



NAPPO

North American Plant Protection Organization
Organización Norteamericana de Protección a las Plantas

Informe sobre conferencia de la NAPPO

Grupo de expertos:	Semillas – SG 3 del ToBRFV	
Lugar:	Videoconferencia – MS Team Meetings	
Fecha:	7 de octubre del 2021	
Presidenta	Beatriz Xoconostle (CINVESTAV, MX)	
Participantes:		
Norma González (CENAM, MX)	Nancy Osterbauer (APHIS-PPQ)	Ángel Ramírez (SENASICA)
Mercedes Herrera (CENAM, MX)	Jennifer Nickerson (ACIA)	Samantha Thomas (industria de EE. UU.)
Melina Pérez (CENAM, MX)	Maribel Hurtado (NAPPO)	Ed Podleckis (APHIS – PPQ)
Vessela Mavrodieva (APHIS – PPQ)	Marlene Ortíz (industria de México)	Huimin Xu (ACIA)
Daniela Alejandra Bocanegra Flores (SENASICA)	Eduardo Garrido (INIFAP)	Nedelka Marín-Martínez (NAPPO)
Geoffrey Dennis (APHIS PPQ)	Alonso Suazo (NAPPO)	

Resumen

Proyecto:	Proyecto piloto para la armonización de protocolos de diagnóstico para plagas de semillas centrado en el virus del fruto rugoso café del tomate (ToBRFV).
Asunto 1:	Propuesta del Centro Nacional de Metrología de México (CENAM) acerca del desarrollo del material de referencia para el proyecto de semillas de la NAPPO
Decisiones:	<p>La Dra. Norma González (CENAM) ofreció una perspectiva general de las funciones y la misión del CENAM. Posterior a una descripción detallada de los procesos y las funciones del CENAM, la Dra. González presentó una propuesta al GE de la NAPPO para producir el material de referencia que podría utilizarse en las pruebas del anillo.</p> <p>La Dra. González:</p> <ul style="list-style-type: none">• indicó que todo el material de referencia primero necesita definirse (solido, matriz o solución) y se producirá siguiendo las directrices internacionales. El proceso de producción también variará según la forma en la que se defina el material• presentó información detallada sobre la forma en la que el material de referencia se preparará, empaquetará y cómo se determinará el proceso de homogeneización y de estabilidad. <p>Propuesta del CENAM:</p>

- Elaborar dos tipos de materiales de referencia
 - Material en matriz:
 - semilla en polvo de tomate infectada y positiva
 - semilla en polvo de tomate sana y negativa
 - semilla en polvo de chile infectada y positiva
 - semilla en polvo de chile sana y negativa.
 - Material de calibración (ADN de plásmido linealizado sintético de ToBRFV) para establecer la curva de calibración para los protocolos de PCR.
- Para producir el material de calibración descrito anteriormente, la NAPPO debería proporcionar el plásmido.
- El cálculo del tiempo de producción y costo del material de referencia se indica abajo:

Material	Tiempo previsto (mes)	Costo estimado (\$ US)
Controles (negativos y positivos) de semilla de tomate y chile	14	43,000.00
ADN de plásmido linealizado de ToBRFV	12	22,000.00
preparación y embalaje del material	1	
Determinación de la estabilidad y homogeneidad	1	

- El DT agradeció a los miembros del CENAM por la información presentada e indicó que el GE discutirá los detalles planteados por el CENAM y decidirá los siguientes pasos como grupo.
- Los miembros del GE indicaron que el GE decidió utilizar semillas enteras y no semilla molida, aunque reconocieron los beneficios del uso de semilla molida para el proceso de homogeneización de la muestra pero no para la estabilidad de la muestra. El GE también indicó que el método ISHI-Veg utiliza semillas molidas.
- El CENAM también indicó que ellos han trabajado en otro tipo de material de referencia en tomate y virus de la tristeza de los cítricos. También manifestó que esta sería la primera vez que ellos trabajarían en material de referencia con virus de ARN y transcripciones de ARN.

Asunto 2:

Diagramas del flujo de trabajo de la prueba del anillo

Decisiones:	<p>Jennifer Nickerson presentó una perspectiva general de los diagramas del flujo del trabajo para los procesos y los aspectos logísticos necesarios para las pruebas del anillo con el fin de facilitar las discusiones. Los diagramas se compartieron con los miembros del GE para que ellos brindaran retroalimentación.</p> <p>Diagrama de procesos El GE brindó retroalimentación para producir una versión nueva para compartirla con el GE. Los comentarios relevantes son los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • los controles y las muestras deberían ser «ciegos» para disminuir el sesgo entre los laboratorios participantes durante las pruebas del anillo • separar la información para los reactivos en primers y sondas • agregar los primers y las sondas para el protocolo de ISHI-Veg. <p>Diagrama de aspectos logísticos: En un diagrama de flujo se presentó un esbozo de los aspectos logísticos de cada proceso, incluido los aspectos logísticos que suponen la preparación de las semillas y las muestras, los reactivos y paneles. Dicho diagrama de flujo se creó para facilitar las discusiones futuras con el grupo de expertos.</p>
Asunto 3	Equipo en los laboratorios participantes
Decisiones:	La presidenta del GE solicitó a los miembros del GE asegurarse de que los laboratorios participantes tienen el equipo necesario para la detección de los fluorocromos que se utilizan en los protocolos y presentar una lista del equipo.
Asunto 4:	Paneles de semillas
Decisiones:	<p>La presidenta del GE solicitó una actualización acerca de la lista necesaria para los paneles de semillas. La APHIS PPQ indicó que es un trabajo en proceso y ofreció los siguientes comentarios:</p> <p>Muestras:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Muestra A (muestra analítica de tomate, positiva): tal vez necesite una transcripción in-vitro. • Muestra B (semilla de tomate, positiva) hay suficiente material disponible de la industria y APHIS PPQ. La APHIS PPQ tiene un lote bastante «infestado con el virus» del cual se pueden realizar diluciones. • Muestra C (semilla + ToMV): se necesitarán 2 concentraciones diferentes y hay suficiente material disponible. Dos opciones: <ul style="list-style-type: none"> ○ transcripciones in-vitro ○ lotes de semillas con dos concentraciones distintas • Material negativo (semillas de tomate y chile sanas): difíciles de encontrar pero es necesario encontrar

	<p>semillas infectadas de ToMV.</p> <p>Controles:</p> <ul style="list-style-type: none"> Algunos controles son los mismos que el material de muestra. <p>Hay suficiente material disponible para todos los controles.</p>	
Asunto 5:	Recolección, almacenamiento y análisis de datos	
Decisiones:	<p>Geoffrey Dennis (APHIS – PPQ) ofreció una demostración del portal del Laboratorio Nacional de Salud Animal del USDA (USDA National Animal Health Laboratory - NAHL www.nahl.org) el cual se creó para el proyecto del ToBRFV. Geoff indicó que este portal para el ToBRFV aún está en desarrollo.</p> <p>Notas adicionales:</p> <ul style="list-style-type: none"> Los archivos en PowerPoint con instrucciones sobre cómo utilizar el portal se enviaron a la Secretaría de la NAPPO para distribuirlo al GE. El instructivo (archivos en PPT) y un formulario de registro que necesitan utilizar los laboratorios participantes se distribuirán a todos los laboratorios participantes. El personal del laboratorio que participará en las pruebas del anillo necesita completar los formularios «Access Request Form» o formulario «NAHL», los cuales deberían enviarse a Geoffrey Dennis. El registro del laboratorio se realiza a través del sitio web. Los laboratorios participantes deberían hacer clic en la pestaña «PT» bajo la pestaña «LabDir» en el sitio web del NAHL. La prueba del anillo aparecerá bajo la pestaña PT. Los documentos necesarios para la prueba del anillo pueden agregarse al portal. Geoff ofreció una demostración de la forma de incluir los datos al portal. También indicó que los datos pueden exportarse a otras plataformas como MS Excel. Geoff indicó que el sistema aún tiene algunos errorcitos que reparar y sugirió a los miembros del GE completar los formularios una vez que se resuelvan estos asuntos técnicos. 	
Próximos pasos		
Responsable	Acciones	Fecha
Secretaría de la NAPPO	Traducir y compartir las instrucciones sobre la forma de utilizar el portal del NAHL para la recolección, el almacenamiento y análisis de datos y el formulario de registro del sistema para que los laboratorios participantes tengan acceso al sistema.	
Miembros del GE	Brindar retroalimentación acerca de los diagramas de flujo de los procesos y aspectos logísticos.	

Próxima reunión	
Lugar:	Videoconferencia
Fecha:	9 de noviembre de 2:00 a 4:00 p. m. hora del Este
Asuntos propuestos	
1. Dar a conocer la decisión de la NAPPO en cuanto al uso del material de referencia el cual fue preparado por el GE	
2. Solicitud de la industria: protección de propiedad intelectual de las variedades de semillas que se utilicen en el ensayo	
3. Retroalimentación acerca de los protocolos compartidos con los miembros del GE	
4. Comentarios acerca del uso del portal para la recolección, el almacenamiento y análisis de datos	
5. Descripción de los controles positivos	
6. Asignación de tareas según el flujo del trabajo, calendario de actividades	
7. Otros asuntos	