75] 4.2.4 Transcripción inversa en tiempo real, reacción en cadena de la polimerasa

[76] En particular, las cepas PPV-D y PPV-M se identifican mediante la prueba química del SYBR Green I tal como se describe en Varga y James (2005) (véase la sección 3.3.4) o mediante el método de TaqMan descrito en Capote *et al.* (2006).

[77] 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').

[78] La composición de la mezcla de reacción de 25 µl 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*⁸ (Applied Biosystems), 1 × *MultiScribe and RNase Inhibitor Mix*⁹ (Applied Biosystems) y 5 µl de molde de ARN. El proceso de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa se efectúa en las siguientes condiciones de termociclado: 30 min a 48 °C, 10 min a 95 °C, 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. Este método se evaluó usando 12 extractos de la cepa PPV-D y 12 más de la PPV-M, así como 14 muestras infectadas por ambas cepas a la vez.

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

P1 (5'-ACC GAC 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').

[80] Para asegurar la correcta realización del ensayo se podrán incluir los siguientes cebadores de control interno:

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

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

[81] La composición de la reacción de RT-PCR de 25 µl es la siguiente: 2,5 µl de una solución acuosa 1:10 (v/v) de ARN extraído (véase la sección 3.3) y 22,5 µl de mezcla maestra. La composición de la

⁸ El uso de la marca Applied Biosystems para la *TaqMan Universal PCR Master Mix* y *MultiScribe* y la *RNase Inhibitor Mix* en este protocolo de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros productos que también puedan ser adecuados. Esta información se ofrece únicamente para ayudar a los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que permiten obtener los mismos resultados.

⁹ Véase la nota a pie de página n.º 8.

mezcla maestra es la siguiente: 2,5 µl de tampón Karsai (Karsai *et al.*, 2002); 0,5 µl de cada uno de los 5 µM cebadores de PPV-U, PPV-RR o P1, Nad5R y Nad5F; 0,5 µl de 10 mM de dNTP; 1 µl de 50 mM de MgCl₂; 0,2 µl de *RNaseOUT* (40 unidades µl⁻¹, Invitrogen)¹⁰; 0,1 µl de *Superscript™ III* (200 unidades µl⁻¹, Invitrogen)¹¹; 0,1 µl de *Platinum® Taq DNA high fidelity polymerase* (5 unidades µl⁻¹, Invitrogen)¹²; y 1 µl de SYBR Green I (Sigma)¹³ de 1:5 000 (en TE, pH 7,5) en 16,1 µl de agua. La reacción se efectúa en las siguientes condiciones de termociclado: 10 min a 50 °C, 2 min a 95 °C, 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 a una velocidad de fusión de 0,1 °C s⁻¹ ajustando la curva suavizada a un promedio de 1 punto. Siguiendo las condiciones de Varga y James (2006), 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.

[82] Este método se evaluó usando un extracto de cada una de las cepas PPV-C, PPV-D, PPV-EA y PPV-W.

[83] 5. Registros

[84] Es necesario conservar los registros enumerados en la sección 2.5 de la NIMF 27:2006.

[85] En las situaciones en que los resultados del diagnóstico puedan repercutir sobre otras partes contratantes, en concreto en casos de incumplimiento o en zonas donde se detecta el virus por primera vez, se debería conservar también el siguiente material adicional:

- La muestra original (etiquetada adecuadamente para facilitar la rastreabilidad), que debe conservarse congelada a -80 °C o liofilizada y mantenida a temperatura ambiente.
- Cuando proceda, deberían conservarse extractos de ARN a -80 °C y/o extractos 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 °C.

[86] 6. Puntos de contacto para información adicional

APHIS PPQ PHP RIPPS, Laboratorio de Diagnóstico Molecular, BARC Building 580, Powder Mill Road, Beltsville, Maryland 20705, Estados Unidos de América (Dr. Laurene Levy, correo electrónico: Laurene.Levy@aphis.usda.gov; Tel.: +1 3015045700; Fax: +1 3015046124).

¹⁰ El uso de la marca Invitrogen para *RNaseOUT™*, *Superscript™ II* y *Platinum® Taq DNA high fidelity polymerase* en este protocolo de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también puedan ser adecuados. Esta información se ofrece únicamente para ayudar a los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que producen los mismos resultados.

¹¹ Véase la nota a pie de página n.º 10.

¹² Véase la nota a pie de página n.º 10.

¹³ El uso de la marca Sigma para el Sybr Green I en este protocolo de diagnóstico no implica su aprobación ni la exclusión de otros que también puedan ser adecuados. Esta información se ofrece únicamente para ayudar a los usuarios de este protocolo y no constituye un aval por parte de la CMF del producto químico, el reactivo o el equipo mencionados. Pueden usarse otros productos equivalentes si se demuestra que producen los mismos resultados.

Equipo de virología del Instituto Nacional de la Investigación Agronómica de Francia (INRA), Centro de Burdeos, UMR GD2P, IBVM, BP 81, 33883 Villenave d'Ornon Cedex, Francia (Dr. 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 (Dr. 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 (Dr. 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 (Dr. Mariano Cambra, correo electrónico: mcambra@ivia.es; Tel.: +34 963424000; Fax: +34 963424001).

Instituto de Virología Vegetal del CNR, sección de Bari, via Amendola 165/A, I-70126 Bari, Italia (Dr. 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 (Dr. Delano James, correo electrónico: Delano.James@inspection.gc.ca; Tel.: +1 250 3636650; Fax: +1 250 3636661).

Laboratorio de Virología, Centro Técnico Interprofesional de Frutas y Verduras (CTIFL), BP21 Lanxade, F-24130 La Force, Francia (Dr. Pascal Gentit, correo electrónico: gentit@ctifl.fr; Tel.: +33 553580005; Fax: +33 553 581742).

[87] 7. Agradecimientos

[88] El presente protocolo de diagnóstico fue redactado por los doctores M. Cambra, A. Olmos y N. Capote, IVIA (véase la sección anterior), el Sr. N.L. Africander, Departamento Nacional de Agricultura, Actividad Forestal y Pesca, Private Bag X 5015, Stellenbosch, 75999, Sudáfrica; Dr. L. Levy (véase la sección anterior); el Dr. S.L. Lenardon, IFFIVE-INTA, Cno. 60 Cuadras Km 51/2, Córdoba X5020ICA, Argentina; el Dr. G. Clover, Laboratorio Fitosanitario y Medioambiental, Ministerio de Agricultura y Silvicultura, PO Box 2095, Auckland 1140, Nueva Zelanda; y la Sra. D. Wright, Grupo Fitosanitario, Laboratorio de Central de Ciencia, Sand Hutton, York YO41 1LZ, Reino Unido.

[89] 8. Referencias

- 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.** 2011. Compendio de protección de cultivos. <http://www.cabi.org/cpc/>, último acceso el 26 de octubre de 2011.
- 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*. *Bulletin OEPP/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. Bulletin OEPP/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. Bulletin OEPP/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: 181-191.
- Candresse, T. y Cambra, M.** 2006. *Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of Plum pox virus strains. Bulletin OEPP/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 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.
- 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*. Paris, CTIFL, Centr'imprint. 202 págs.
- EPPO.** 2004. *Diagnostic protocol for regulated pests: Plum pox virus. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 34: 247-256.
- EPPO.** 2006. *Current status of Plum pox virus and sharka disease worldwide. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 205-218.
- García, J. A. y Cambra, M.** 2007. *Plum pox virus and sharka disease: Plant Viruses*, 1: 69-79.
- Gentit, P.** 2006. *Detection of Plum pox virus: biological methods. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 251-253.
- James, D. y Glasa, M.** 2006. *Causal agent of sharka disease: New and emerging events associated with Plum pox virus characterization. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 36: 247-250.
- 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. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 24: 595-604.
- 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. *Production of two monoclonal antibodies specific to cherry strain of plum pox virus (PPV-C). Journal of Plant Nutrition*, 82 (supl. 2): 95-103.

- NIMF 27.** 2006. *Protocolos de diagnóstico para las plagas reglamentadas*. Roma, CIPF, FAO.
- NIMF 31.** 2008. *Metodologías para muestreo de envíos*. Roma, CIPF, FAO
- 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., Gorrís, 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. DeBoer y H. Sanfacon, eds. *Biotechnology and plant disease management*. pp. 227-249. Wallingford, UK y Cambridge, USA, CAB International. 574 págs.
- 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.** 2011. <http://old.padil.gov.au/pbt/>, último acceso 26 de octubre de 2011.
- 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.** 2006. *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.
- 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.