

Proyecto piloto para la armonización de protocolos de diagnóstico para plagas de semillas centrado en el virus del fruto rugoso café del tomate (ToBRFV)

Términos de referencia



Grupo de expertos en semillas de la NAPPO

Abril del 2022

Índice

Introducción.....	3
Miembros.....	3
Motivo/objetivo.....	4
Metodología / plan de trabajo.....	4
Selección de protocolos.....	6
Diseño experimental.....	7
Aspectos logísticos.....	9
Notificación.....	10
Presupuesto.....	11
Calendario.....	12
Conclusión.....	13

DRAFT

Introducción

En el 2019, la Asociación Mexicana de Semilleros A. C. (AMSAC) presentó una propuesta de proyecto nueva para consideración de la NAPPO acerca del «Reconocimiento de las pruebas de diagnóstico para plagas de semillas entre los países miembros de la NAPPO». El Comité Ejecutivo (CE) y el Comité Consultivo y de Manejo (CCM) de la NAPPO revisaron la propuesta y sugirieron que se presentara un ámbito más específico y a finales de octubre del 2019, el CE aprobó el «Proyecto piloto para la armonización de protocolos de diagnóstico para plagas de semillas centrado en el virus del fruto rugoso café del tomate (ToBRFV)». En marzo del 2020, la NAPPO formó, virtualmente, un grupo de expertos (GE) en semillas en el ámbito regional para que trabajara en el proyecto piloto. Se tiene previsto que todo el proyecto, incluida la redacción de un informe y las recomendaciones finales, abarque entre 24 y 30 meses.

Miembros

Este GE cuenta con una participación sólida y activa de expertos en salud y diagnóstico de semillas de los tres países miembros de la NAPPO y representantes regionales de la industria. Los miembros del grupo de expertos y sus afiliaciones son:

País	Nombre	Organización
	Patricia McAllister	ACIA
	Pamela Ross	ACIA
	Huimin Xu (miembro especial)	ACIA
	Jennifer Nickerson (miembro especial)	ACIA
	José Manuel Cambrón Crisantos	SENASICA
	Jessica Berenice Valencia Luna	SENASICA
	Daniela Alejandra Bocanegra Flores	SENASICA
	Angel Ramírez Suárez	SENASICA
	Beatriz Xoconostle Cazares	CINVESTAV
	Eduardo Garrido Ramírez	INIFAP
	Marlene Ortiz, vicepresidenta (contacto de la industria)	AMSAC
	Mario Puente Raya (contacto de la industria)	AMSAC
País	Nombre	Organización
	Geoff Dennis	USDA, APHIS
	Vessela Mavrodieva	USDA, APHIS
	Kevin Ong	Universidad de Texas A&M
	Nancy Osterbauer	USDA, APHIS
	Ed Podleckis, presidente	USDA, APHIS
	Ric Dunkle (contacto de la industria)	ASTA
	Samantha Thomas (contacto de la industria)	Bayer Crop Science

Motivo/objetivo

Para aprobar el proyecto piloto, el CE consideró las siguientes justificaciones:

- ToBRFV es una plaga cuarentenaria en los tres países miembros de la NAPPO;
- ToBRFV es una plaga que afecta a las plantas para plantar, la fruta y la semilla del tomate y chile;
- Hay un comercio sustancial de estos productos entre los países miembros de la NAPPO;
- La industria de semillas está muy preocupada de esta plaga; y
- La armonización de los protocolos de diagnóstico para el ToBRFV beneficiaría inmediatamente el comercio entre los países miembros de la NAPPO puesto que palearía los retrasos y costos de los resultados de las pruebas de semillas contradictorias y las pruebas adicionales innecesarias de los envíos de semillas.

El objetivo inmediato de este proyecto es evaluar de manera sistemática los ensayos de diagnósticos moleculares (RT-PCR) seleccionados que actualmente utilizan los países miembros de la NAPPO y los socios comerciales principales. Conforme a esta evaluación, el grupo de expertos elaborará una recomendación de un protocolo o protocolos para que los países miembros de la NAPPO realicen pruebas fitosanitarias a las semillas de tomate y chile. Una meta del estudio, a largo plazo, es la elaboración de una norma de procedimientos de la NAPPO que evalúe los protocolos de diagnóstico de semillas los cuales podrían aplicarse a diagnósticos futuros para otros patógenos de semillas.

Metodología / plan de trabajo

La primera tarea del GE fue la elaboración del presente documento de Términos de referencia (TdR) o un plan de trabajo del proyecto piloto. Los TdR definen las tareas del proyecto y el diseño experimental creado por el GE. Una vez aprobados los TdR, el GE iniciaría el proyecto piloto. Al concluirse la etapa de prueba de laboratorio del proyecto piloto, el GE evaluará y documentará los resultados de dicho proyecto piloto, incluidas las lecciones aprendidas y recomendaciones. Según los resultados, el GE elaborará una propuesta de proyecto para posterior consideración de la NAPPO, la cual cuenta con objetivos estratégicos más amplios y mayores concernientes a la armonización de los protocolos de diagnóstico de plagas de semillas. Durante la elaboración de los TdR, el GE en semillas esbozó un plan de trabajo (**Figura 1**) el cual se agrupa en tres funciones principales: selección del protocolo, diseño experimental y aspectos logísticos. Se crearon tres subgrupos para que determinaran y completaran las tareas necesarias que se indicaron anteriormente.

Figura 1. Diagrama del trabajo del proyecto piloto del GE en semillas para el ToBRFV

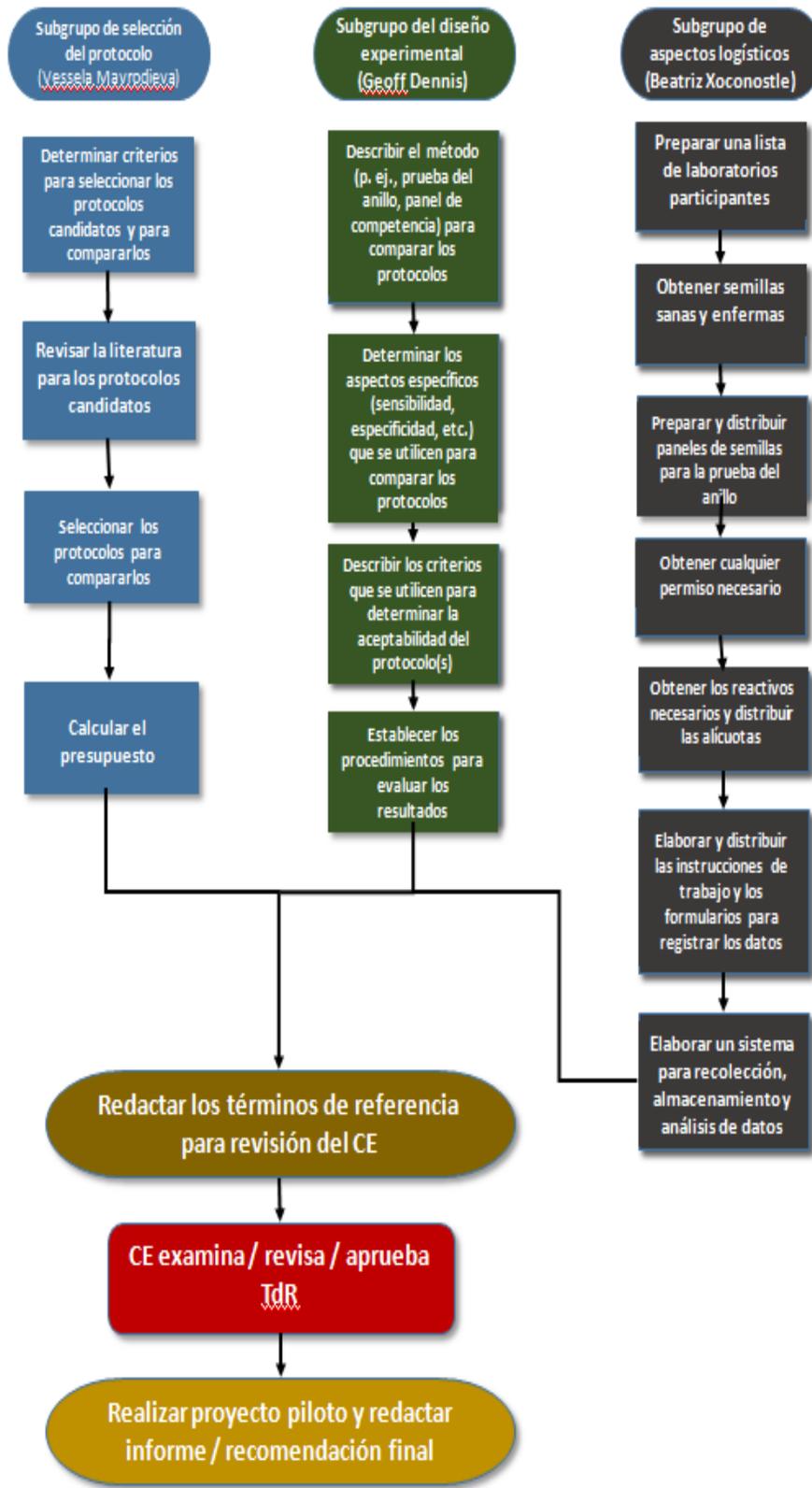


Figura 1.

Selección de protocolos

El subgrupo 1 se centró en la identificación y selección de los protocolos de RT-PCR candidatos. Inicialmente se identificaron diecisiete protocolos a partir de los informes que se encontraban en la literatura o su utilización en los laboratorios privados y del gobierno de todo el mundo. Del grupo inicial (**Cuadro 1**), se seleccionaron cinco protocolos para su evaluación en el proyecto piloto, conforme a varios factores:

- Su utilización por uno o más de los laboratorios oficiales de diagnóstico de los países miembros de la NAPPO;
- el tipo de protocolo de PCR (a saber, RT-PCR convencional frente a RT-PCR en tiempo real);
- la secuencia objetivo del ToBRFV (p. ej., codificación de la cápside, proteína de movimiento o ARN polimerasa dependiente de ARN);
- el protocolo se haya validado.

Se seleccionaron tres protocolos de RT-PCR convencional que utiliza el Laboratorio de Diagnóstico Confirmatorio de Fitopatógenos del APHIS (PPCDL, por su sigla en inglés), SENASICA y ACIA. Además, se seleccionaron dos protocolos de RT-PCR en tiempo real, uno adaptado por el APHIS PPCDL y uno desarrollado por la Iniciativa Internacional de Salud de las Semillas para los Cultivos Vegetales (ISHI-Veg, por su sigla en inglés) de la Federación Internacional de Semillas (ISF, por su sigla en inglés) y validado por el Sistema Nacional de EE. UU. para la Salud de las Semillas (NSHS, por su sigla en inglés).

Cuadro 1. Resumen de protocolos de PCR seleccionados

Origen	Primer	Región objetivo	Referencia
RT-PCR convencional			
ACIA	TBRFV-MF1	MP ¹	T. Tian, CDFA inédito
	TBRFV-MR1		
SENASICA	ToBRFV-F*	RdRp ²	Rodríguez-Mendoza <i>et al.</i> 2019. <i>Mexican Journal of Phytopathology</i> , 37(2):345-356.
	ToBRFV-R*		
USDA APHIS	FL782	CP ³	Dey <i>et al.</i> 2021. <i>New Disease Reports</i> , 44, e12028. https://doi.org/10.1002/ndr2.12028
	FL783		
RT-PCR en tiempo real			
USDA APHIS	KL 18-59	MP	Chanda <i>et al.</i> 2021. <i>Plant Disease</i> , 105: 3643-3652.
	ToBRFV-F		
	KL 18-60		
	ToBRFV-P1		
ISHI-Veg / NSHS	KL 18-61	MP	ISF ISHI-Veg. 2020. https://worldseed.org/wp-content/uploads/2020/11/Tomato-ToBRFV_2020v1.5.pdf?_ga=2.66722734.1075065090.1644270496-1579089872.1623958967
	ToBRFV-R1		
	CaTA28Fw		
	CaTa28Pr	CP	
	CaTa28Rv		
	CSP1325Fw		
CSP1325Pr	CP		
CSP1325Rv			

¹MP- proteína de movimiento

²RdRp- ARN polimerasa dependiente de ARN

³CP- Cápside

Diseño experimental

Al subgrupo 2 se le asignó la tarea de elaborar el diseño experimental del proyecto piloto. Entre los elementos del diseño que se determinaron se encontraban el formato (a saber, la prueba del anillo), las medidas de evaluación (p. ej., sensibilidad, especificidad, precisión), la composición de los paneles de prueba, el número de repeticiones y de participantes necesarios para obtener resultados válidos desde el punto de vista estadístico. Se seleccionó y diseñó un formato de la prueba del anillo en conformidad con los principios aceptados en el ámbito internacional para la validación de los métodos de diagnóstico. Un tema importante que se discutió en las etapas iniciales del desarrollo del formato de la prueba del anillo fue si se establecía un solo procedimiento de extracción del ácido nucleico para uso de todos los laboratorios participantes. Al final, el GE llegó a un consenso de que cada laboratorio utilizaría los procedimientos de extracción que aplican usualmente. Esta decisión se tomó con el fin de simplificar los aspectos logísticos en la organización de la prueba del anillo y de examinar un proceso que reflejara precisamente la forma en la que se utilizaría el diagnóstico una vez que concluyera el proyecto piloto. Los componentes de los paneles de semillas de la prueba del anillo se resumen en el **Cuadro 2**.

Otra decisión primordial en el diseño experimental es que cada laboratorio participante sometería a prueba los cinco protocolos seleccionados para la prueba del anillo. Si cada laboratorio participante somete a prueba los cinco protocolos seleccionados se disminuiría la variabilidad inexplicable de los resultados.

Con el fin de asegurar la confiabilidad estadística de los resultados de la prueba del anillo, el GE consideró las directrices que se encuentran en dos normas internacionales las cuales indican que necesitan participar por lo menos ocho laboratorios en la prueba del anillo.

Cuadro 2. Composición de los paneles de semillas para la prueba del anillo del ToBRFV

ID de la muestra	Nombre de la muestra	Descripción	Comentarios
A	ToBRFV Analytical Sample	Transcripciones ¹ <i>in vitro</i> de ToBRFV en agua de grado de biología molecular	Muestra analítica creada a partir de transcripciones de ToBRFV para observar la sensibilidad y el límite de detección. La muestra A con una dilución en serie de 1:10 antes de la prueba para crear una curva estándar.
B	Positive Tomato Seed	Muestra de semilla del ToBRFV en concentraciones relativamente elevadas	La muestra B con una dilución en serie de 1:10 posterior a la extracción del ARN para crear una curva estándar y caracterizar el límite de detección.
C	Cross-reacting Analytical Sample	Transcripciones ¹ <i>in vitro</i> de virus no objetivo o ARN total	Muestra analítica creada a partir de una muestra saludable con ToMV ² o ToMMV ³ introducido para observar la especificidad.
D	Negative Tomato Seed	Muestra de semilla sin ToBRFV	
E	Negative Pepper Seed	Muestra de semilla sin ToBRFV	
PPC	Positive Process Control	Semilla positiva con ToBRFV	Se utiliza para confirmar el procesamiento exitoso de la muestra .

NPC-T	Negative Process Control-Tomato	Muestra de semilla sin ToBRFV	Se utiliza para validar que la contaminación o la amplificación espuria no se deriva de algo que se encuentre en la matriz de la muestra o que surja durante el proceso de extracción.
NPC-P	Negative Process Control-Pepper	Muestra de semilla sin ToBRFV	Se utiliza para validar que la contaminación o la amplificación espuria no se deriva de algo que se encuentre en la matriz de la muestra o que surja durante el proceso de extracción.
Calibrator	(Purified RNA)	Transcripciones ¹ <i>in-vitro</i> del ToBRFV en solución amortiguadora con agua de grado de biología molecular en cinco diluciones en serie	Se utiliza para caracterizar la linealidad de los ensayos de PCR en tiempo real.
NTC		agua de grado de biología molecular	Omite cualquier plantilla de ARN de la reacción; funciona como control general para la contaminación irrelevante del ácido nucleico
¹ transcripciones <i>in vitro</i> es una mezcla de transcripciones de las tres regiones objetivo del diagnóstico ² Tomato mosaic virus ³ Tomato mottle mosaic virus			

Nueve laboratorios: dos de Canadá, tres de México y cuatro de Estados Unidos acordaron participar. Cada uno de los laboratorios participantes está autorizado o acreditado por su respectiva ONPF para realizar pruebas de diagnóstico. Los laboratorios participantes aparecen en la lista en el siguiente **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Laboratorios participantes

	Nombre	Organización	Ubicación	Tipo
Estados Unidos				
1	<i>Plant Pathogen Confirmatory Diagnostics Laboratory (PPCDL)</i>	USDA	Laurel, Maryland	Gobierno
2	<i>Seed Science Center</i>	Universidad Estatal de Iowa	Ames, Iowa	Académico
3	<i>California Seed and Plant Laboratory</i>	Laboratorios de CSP	Pleasant Grove, California	Privado
4	<i>UF/IFAS Plant Diagnostic Center</i>	Universidad de Florida	Gainesville, Florida	Académico
CANADÁ				
5	<i>ACIA Charlottetown Laboratory</i>	ACIA	Charlottetown, Isla del Príncipe Eduardo	Gobierno
6	<i>ACIA Fallowfield Laboratory</i>	ACIA	Nepean, Ontario	Gobierno

MÉXICO				
7	Laboratorio de Virología_ CNRF/SENASICA	SENASICA	Tecámac, Estado de México	Gobierno
8	Laboratorio de Biología Molecular y Genómica Funcional	CIAD	Culiacán, Sinaloa	Académico
9	Laboratorio de diagnóstico Integral Fitosanitario (LADIFIT)	LADIFIT	Montecillo, Estado de México	Académico

Aspectos logísticos

El subgrupo 3 abordó diversos aspectos logísticos en cuanto a la implementación de la prueba del anillo del ToBRFV. Esto incluye la obtención de semillas infectadas y no infectadas del ToBRFV para los paneles de prueba, la preparación de los paneles de prueba, la obtención de los reactivos y su distribución en alícuotas, la aleatorización de los paneles de prueba, la obtención de los permisos necesarios y la determinación de la forma en la que los paneles de prueba y los reactivos se distribuirían y quién lo haría. Puesto que los laboratorios participantes no están necesariamente familiarizados con los cinco protocolos de PCR que se han evaluado, y para asegurar la constancia en la ejecución de los protocolos, se redactaron y tradujeron instrucciones de trabajo detalladas para cada uno de los cinco protocolos para distribuir las a cada laboratorio. El GE además acordó brindar suficiente material de prueba y reactivos para los laboratorios participantes con el fin de realizar pruebas de «práctica». Se identificó un sistema de recolección, almacenamiento y análisis de datos y se crearon formularios electrónicos para registrar los datos.

Semilla infectada. La industria donó la semilla de tomate infectada del ToBRFV al *California Seed and Plant Labs* (CSPL), un laboratorio de prueba acreditado por la ISO 17025 y el *National Seed Health System*, para utilizarla como material de referencia en investigación y prueba de diagnóstico. CSPL, por su parte, brindó una parte de estas semillas al proyecto de la NAPPO. La semilla infectada, obtenida por CSPL de diversos productores, se mezcló para crear el material de referencia positivo. Esta mezcla de semilla de referencia positiva se envió posteriormente al PPCDL, en donde además se mezcló con semilla de tomate sin ToBRFV que estaba comercialmente disponible para crear las muestras de semillas positivas con ToBRFV que se utilizaron para evaluar el rendimiento de los protocolos de PCR seleccionados en la prueba del anillo del ToBRFV.

Muestras analíticas (transcripciones de ARN). Se creó una mezcla de transcripciones *in vitro* de las tres regiones objetivo del diagnóstico del ToBRFV (cápside, proteína de movimiento, ARN polimerasa dependiente de ARN) en el Departamento de Biotecnología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV). Las transcripciones se enviaron al PPCDL para ser evaluadas y aumentar su concentración. Las muestras de transcripciones se utilizan para determinar la precisión, sensibilidad y el límite de detección de los ensayos. Las transcripciones del «calibrador» y las muestras de reacción cruzada se crearon en el PPCDL.

Componentes de los paneles de prueba. Los componentes del panel de la prueba del anillo, incluidos los reactivos, se sometieron a prueba utilizando cada uno de los protocolos de RT-PCR seleccionados para la evaluación, con el fin de asegurar la compatibilidad con los diferentes protocolos de PCR. Las pruebas se realizaron en el PPCDL.

Preparación de los paquetes de los paneles de la prueba del anillo. En las discusiones entabladas por el GE, ellos acordaron que para asegurar la constancia y disminuir la variabilidad, así como aumentar la eficacia, se comprarían y se prepararían los reactivos para la prueba del anillo en una sola instalación. Se

convino que el PPCDL trabajaría con la Secretaría de la NAPPO para comprar los reactivos necesarios. Estos reactivos incluyen los primers y las sondas de PCR, los amortiguadores, los nucleótidos, las enzimas, la mezcla de reacción, etc. Se han recibido todos los reactivos para los participantes, y el personal del PPCDL realizó las alícuotas y preparó los paquetes individuales para los laboratorios participantes. Como se indicó anteriormente, el PPCDL también obtuvo las muestras de semillas necesarias y preparará las transcripciones de ARN, incluidas las proporcionadas por el CINVESTAV. Cada uno de los cinco protocolos de PCR que se están evaluando necesita una combinación específica de reactivos. Todos los componentes son anónimos para disminuir el posible sesgo. Cada laboratorio recibirá suficientes reactivos y muestras para realizar una serie de reacciones de «práctica» además de la prueba del anillo misma.

Distribución de paneles. Para evitar cualquier posibilidad de sesgo, asegurar la constancia, disminuir la variabilidad y aumentar la eficacia, una instalación distinta (Universidad de Texas A&M) que ha participado en el desarrollo del proyecto piloto pero que **no** analizará las muestras de la prueba del anillo preparará los paneles aleatorizados y anónimos y los distribuirá junto con los paquetes de reactivos a los laboratorios participantes. Aún se están ultimando los detalles del método actual de entrega para distribuir el panel de la prueba del anillo y los paquetes de reactivos, pero la propuesta actual es entregarlos a los laboratorios de EE. UU. y Canadá a través de mensajería, y llevarlos directamente a la Ciudad de México para posteriormente transportarlos a los laboratorios mexicanos que están participando.

Instrucciones de trabajo detalladas. Se recopiló un archivo el cual contiene la descripción técnica de cada uno de los cinco protocolos de RT-PCR que se han de evaluar en la prueba del anillo y los métodos de extracción de ARN que se sugieren. El documento se preparó en ambos idiomas, inglés y español, y detalla las instrucciones de trabajo para realizar los ensayos de RT-PCR convencional, RT-PCR en tiempo real e interpretar y dar a conocer los resultados. El documento incluye una lista de referencias y recomendaciones para cada uno de los protocolos de RT-PCR evaluados.

Notificación

El GE convino en que habría un repositorio central para recolectar y analizar los datos de la prueba del anillo. Se escogió el Portal del laboratorio del APHIS (ALP, por su sigla en inglés) para ser el repositorio. El ALP es un servicio en línea administrado por la *National Animal Health Laboratory Network* (NAHLN; USDA-APHIS-Veterinary Services) el cual recolecta cantidades enormes de datos con manipulación mínima, dos características que ayudarán a brindar las informaciones de manera inmediata a los socios internacionales. El *USDA-APHIS National Plant Protection Laboratory Accreditation Program* utiliza módulos de prueba de competencia dentro del ALP para capturar los datos generados durante los casos de las pruebas de competencia. Los laboratorios participantes necesitarán inscribirse con el ALP. Se están redactando las instrucciones para inscribirse y utilizar el ALP y se está planeando realizar una sesión virtual de capacitación.

Los datos de la prueba del anillo se utilizarán para comparar los cinco protocolos de PCR seleccionados para los siguientes criterios de validación:

Límite de detección (LOD, por su sigla en inglés)	Una categoría de validación que explica el porcentaje de detección del ensayo en cuanto el material se diluye en serie.
Linealidad	Una categoría de validación que explica la eficacia de la amplificación del ensayo (exactitud), error estándar (precisión), límite de la cuantificación y límite previsto (sensibilidad).
Precisión	Una categoría de validación que explica la variabilidad de los ensayos entre las pruebas.
Sensibilidad	Una categoría de validación que explica el porcentaje de detección de material positivo en el ensayo. Esto es un subconjunto de la selectividad, una categoría de validación que explica la exactitud global del ensayo (total de reacciones falsas).
Especificidad	Una categoría de validación que explica la amplificación no específica o de reacción cruzada del ensayo en el material negativo. Esto también es un subconjunto de la selectividad.

Los resultados de la prueba del anillo se recopilarán en un informe y se presentarán al CE de la NAPPO. Tras la aprobación del CE, el GE tiene la intención de publicar los resultados de la prueba del anillo en un artículo de una revista revisada por colegas para contribuir con el conocimiento público sobre el diagnóstico del ToBRFV.

Presupuesto

El subgrupo del protocolo también preparó un cálculo de los costos (sin incluir mano de obra) para completar la prueba del anillo con el fin de evaluar los cinco protocolos (**Cuadro 4**). Para compensar algunos de los costos de la NAPPO, la Asociación Americana para el Comercio de Semillas (ASTA, por su sigla en inglés) y la Asociación Mexicana de Semilleros (AMSAC) acordaron contribuir con USD 15,000.00 y USD 5,000.00, respectivamente, al proyecto.

Cuadro 4. Cálculo del presupuesto – tomar en cuenta que este presupuesto inicial fue hecho para 10 laboratorios.

Cálculo del costo de la prueba del anillo de la NAPPO para el ToBRFV				
Costo para los laboratorios participantes (10 laboratorios)				
Costo de la extracción y del RT-PCR	Muestra #	Costo/muestra	Muestras totales 10 laboratorios	Costo por 10 laboratorios
CFIA/CDFA MP cRT-PCR	1	\$ 8.00	565	\$ 5,650.00
SENASICA RdRp cRT-PCR	1	\$ 25.00	540	\$ 13,500.00
cRT-PCR PPQ (costo compartido)			510	\$ 3982.20
RT-PCR en tiempo real PPQ (costo compartido)			700	\$7,309.19
Protocolos ISHI-Veg qRT-PCR costo similar a PPQ			700	\$7,309.19
15 extracciones promedio por laboratorio	n/a	\$ 484.00	n/a	\$4,840.00

				\$42,590.58
Costo para la producción y validación del panel de la prueba del anillo				
Preparación del material analítico				\$ 5,500.00
Juegos de extracción y materiales				\$ 5,600.00
Juegos de RT-PCR, primers y sondas y materiales				\$12,500.00
Cálculo de costo de envío				\$ 3,200.00
				\$ 26,800.00
10% de gastos misceláneos e imprevistos				\$6,939.00
Costo total				\$ 76,329.58

Se realizaron los preparativos para que los laboratorios elaboraran su «lista de compras» y que luego coordinaran con la Secretaría de la NAPPO para realizar las compras necesarias.

Calendario



Conclusión

Después de un inicio más lento de lo previsto del proyecto piloto el cual dio lugar a discusiones extensas, pero necesarias acerca de los detalles operativos y los cambios en los miembros del GE, el grupo se ha fusionado bien y ha llegado a un consenso acerca de todos los puntos importantes de dicho proyecto piloto. Se ha concluido casi todo el trabajo preparatorio y el GE está dispuesto a que el proyecto piloto logre una conclusión exitosa en los próximos dos a tres meses.

DRAFT