



NAPPO

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

Informe sobre conferencia telefónica de la NAPPO

Grupo de expertos:	Semillas -ToBRFV	
Lugar:	Video conferencia en la plataforma Zoom	
Fecha:	24 de febrero del 2022	
Presidenta	Beatriz Xoconostle (CINVESTAV)	
Participantes:		
Huimin Xu (ACIA)	Geoffrey Dennis (APHIS – PPQ)	Samantha Thomas (industria de EE. UU.)
Kevin Ong (TAMU)	Daniela Alejandra Bocanegra Flores (SENASICA)	José Manuel Cambrón Crisantos (SENASICA)
Stephanie Dubon (APHIS – PPQ)	Jennifer Nickerson (ACIA)	Ángel Ramírez Suárez (SENASICA)
Vessela Mavrodieva (APHIS – PPQ)	Rick Dunkle (industria de EE. UU.)	Pamela Ross (ACIA)
Ed Podleckis (APHIS – PPQ)	Jessica Berenice Valencia Luna (SENASICA)	Sofía Báez (NAPPO)
Stephanie Bloem (NAPPO)	Nedelka Marín-Martínez (NAPPO)	Maribel Hurtado (NAPPO)
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 (<i>ToBRFV</i>)	
Comentarios generales:	La Secretaría de la NAPPO agradeció a todos los miembros del GE por unirse a la conferencia telefónica. El DT convino tomar las notas y redactar el informe de la videoconferencia. Los miembros del GE acordaron grabar la sesión para fines del informe.	
Asunto 1:	Actualizaciones	
Decisiones:	<i>Documento de los Términos de referencia</i> (Ed Podleckis, APHIS – PPQ) El presidente del GE informó al GE que el documento está casi concluido y estará listo a más tardar el 3 de marzo del 2022. La DE informó que los TdR se presentarán al CE para su aprobación en la próxima reunión del Equipo de manejo de la NAPPO programada para el 29 de marzo del 2022. Se permitirá a los miembros del GE revisar el documento antes de presentarlo al CE.	

Manual para los laboratorios participantes (Alonso Suazo, DT de la NAPPO)

Se ha completado la versión preliminar del manual. Se está actualizando el documento con la retroalimentación que se recibió de algunos miembros del GE. La versión actualizada del manual debería estar disponible en marzo. Se compartirán copias del manual con los miembros del GE antes de producir la versión final.

Diseño del panel (Vessela Mavrodieva, APHIS – PPQ)

Desarrollo del ToBRFV – muestra positiva B y PPC:

- Se realizaron las pruebas utilizando PCR en tiempo real con el fin de evaluar los métodos distintos para preparar las muestras B y los controles positivos del proceso (PPC, por su sigla en inglés).
- Se seleccionaron los métodos con la menor variabilidad de la muestra.
- Se utilizaron métodos seleccionados para producir 100 bolsas, cada una de las cuales contiene 3 gramos de semillas para la muestra B y PPC.
- Se validó 15 % de las muestras seleccionadas al azar para las muestras B y PPC. Se dividieron las muestras por la mitad y dos técnicos las evaluaron. Se extrajo el ARN de cada muestra y se sometió a prueba con los cinco protocolos (las muestras se sometieron a prueba por triplicados para los métodos de PCR en tiempo real y por duplicados para los métodos de PCR convencional). La finalidad de esta prueba era asegurarse de que se observaba la variabilidad baja de la prueba en todos los métodos sometidos a prueba. Para fines de control de calidad, el laboratorio registró el número del lote de los reactivos y el número de serie del equipo.
- Los datos se recopilaron para las muestras B y PPC.
- La muestra B se sometió a prueba en cinco diluciones en serie al décimo. Cada dilución se sometió a prueba con todos los métodos.
- Se evaluó la homogeneidad utilizando PCR en tiempo real. La desviación estándar se mantuvo bajo 2.

Validación de muestras D, E y control negativo del proceso (NPC, por su sigla en inglés).

- Las muestras D, E y NPC se han empacado y están listas para enviarse.

Transcritos

- Se recibieron los transcritos del laboratorio del CINVESTAV en México y se crearon, cuantificaron y sometieron a prueba otros transcritos en el laboratorio de APHIS – PPQ en

Maryland.

- Se produjeron, cuantificaron y sometieron a prueba tres regiones objetivo: RdRp, MP y CP.
- Se sometieron a prueba diluciones al décimo, 5 diluciones para las muestras A y el calibrador. Se seleccionó el nivel apropiado de dilución.
- Se realizó la prueba de estabilidad con cinco temperaturas distintas: -80°C, -20°C, 4°C y temperatura ambiente.
- Se está evaluando la estabilidad durante el transporte.
- Se están desarrollando los transcritos para el ToMMV y se validarán.
- Las pruebas de validación se realizarán para la muestra A y el calibrador utilizando los cinco métodos.

Verificación por parte de otro laboratorio y determinación de la estabilidad de la muestra durante el transporte:

- Las alícuotas de las muestras B y PPC se enviaron al laboratorio del Dr. Kevin Ong en la TAMU en donde se extrajo el ARN para confirmar la validación de los resultados del laboratorio del USDA en Maryland.
- La verificación del trabajo de validación también se realizó para los transcritos en el laboratorio de la TAMU.
- La validación de los resultados en ambos laboratorios es equiparable.
- Para asegurar la estabilidad del transcrito, estos se enviaron con hielo seco.

Los reactivos de los ensayos de RT-PCR para los laboratorios participantes se compraron con fondos de la NAPPO. Se recibieron los reactivos y se empezarán a empacar la semana del 7 de marzo.

También se compraron cajas y bitácoras para el laboratorio de la TAMU.

Recomendaciones para aprovechar al máximo la estabilidad de la muestra:

- Almacene las muestras a -80 °C o -20 °C.
- Inicie las pruebas en cuanto reciba las muestras.
- Evite el congelamiento y descongelamiento constante de las muestras.

Documento sobre análisis de la recolección de datos y los resultados (Geoffrey Dennis – APHIS-PPQ).

- Se prepararán tres documentos distintos; dos para el análisis de datos y los resultados y uno para recolección de datos.
- Documento de análisis de los resultados:

	<ul style="list-style-type: none"> ○ Abarcará las definiciones, ecuaciones y categorías de validación. ○ Incluye detalles del diseño de la muestra y el análisis de los datos. ● El análisis de datos mediante el uso del portal del APHIS – PPQ incluye dos documentos: <ul style="list-style-type: none"> ○ Instrucciones generales y descripción del portal. ○ El segundo documento incluirá los detalles basados en el panel que cada laboratorio participante recibirá. Se describe cada paso acerca de la entrada de datos. <p>Se presentaron ejemplos de la entrada de datos.</p> <p>Notas adicionales:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Geoff exhortó a los miembros del GE completar y enviar el formulario que otorga acceso al portal, y a organizar una sesión de capacitación. ● La DE sugirió estandarizar la nomenclatura incluida la identificación del laboratorio, la identificación de la muestra, etc.
Asunto 2:	Pruebas preliminares para los laboratorios participantes
Decisiones:	<p>El GE convino que los laboratorios participantes deberían realizar una prueba preliminar antes de la prueba del anillo para asegurar que los protocolos de extracción que cada laboratorio está utilizando funcionan con los protocolos seleccionados. Se incluirá un juego adicional en los paneles para que los laboratorios realicen las pruebas preliminares. Los reactivos adicionales para las pruebas preliminares se cubrirán con fondos de la NAPPO.</p> <p>Los paneles y el material adicional de las pruebas preliminares se enviarán preferiblemente juntos para evitar la solicitud de permisos de importación adicionales.</p> <p>Los datos que se generen durante las pruebas preliminares no se subirán al portal de recolección de datos.</p>
Asunto 3:	Aspectos logísticos del envío de los paneles
Decisiones:	<p>El GE manifestó su preocupación acerca del envío de los paneles fuera de EE. UU. y de que llegaran estables y a tiempo a su destino. De especial preocupación es el envío con hielo seco y si las líneas aéreas permiten el transporte de paquetes con hielo seco.</p> <p>Notas del GE:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Envío con empresas de transporte como UPS y FedEx en ocasiones trae problemas con aduanas. ● Es preferible si alguien transporta la muestra y presenta cartas de autorización para introducir el material.
Próximos pasos	

Responsable	Acciones	Fecha
Próxima reunión		
Lugar:	Video conferencia en la plataforma Zoom	
Fecha:	23 de marzo de 2:00 a 4:00 p. m. hora del Este	
Asuntos propuestos		
1.		
2.		