

# Toma y envío de muestras, y Diagnóstico del HLB.



**SAGARPA**

SECRETARÍA DE AGRICULTURA,  
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,  
PESCA Y ALIMENTACIÓN



**SENASICA**  
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,  
INOCUIDAD Y CALIDAD  
AGROALIMENTARIA

## Antecedentes.

En México, desde el 2008 se realizan actividades enfocadas a la detección del Huanglongbing (HLB) de los cítricos.

### Principales actividades :

- Colecta del psílido (*Diaphorina citri*) vector de la bacteria .
  - ▶ Huertas comerciales.
  - ▶ Viveros.
  - ▶ Zonas residenciales urbanas y rurales.
  - ▶ Rutas: Carreteras, caminos.
    - \* Los psílicos positivos aparecen en lugares inesperados.
    - \*\* Ca. Las se ha detectado en muestras de árboles visualmente sanos en sitios sin registro de la presencia de HLB.
- Búsqueda de plantas sintomáticas





## Parte Operativa en Campo

- Muestreo (establecer sitios de muestreo)
- Envío de muestras.

## Parte Operativa en Laboratorio

- Rastreabilidad de la muestra.
- Diagnóstico:
  - ◆ Extracción de ADN
  - ◆ qPCR
  - ◆ Resultados (corroboraciones)

Los métodos de muestreo son críticos para la detección, identificación y cuantificación de especies de *Liberibacter*.

Distribución irregular, título o concentración muy baja en plantas hospedantes.



Toma de decisiones sobre el manejo de la enfermedad y del insecto vector.

### MUESTRAS DE PSÍLIDOS

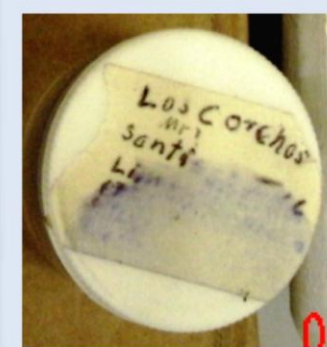
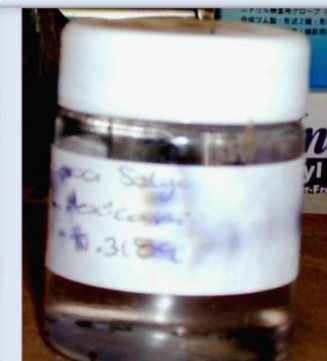
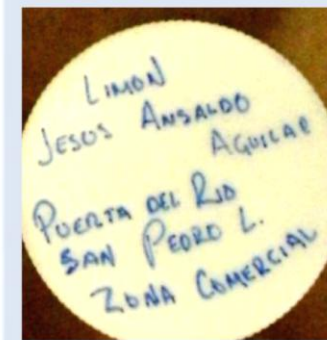
- No recolectar todos los psílidos de una misma planta.
- Los psílidos pueden colectarse con un aspirador manual.
- Conservarlos en frascos viales con alcohol etílico al 95% o al 75%.



### Protocolo de actuación para la detección del Huanglongbing

## MUESTRAS DE PSÍLIDOS

- Etiquetar los frascos que contengan los psílicos.
  - a) Asignar un número consecutivo a las muestras. (evitar poner datos en el frasco para simplificar el manejo y rastreabilidad de las muestras).
  - b) Se recomienda utilizar lápiz y evitar así que la etiqueta se borre.
    - Asegurar que los frascos no presenten fugas de alcohol.
    - No emplear frascos de vidrio, que pueden sufrir rupturas si se utiliza servicios de mensajería.



# TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

Operatividad en Campo

## MUESTRAS DE PSÍLIDOS

Número consecutivo:  
simplifica el manejo de las muestras

SAGARPA

SECRETARÍA DE AGRICULTURA,  
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,  
PESCA Y ALIMENTACIÓN



SENASICA

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,  
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA



## PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE PSÍLIDOS

Registrar la información de cada una de las muestras en un formato que contenga los datos necesarios para identificar la procedencia de la muestra (enviar el formato electrónico al laboratorio).

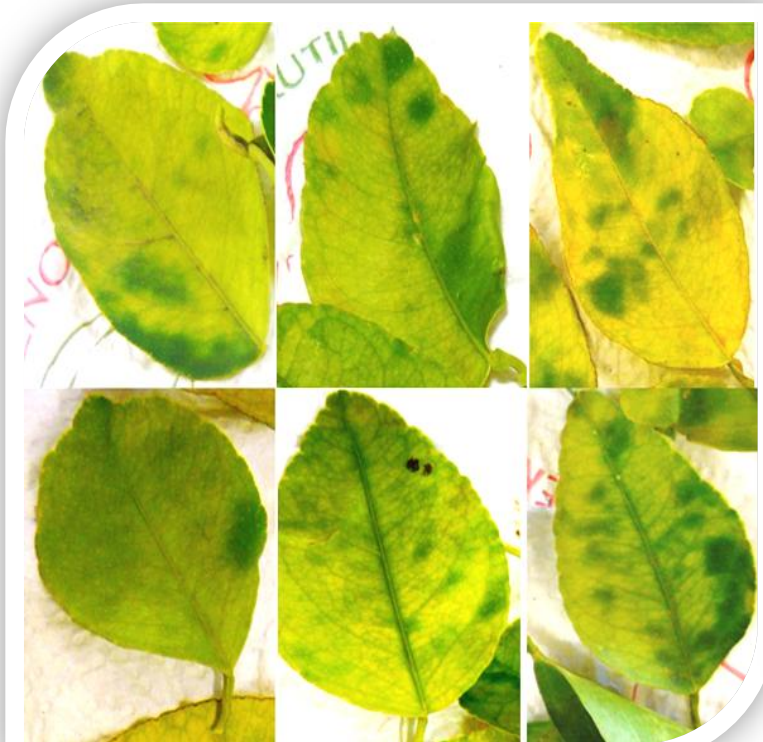
A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	2	3	4	5	6	7	8	9
No. CONSECUTIVO	LATITUD	LONGITUD	ESTADO	MUNICIPIO	LOCALIDAD	LUGAR	RUTA / SIVEF	ESPECIE
3568	18.91826	-103.90668	Colima	Tecoman	Ejido Independencia, El Llano	Comercial	(-)	Limon mexicano con espinas
3569	18.91013	-103.91163	Colima	Tecoman	Ejido Independencia, El Llano	Comercial	(-)	Limon mexicano con espinas
3570	18.92866	-103.90383	Colima	Tecoman	Ejido Independencia, El Llano	Comercial	(-)	Limon mexicano con espinas
3571	18.91368	-103.90920	Colima	Tecoman	Ejido Independencia, El Llano	Comercial	(-)	Limon mexicano con espinas
3572	18.91385	-103.90986	Colima	Tecoman	Ejido Independencia, El Llano	Comercial	(-)	Limon mexicano con espinas

J	K	L	M	N	O	P	Q	R
10	11	12	13	14	15	16	17	18
FECHA DE COLECTA	EDAD PLANTACIÓN	PORTAINJERTO UTILIZADO	FASE FENOLOGICA	SUPERFICIE (Ha)	SINTOMAS OBSERVADOS	Mat. Veg. (+)	Psilidos (+)	NOMBRE DEL PR
27/06/2013	6	Macrofila	Fructificacion	10.00	Moteado	1	0	Alfredo Cazarez C
27/06/2013	2	Macrofila	Desarrollo	10.50	Moteado	1	0	Enrique Cazarez C
27/06/2013	4	Macrofila	Fructificacion	13.50	Moteado	1	0	Ramon Cazarez G
27/06/2013	6	Macrofila	Fructificacion	1.00	Moteado	1	0	Ma. Elena Chacon
27/06/2013	2	Macrofila	Desarrollo	6.00	Moteado	1	0	Antonio Resendiz



### PROCESAMIENTO DE MUESTRAS VEGETALES

- Plantas sintomáticas (Síntomas no exclusivos de HLB)
- Plantas asintomáticas (vivero).



## MUESTRAS VEGETALES

- Plantas sintomáticas (Síntomas no exclusivos de HLB)
  - ◆ **Protocolo de actuación para la detección del Huanglongbing.**

### IX. Exploración y muestreo del HLB y el Psílido Asiático de los Cítricos

#### IX.1. Exploración para detección y muestreo

- IX.1.1 Equipo de trabajo
- IX.1.2 Materiales
- IX.1.3 Superficie a explorar
- IX.1.4 Búsqueda de síntomas con fines de detección
- IX.1.5 Sitios de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria (SIVEF)
- IX.1.6 Muestreo y envío de material vegetativo

### ◆ Protocolo de actuación ante la emergencia por la detección del Huanglongbing

#### V. Plan de reacción ante un diagnóstico positivo

- 5.1 Por detección en material vegetal
- 5.2 Por detección en psílidos colectados en huertos comerciales y viveros.
- 5.3 Por detección en psílidos colectados en rutas de muestreo (traspáticos)

#### VI. Divulgación del brote

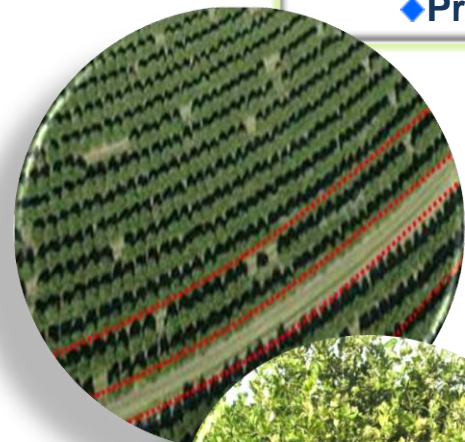
#### VII. Formación y movilización de brigadas

#### VIII. Exploración para delimitación del brote

#### IX. Manejo del brote

- 9.1 Detección y eliminación de plantas
- 9.2 Control sistemático del psílido asiático de los cítricos
- 9.3 Producción de yemas y plantas de vivero bajo malla
- 9.4 Eliminación de la limonaria
- 9.5 Rastreabilidad,
- 9.6 Fundamento legal.

#### X. Exploración de seguimiento



# TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

## Operatividad en Campo

- Búsqueda de Plantas sintomáticas.
  - ◆ Protocolo de actuación para la detección del HLB.

1. Huertas de plantas jóvenes (4 a 10 años de edad)
2. Huertas aledañas a cuerpos de agua
3. Huertas jóvenes que estén junto a huertas adultas
4. Huertas abandonadas
5. Huertas localizadas cerca de áreas con presencia de HLB
6. Huertas localizadas cerca de las costas y fronteras.

1. Limón mexicano y limón persa
2. Naranja, mandarina, tangelo y tangerina
3. Pomelo y toronja



- Plantas sintomáticas (Síntomas no exclusivos de HLB)



**1 a 4 ramas con hojas sintomáticas.**





#### ■ Plantas asintomáticas (vivero)

#### Protocolo de actuación ante la emergencia por la detección del Huanglongbing

En el momento en que se detecte HLB en un estado cítrícola, ninguna planta de cítricos que sea producida en viveros que no cuenten con malla antiáfidos podrá ser comercializada dentro ni fuera del estado; las plantas que tengan en existencia deberán ser analizadas al 100% para HLB a costo del viverista, o en su caso, proceder a la inmediata erradicación. Estos viveros no podrán producir y comercializar planta hasta que cuenten con malla antiáfidos

# TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

## Operatividad en Campo

### MUESTRAS VEGETALES

- Ramas no deben ser viejas ni brotes recién formados o nuevos.
- Debe ser de color verde oscuro y la corteza debe estar endurecida
- Las ramas deben tomarse de cuatro puntos diferentes del árbol.



# TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

Operatividad en Campo

## ENVÍO DE MUESTRAS VEGETALES

SAGARPA

SECRETARÍA DE AGRICULTURA,  
GANADERÍA, DESARROLLO RURAL,  
PESCA Y ALIMENTACIÓN



SENASICA

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,  
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

**Evitar la oxidación de las hojas.**



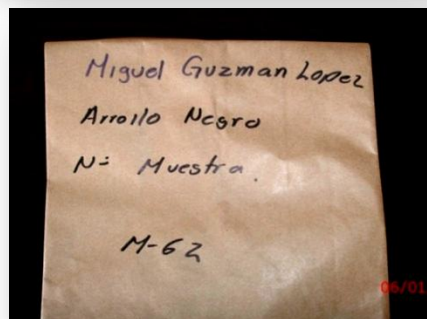
## LABORATORIO



# TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

## Operatividad en Campo

Evitar la oxidación de las hojas.



- Asignar una numeración continua.
- Garantizar que la etiqueta no se borre.
- Datos de la muestra



## Operatividad en Laboratorio

- Rastreabilidad de la muestra:

Folios usuarios-Datos. Folio Laboratorio.

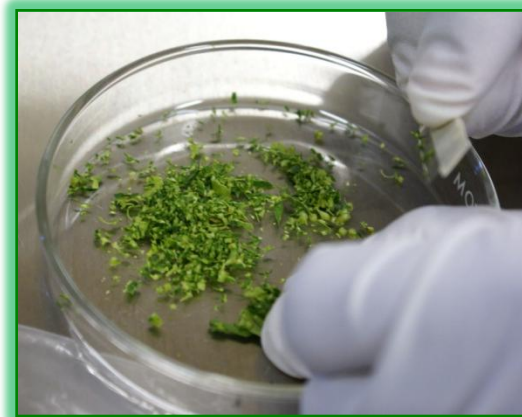
### Registro: Bitácora de Diagnóstico (folio interno).

1	FECHA DE RECEPCIONo. Muestra	TIPO DE MUESTRA	INDICACION/RAZON S	DIAGNOSTICO SOLICIT	Resultado HLB
746	735 23/04/2013 9	psilidos	CESV GUERRERO	hlb	Positivo
747	736 23/04/2013 10	psilidos	CESV GUERRERO	hlb	Positivo
748	737 23/04/2013 11	psilidos	CESV GUERRERO	hlb	Positivo
749	738 23/04/2013 12	psilidos	CESV GUERRERO	hlb	Positivo
750	739 23/04/2013 13	psilidos	CESV GUERRERO	hlb	Negativo
751	740 23/04/2013 14	psilidos	CESV GUERRERO	hlb	Negativo
752	741 23/04/2013 15	psilidos	CESV GUERRERO	hlb	Positivo
753	742 23/04/2013 16	psilidos	CESV GUERRERO	hlb	Positivo
754	743 23/04/2013 17	psilidos	CESV GUERRERO	hlb	Negativo
755	744 23/04/2013 1	VEGETAL	CESV GUERRERO	hlb	Negativo
756	745 23/04/2013 2	VEGETAL	CESV GUERRERO	hlb	Negativo
757	746 23/04/2013 3	VEGETAL	CESV GUERRERO	hlb	Negativo
758	747 23/04/2013 4	VEGETAL	CESV GUERRERO	hlb	Negativo
759	748 23/04/2013 5	VEGETAL	CESV GUERRERO	hlb	Negativo
760	749 23/04/2013 6	VEGETAL	CESV GUERRERO	hlb	Negativo
761	750 23/04/2013 7	VEGETAL	CESV GUERRERO	hlb	Negativo
762	751 23/04/2013 8	VEGETAL	CESV GUERRERO	hlb	Negativo
763	752 23/04/2013 9	VEGETAL	CESV GUERRERO	hlb	Negativo
764	753 23/04/2013 10	VEGETAL	CESV GUERRERO	hlb	Negativo
765	754 24/04/2013 1	psilidos	cesv puebla	HLB	negativo
766	755 24/04/2013 2	psilidos	cesv puebla	HLB	negativo
767	756 24/04/2013 3	psilidos	cesv puebla	HLB	negativo
768	757 24/04/2013 4	psilidos	cesv puebla	HLB	negativo
769	758 24/04/2013 5	psilidos	cesv puebla	HLB	negativo

# TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS

## Operatividad en Laboratorio

- Procedimiento de Diagnóstico:  
Extracción de ADN-qPCR (PCR)



Purificación de ADN:  
columnas de sílice.

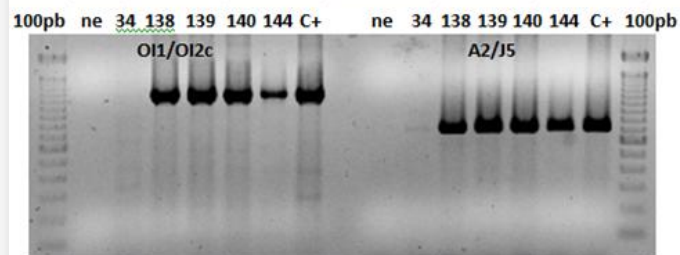
qPCR para la detección de  
*Candidatus Liberibacter*



# Operatividad en Laboratorio

- Procedimiento de Diagnóstico:  
Registro de resultados

qPCR para la detección de HLBs						
Well	Fluor	Muestras	Folio Comité	Folio estación	Cq Mean	Resultado
D05	FAM	Vegetales	1445	138	24.43	Positivo
D06	FAM		1446	139	21.78	Positivo
D07	FAM		1447	140	22.48	Positivo
D08	FAM		1448	141	0.00	negativo
D09	FAM		1449	142 a	0.00	negativo
D10	FAM		1449	142 b	0.00	negativo
E03	FAM	Psilidos	1450	143	39.62	negativo
E04	FAM		1451	144	29.12	Positivo
E05	FAM		1452	145	0.00	negativo
E06	FAM		1453	146	0.00	negativo
E07	FAM		1454	147	39.49	negativo
E08	FAM		NTC		0.00	negativo
E09	FAM	NTC		0.00	negativo	
E10	FAM	Pos Ctrl		1129	24.04	Positivo
F03	FAM	Pos Ctrl		1129	23.79	Positivo





## Correcta aplicación del Procedimiento de Diagnóstico

**Falsos Negativos: Riesgo de dispersión!!  
Falsos positivos**

- Preparación de muestras
- Extracción ADN
- qPCR -PCR

**Riesgo de Contaminación**

**Buenas prácticas de laboratorio**

**Confiable y reproducibilidad  
de los resultados**



## Buenas prácticas de laboratorio

- Separación de áreas de laboratorio PRE-PCR, PCR y POST-PCR. Equipo y materiales exclusivos para cada área.
- Superficies limpias antes y después de usarlas (Cloro, alcohol 70%, DNAzap), lámparas de UV, Material estéril,





## Laboratorios Oficiales

- Estación de Cuarentena del CNRF (Querétaro)
- CNRF (México, D.F.).
- CESV-Yucatán.
- CESV-Colima

## 8 Laboratorios aprobados por la DGSV.



## ENERO-JULIO 2013

Laboratorio Oficial	Muestras analizadas
ENECUSAV	3012
CNRF-Colima	2564
CRNF-Yucatán	4803
CNRF	32
<b>Total</b>	<b>10,411</b>
Laboratorio Privado	
CISEF-Coahuila	158
Biociencia-NL	200
LCRM	289
FITOLAB	1443
CNRFLM	1900
<b>Total</b>	<b>3990</b>

**1,062**  
Positivos

**13,339**  
Negativos

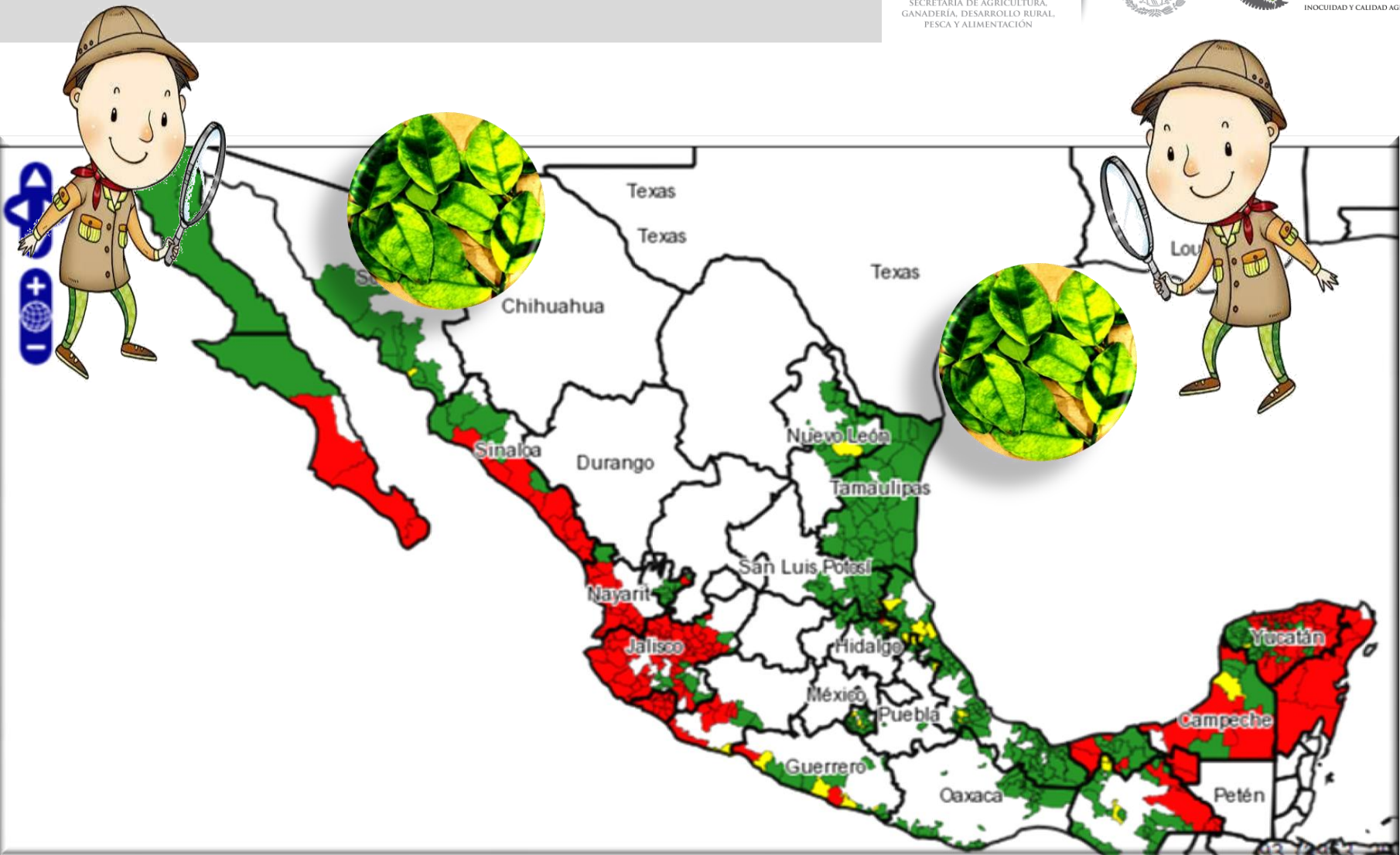
**14, 401**

**12, 551**

**1,850**



# DIAGNÓSTICO DE HLB



**13 de los 23 estados citrícolas del país.  
Detección del HLB en el estado de Guerrero: 2013**